



Modélisation des variations journalières de la conductance stomatique : apport d'une approche dynamique et conséquences sur l'efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau chez le chêne

Silvère Vialet-Chabrand

► To cite this version:

Silvère Vialet-Chabrand. Modélisation des variations journalières de la conductance stomatique : apport d'une approche dynamique et conséquences sur l'efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau chez le chêne. Sylviculture, foresterie. Université de Lorraine, 2013. Français. NNT : 2013LORR0146 . tel-01750135

HAL Id: tel-01750135

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750135>

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

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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE



FACULTE DES SCIENCES & TECHNOLOGIES

Collegium Sciences & Technologies

Thèse financée par un contrat doctoral de l'Université de Lorraine.

UMR1137 Ecologie et Ecophysiologie Forestières

Ecole Doctorale RP2E

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine

en biologie végétale et forestière

par Silvère VIALET-CHABRAND

Modélisation des variations journalières de la conductance stomatique: apports d'une approche dynamique et conséquences sur l'efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau chez le chêne.

Soutenance publique le 5 septembre 2013

Membres du jury:

Président:	M. Daniel Epron	Professeur, Université de Lorraine, Nancy
Rapporteurs:	M. Eric Dufrêne	Directeur de Recherche, CNRS, Orsay
	M. Thierry Simonneau	Directeur de Recherche, INRA, Montpellier
Examineurs:	M. Bernard Genty	Chercheur, CNRS, Cadarache
	M. Jérôme Ogée	Chargé de Recherche, INRA, Villenave d'Ornon
	M. Erwin Dreyer	Directeur de Recherche, INRA, Nancy (directeur de thèse)
	M. Brendel Oliver	Chargé de Recherche, INRA, Nancy (co-directeur de thèse)

UMR1137 INRA/UL Ecologie et Ecophysiologie Forestières Faculté des
Sciences & Technologies - 54500 Vandœuvre-lès-Nancy

Remerciements

Mes remerciements vont tout d'abord à Laetitia et à ma famille qui m'ont soutenu/supporté durant ces 3ans et demi.

Un grand merci à Oliver qui m'a suivi durant toutes ces années. J'ai pu grâce à toi développer une thématique de modélisation qui m'a permis de pratiquer mes deux passions: l'écologie et l'informatique.

Un grand merci aussi à Erwin qui m'a aidé lors des phases de rédactions et m'a fait réfléchir sur les objectifs de ma thèse.

Merci à toute la BAB (bande à Béa) dont le noyau dur est composé de: Irène, Béa, François et David. Grâce à vous, il y a toujours eu une bonne ambiance dans le bureau. De plus, les longues discussions de bioinformatique avec David me manqueront (surtout les rastas). Une dédicace spéciale à François et Jennifer avec qui j'ai partagé le bureau.

Je te remercie Pierre de m'avoir fait découvrir les statistiques et plus particulièrement les statistiques bayésiennes.

Je remercie également Patrick Mac Gyver qui m'a appris à démonter une LiCor avec un trombone et m'a sauvé lors des pannes diverses rencontrées au cours des expérimentations.

Cyril (alias Dr GreenHouse) et Franck, merci pour votre aide lors des expérimentations dans les serres et sur Pollux.

Merci à toi Cyril (le baléarien) pour nos discussions sur la conductance mésophyllienne et la discrimination isotopique.

Didier et Nathalie, je vous remercie pour votre aide pour la microscopie électronique.

Merci Béatrice de m'avoir aidé lors de l'extraction des sucres.

Je te remercie Pascal d'avoir toujours été disponible pour discuter.

Merci à toute l'équipe du plateau technique isotopie: Nicolas, Claude, Christian, Daniel.

Je suis reconnaissant à la partie « FAC » de m'avoir accueilli pendant mon monitorat, à savoir: Yves, Pierre, Dany, Pierrick, Sandrine...

Je remercie toute l'équipe administrative pour leur réactivité et leur disponibilité: Rosine, Laurence, Audrey et Adeline.

Table des matières

INTRODUCTION	3
1. EFFICIENCE D'UTILISATION DE L'EAU	3
2. PHYSIOLOGIE DE L'EFFICIENCE INTRINSEQUE D'UTILISATION DE L'EAU	5
3. IMPACT DE LA REGULATION STOMATIQUE SUR LA TRANSPIRATION.....	7
4. ROLE DES STOMATES DANS LA REGULATION DES ECHANGES DE CO ₂ ET H ₂ O ENTRE LA FEUILLE ET L'ATMOSPHERE	9
5. CONSEQUENCES DE LA LENTE REPONSE TEMPORELLE DES STOMATES	11
6. REPONSES TEMPORELLES DE LA CONDUCTANCE STOMATIQUE ET REGIME PERMANENT.....	17
7. REPONSE DE LA CONDUCTANCE STOMATIQUE AUX VARIATIONS DU MICROCLIMAT	19
7.1. <i>Conductance stomatique de jour</i>	19
7.2. <i>Conductance stomatique de nuit</i>	23
8. MODELISATION INVERSEE: UN ACCES A LA DIVERSITE DES PARAMETRES D'ECHANGES GAZEUX.....	25
MODELISATION DE LA CONDUCTANCE STOMATIQUE.....	27
1. PRINCIPAUX MODELES DECRIVANT LA CONDUCTANCE STOMATIQUE EN REGIME PERMANENT	27
2. MODELES DYNAMIQUES DECRIVANT LA CONDUCTANCE STOMATIQUE.....	31
2.1. <i>Equations analytiques décrivant la réponse temporelle</i>	31
2.2. <i>Equations différentielles décrivant la réponse temporelle</i>	33
MODELISATION INVERSEE: OPTIMISATION DES VALEURS DE PARAMETRES.	35
1. RECHERCHE DE L'OPTIMUM	35
1.1. <i>Recherche locale</i>	35
1.2. <i>Recherche globale</i>	37
2. ESTIMATION DES DISTRIBUTIONS DE PROBABILITE DES PARAMETRES	39
2.1. <i>Inférence bayésienne</i>	39
PROBLEMATIQUE.....	49
MATERIELS ET METHODES.....	55
CHOIX DES ESPECES.....	55
MODELISATION DYNAMIQUE ET PAS DE TEMPS DE MESURES.	55
STATISTIQUES BAYESIENNES ET TEMPS DE CALCUL	55
RESOLUTION D'EQUATIONS DIFFERENTIELLES.....	57
APPLICATION A UNE CINETIQUE JOURNALIERE EN CONDITIONS NATURELLES.	59
1. DESCRIPTION D'UN MODELE DYNAMIQUE INCLUANT LA REPONSE DE LA CONDUCTANCE STOMATIQUE A L'IRRADIANCE, LA TEMPERATURE ET L'HUMIDITE.....	59
2. MESURES DE LA CONDUCTANCE STOMATIQUE AU COURS D'UN CYCLE JOURNALIER.....	61
3. MISE EN ŒUVRE DE L'INFERENCE BAYESIENNE.....	63
4. PARAMETRES ESTIMES PAR L'INFERENCE BAYESIENNE	65
5. PERFORMANCE DU MODELE DYNAMIQUE AU COURS D'UN CYCLE JOURNALIER	67
6. COMPARAISON DU MODELE DYNAMIQUE AVEC LE MODELE DE BALL ET AL (1987)	69
CONCLUSIONS.....	73
BIBLIOGRAPHIE.....	80

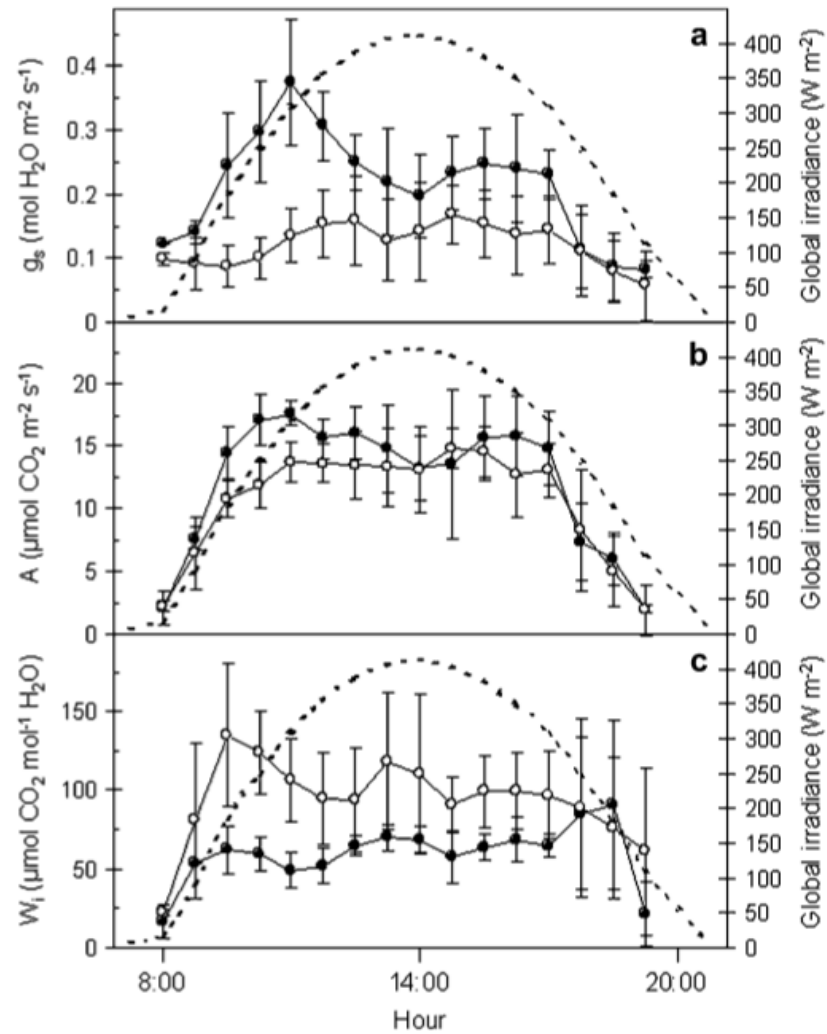


Figure 1: Cinétique journalière de la conductance stomatique à la vapeur d'eau (g_s), de l'assimilation nette de CO_2 (A) et de l'efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau (W_i) chez des génotypes de chêne pédonculés présentant des valeurs de W_i élevées (cercles blancs) ou faibles (points noirs). Chaque point correspond à la moyenne de chaque phénotype ($N=3$) $\pm$ un écart type. La ligne en tiret représente l'irradiance globale dans la serre au cours de la journée de mesure. (Roussel *et al.*, 2009)

Introduction

1. Efficience d'utilisation de l'eau

La nécessité d'optimiser la production et la consommation d'eau est un problème courant en agronomie et de plus en plus en foresterie (Dvorak, 2012). L'efficience d'utilisation de l'eau intègre ces deux composantes à différentes échelles de temps et d'espace. A l'échelle d'un individu, elle se définit comme la biomasse accumulée au cours de sa croissance rapportée à la consommation totale d'eau. Toutefois, l'étude de l'efficience d'utilisation de l'eau à cette échelle est difficile et a nécessité le développement de nombreuses techniques de mesures indirectes (Wullschleger *et al.*, 1998). A l'échelle de la feuille, on peut ainsi mesurer l'assimilation nette de CO₂ (A) et la transpiration (E). Le rapport A/E définit alors l'efficience instantanée d'utilisation de l'eau. Toutefois, le passage d'une efficience d'utilisation de l'eau du niveau foliaire au niveau plante entière n'est pas trivial. Les deux mesures sont réalisées à des échelles temporelles différentes et l'extrapolation de l'efficience d'utilisation de l'eau à l'échelle de l'arbre nécessite de prendre en compte la réponse de A et E aux variations des conditions microclimatiques régnant dans la canopée. Ainsi, l'optimisation de A/E ne permet pas toujours d'augmenter la production à l'échelle du plant (Condon *et al.*, 2002, 2004). En effet, les deux composantes A et E ne varient pas indépendamment au cours du temps et un ratio A/E plus élevé peut résulter d'une baisse simultanée de E et A (dans des proportions différentes), ce qui aboutit à la diminution de la biomasse accumulée sur le long terme. L'objectif de l'optimisation est donc de maintenir ou d'augmenter A tout en diminuant E (Yoo *et al.*, 2009).

L'efficience instantanée d'utilisation de l'eau A/E comprend une composante physiologique due à la photosynthèse et à la régulation stomatique, et une composante microclimatique due au gradient de pression de vapeur d'eau entre la feuille et l'air qui constitue la force motrice d' E . Pour étudier l'efficience d'utilisation de l'eau au niveau foliaire indépendamment de la composante microclimatique, l'efficience intrinsèque d'utilisation de l'eau (W_i) a été définie comme le rapport entre A et la conductance stomatique à la vapeur d'eau (g_s) (Farquhar et Richards, 1984). Cette dernière correspond à l'inverse de la résistance à la diffusion du CO₂ et de H₂O entre la feuille et l'air et dépend du degré d'ouverture des stomates. Le développement des techniques de mesures de la discrimination isotopique du carbone a permis de généraliser les estimations de W_i intégrée sur une période de temps allant de quelques jours à la vie de la feuille (Farquhar et Richards, 1984). Ces mesures ont permis de détecter une diversité de W_i aussi bien chez les plantes de grande culture (Ritchie *et al.*, 1987; Yang *et al.*, 2005) que chez les arbres (Guehl *et al.*, 1995; Bonal *et al.*, 2000; Lauteri *et al.*, 2004). L'étude de cette diversité a aussi révélé un déterminisme génétique de W_i entre individus d'une même espèce (blé: Condon *et al.*, 1993; pin maritime et chêne pédonculé: Brendel *et al.*, 2002, 2007). Pour expliquer ces différences de W_i intégrées dans le temps, il est nécessaire de mieux comprendre les variations journalières de W_i . Chez des génotypes extrêmes pour W_i de chêne pédonculé, l'étude des variations journalières de W_i a mis en évidence le rôle plus important de g_s dans les différences de W_i (Roussel *et al.*, 2009; Fig. 1). Les causes de la diversité de conductance stomatique observées au cours de la journée ne sont pas encore élucidées. **Pour aller plus loin dans la compréhension du déterminisme de W_i , il faudrait identifier les différentes voies de transduction des signaux microclimatiques conduisant à l'ouverture et à la fermeture des stomates.**

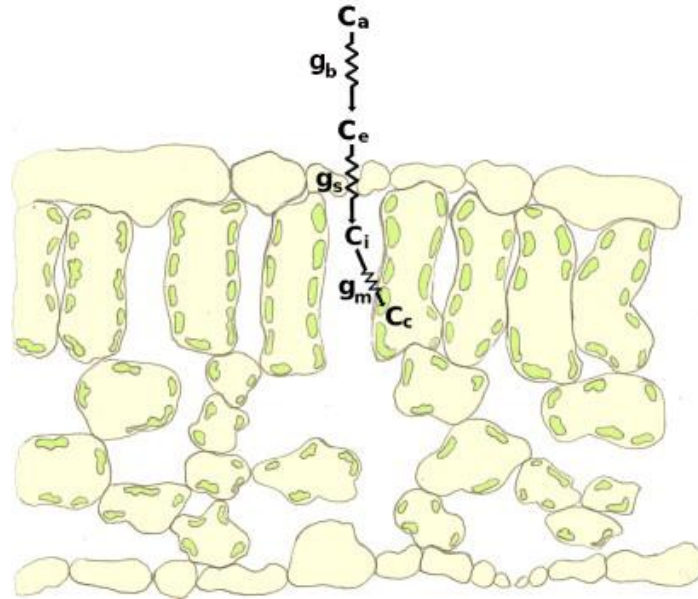


Figure 2: Schéma des conductances en série pour la diffusion du CO_2 au niveau foliaire. Les conductances de l'atmosphère vers la feuille sont: la conductance de couche limite (g_b), la conductance stomatique (g_s) et la conductance mésophyllienne (g_m). Un gradient de pression partielle de CO_2 s'établit entre le CO_2 atmosphérique (C_a), le CO_2 à la surface de la feuille (C_e), le CO_2 intercellulaire (C_i) et le CO_2 au niveau des sites de carboxylation (C_c) (Tholen *et al.*, 2012).

2. Physiologie de l'efficience intrinsèque d'utilisation de l'eau

Dans le continuum sol-plante-atmosphère, la feuille est à l'interface entre la plante et l'atmosphère. Au niveau foliaire, les échanges de CO₂ et H₂O sont nécessaires, respectivement, à la photosynthèse et à la transpiration, qui est à l'origine de la circulation de l'eau dans la plante. En effet, jusqu'à 97% de l'eau absorbée par la plante est perdue sous forme de transpiration vers l'atmosphère (Taiz et Zeiger, 2006). La force motrice nécessaire à la transpiration dépend du gradient de pression partielle de vapeur d'eau entre la feuille et l'atmosphère. Typiquement chez les plantes de type C₃, les flux de vapeur d'eau au travers des stomates sont jusqu'à 100 fois plus importants que les flux de CO₂ (Bacon, 2004). Il y a ainsi une dominance des pertes en eau par rapport au gain de carbone chez toutes les plantes.

Entre la feuille et l'atmosphère, les échanges s'effectuent principalement à travers les stomates, le reste de l'épiderme foliaire étant recouvert de couches superposées de dépôts cireux (cutine) qui constituent la cuticule. Cette cuticule empêche la diffusion des gaz et permet la constitution de gradients inverses de pression partielle de CO₂ et de vapeur d'eau entre la feuille et l'atmosphère. Le degré d'ouverture des stomates régule donc la résistance à la diffusion des gaz que l'on peut aussi exprimer comme une conductance (l'inverse d'une résistance). Gaastra (1959) a dérivé de la première loi de Fick un modèle décrivant les différents gradients de pression partielle de CO₂ et H₂O en régime permanent:

$$A = g_{tc} \cdot (C_a - C_i) = g_m \cdot (C_i - C_c) \quad 1.$$

où A représente l'assimilation nette de CO₂, g_{tc} la conductance totale au CO₂ de l'atmosphère aux espaces intercellulaires, g_m la conductance mésophyllienne, C_a la pression partielle de CO₂ dans l'air, C_i la pression partielle de CO₂ dans les espaces intercellulaires et C_c la pression partielle de CO₂ au niveau des sites de carboxylation (Fig. 2). La conductance totale au CO₂ g_{tc} est la résultante de deux conductances en série, la conductance stomatique et la conductance de couche limite à la vapeur d'eau:

$$g_{tc} = \frac{1}{\frac{1.6}{g_s} + \frac{1.37}{g_b}} \quad 2.$$

Les échanges de CO₂ et H₂O s'effectuant en parallèle et en sens inverse, les conductances stomatique et de couche limite au CO₂ et H₂O peuvent facilement être converties en utilisant les coefficients 1.6 et 1.37 décrivant le rapport des diffusivités entre les deux molécules au travers des stomates et de la couche limite.

Le CO₂ qui est présent à plus forte pression partielle dans l'atmosphère que dans la feuille ne diffuse donc pas librement jusqu'aux sites de carboxylation (Fig. 2). Trois conductances en séries se succèdent sur le trajet du CO₂: la conductance de couche limite (g_b), la conductance stomatique (g_s) et la conductance mésophyllienne (g_m). La conductance de couche limite (g_b) dépend principalement de la forme et de la surface des feuilles ainsi que de la vitesse du vent. La conductance stomatique (g_s) dépend principalement du degré d'ouverture des stomates, de leur taille et de leur densité. Les variations de la conductance stomatique permettent la régulation de la

pression partielle de CO₂ intercellulaire (C_i) et de la transpiration (E). La conductance mésophyllienne est liée à la diffusion en phase liquide de CO₂ dissout, avec un équilibre entre la forme moléculaire et le bicarbonate (HCO₃⁻). La conversion entre CO₂ et HCO₃⁻ est catalysée par les anhydrases carboniques. La conductance mésophyllienne joue un rôle dans la régulation de la pression partielle de CO₂ disponible au niveau des sites de carboxylation (C_c). Cependant, ses possibles variations sont encore sujettes à débat (Doutte *et al.*, 2012; Flexas *et al.*, 2012; Loriaux *et al.*, 2013). La conductance stomatique est donc un mécanisme important pour réguler la diffusion du CO₂ et les pertes en eau.

3. Impact de la régulation stomatique sur la transpiration

Comme nous venons de le voir, la diffusion de CO₂ et H₂O entre la feuille et l'atmosphère se fait au travers des stomates et de la couche limite. A la surface d'une feuille, la couche limite correspond à une très fine couche d'air en flux laminaire qui induit une résistance à la diffusion du CO₂ et de la vapeur d'eau. La conductance de couche limite (g_b) correspond à l'inverse de cette résistance. Ainsi, plus la couche d'air en flux laminaire est fine plus g_b est élevé. La vitesse du vent, la taille des feuilles, leur forme et leur distribution influencent g_b car elles modifient l'écoulement de l'air à la surface de la feuille.

L'impact de g_b sur la transpiration foliaire est lié au gradient de pression de vapeur d'eau entre la feuille et l'atmosphère (VPD_l). En effet, une faible g_b induit une résistance à la diffusion de la vapeur d'eau par transpiration vers l'atmosphère ce qui réduit le VPD_l en créant une zone de plus forte humidité à la surface de la feuille. Cela induit aussi une augmentation de la température foliaire due à une diminution de la perte d'énergie thermique sous forme de transpiration. Il existe donc des situations où la conductance stomatique (g_s) a un rôle moindre dans la régulation de la transpiration car elle est découplée des variations de l'environnement. Jarvis et McNaughton (1986) ont quantifié l'influence de l'atmosphère sur l'échange de gaz foliaire avec un facteur de découplage Ω . Il décrit le lien entre les conditions environnementales et les processus biologiques foliaires et est défini par:

$$\Omega = \frac{\varepsilon + 1}{\varepsilon + 1 + \frac{g_b}{g_s}} \quad 3.$$

où ε est une fonction dépendante de la température définie par Jarvis et McNaughton (1986). Le facteur de découplage Ω est sans unité et varie entre 0 et 1. Si Ω est proche de 1, la feuille est découplée de l'atmosphère et g_s a peu d'impact sur la transpiration. Dans ce cas, c'est l'influence de l'irradiance sur le bilan d'énergie foliaire qui dirige la transpiration est non le VPD_l (Jones, 1992). Inversement, s'il est proche de 0 cela signifie que g_b est très élevée et que la transpiration dépend principalement de g_s .

La plupart des mesures d'échanges gazeux au niveau foliaire se font sous des conditions entraînant des conductances de couche limite élevée et donc de fort contrôle des stomates sur la transpiration. Il est donc important de garder à l'esprit que sous des conditions naturelles la régulation des échanges gazeux foliaires par g_s peut être différente de celle observée sous des conditions artificielles de mesure.

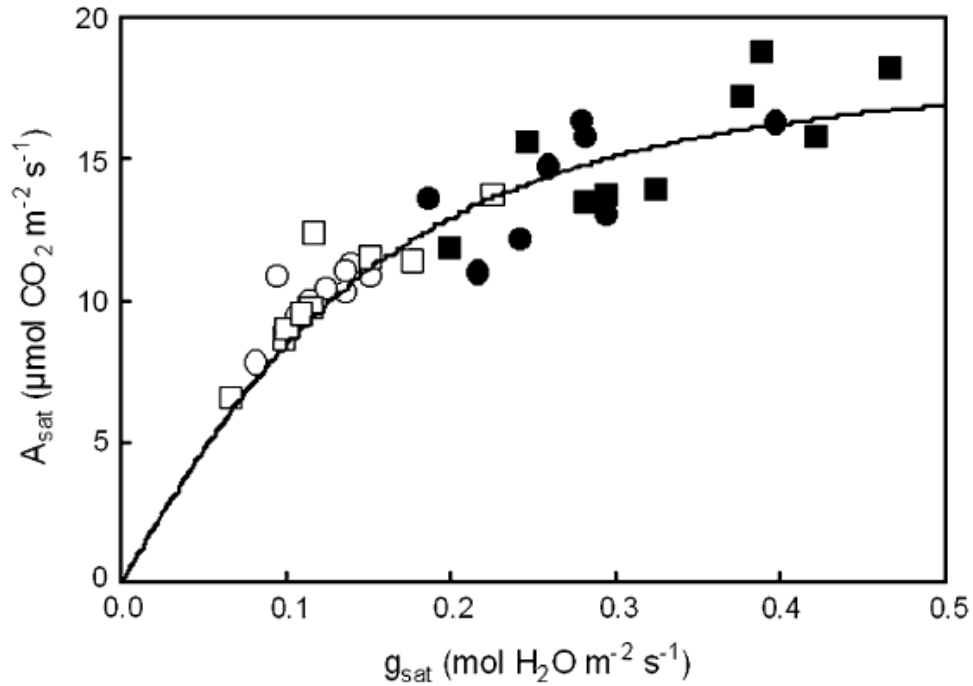


Figure 3: Assimilation nette de CO_2 (A) en fonction de la conductance stomatique à la vapeur d'eau (g_s) sous lumière saturante pour la photosynthèse chez des génotypes de chêne pédonculé (*Quercus robur*) présentant des valeurs de W_i élevées (blancs) ou faibles (noir). (Roussel *et al.*, 2009)

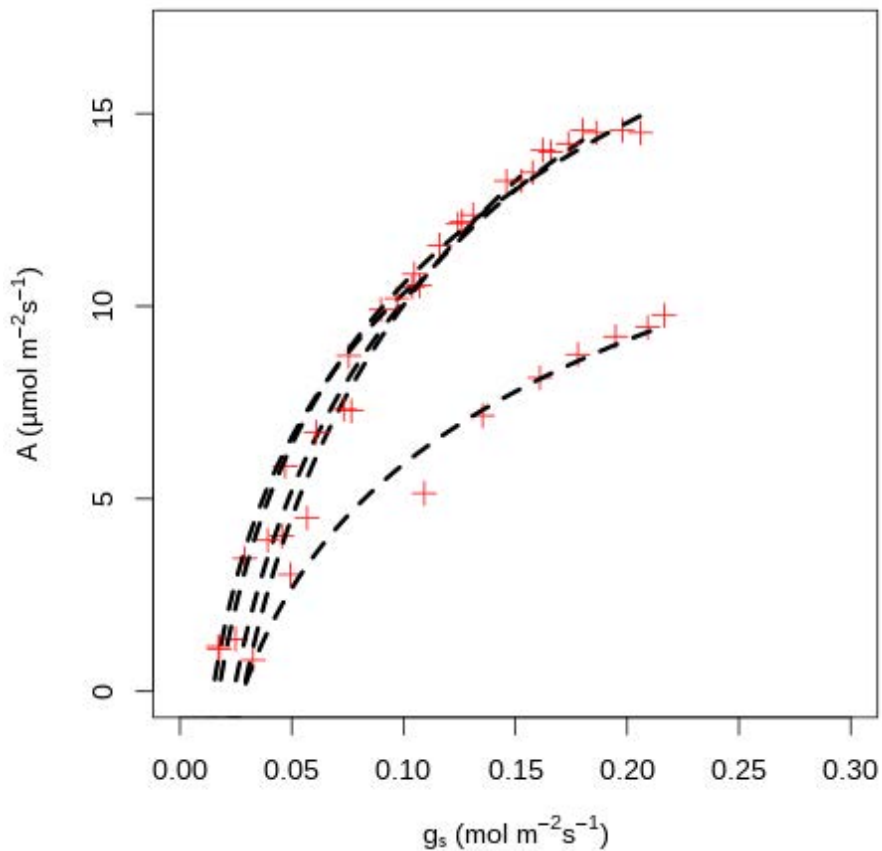


Figure 4: Assimilation nette de CO_2 (A) en fonction de la conductance stomatique à la vapeur d'eau (g_s) de feuilles soumises à différents niveaux d'irradiance (0 à $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sous CO_2 ambiant ($400 \mu\text{mol mol}^{-1}$) et à VPD_i constant (1 kPa) chez 5 chênes pédonculé (*Quercus robur*).

4. Rôle des stomates dans la régulation des échanges de CO₂ et H₂O entre la feuille et l'atmosphère

La plante doit à tout moment faire un compromis entre pertes en eau par transpiration et diffusion du CO₂ nécessaire à la photosynthèse. Ce compromis fait par la plante pose la question du rôle des stomates. Si leur rôle était exclusivement de minimiser les pertes en eau au cours du temps, ils resteraient fermés. À l'inverse, si leur rôle était de maximiser la photosynthèse, ils resteraient ouverts. D'après la théorie de Cowan et Farquhar (1977), les plantes optimisent les pertes en eau sur le long terme, c'est-à-dire en fonction de leur croissance. En faisant l'hypothèse que l'assimilation nette de CO₂ est directement reliée à la croissance, cette optimisation serait visible sur les variations journalières du rapport de l'assimilation nette de CO₂ (A) sur la transpiration (E) que l'on nomme efficacité instantanée d'utilisation de l'eau (WUE). D'après Hari *et al.* (1986) et Vico *et al.* (2011), les variations d' E seraient contrôlées sur le long terme en fonction de WUE qui représente le coût de A . L'étude des variations journalières de l'efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau (W_i) permettrait de mieux comprendre le rôle des stomates dans la régulation de WUE .

Pour identifier la composante génétique de la diversité observée pour W_i , les mesures doivent être réalisées dans des conditions standardisées, ce qui est souvent obtenu sous irradiance saturante. Sous de telles conditions, on peut observer une variabilité intra-spécifique très forte due fréquemment à des différences de g_s (Fig. 3). Cependant, on observe aussi que pour une même feuille la relation entre A et g_s sous différents niveaux d'irradiance n'est pas linéaire, ce qui signifie que W_i varie en fonction du niveau d'irradiance (Fig. 4). De plus, au cours d'un cycle journalier, W_i présente de nombreuses variations dues à la lente réponse temporelle de g_s (Violet-Chabrand *et al.*, 2013b). Les mesures en conditions saturantes ne sont donc pas suffisantes pour caractériser les différences de W_i intégrées dans le temps et observées pour de nombreuses espèces (voir chapitre 1). Les stomates régulent simultanément les échanges de CO₂ et de H₂O, toutefois, la conductance mésophyllienne (g_m) peut aussi limiter la pression partielle de CO₂ au niveau des sites de carboxylation et donc impacter W_i . Ainsi, même avec des capacités photosynthétiques constantes, A peut être modifiée indépendamment de g_s par des variations de g_m (Flexas *et al.*, 2012). Sur la période de développement de la plante, les capacités photosynthétiques varient (feuilles d'ombre et de lumière, effet ontogénique, etc.) et donc W_i évolue. De plus, selon les espèces et les individus, les capacités photosynthétiques peuvent varier (Flood *et al.*, 2011). Les différences de W_i sont donc multifactorielles et nécessitent de détailler leurs causes par une étude plus approfondie de chaque trait impliqué. **Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux réponses temporelles de g_s au cours d'un cycle journalier et à leurs impacts sur W_i . En effet, chez le chêne pédonculé, il semblerait que la diversité de g_s jouerait un rôle plus important dans la diversité des variations journalières de W_i que la diversité de la capacité photosynthétique (Roussel *et al.*, 2009). Pour mettre en évidence une diversité des réponses temporelles de g_s , nous avons choisi d'étudier les différents modèles dynamiques les décrivant.**

).

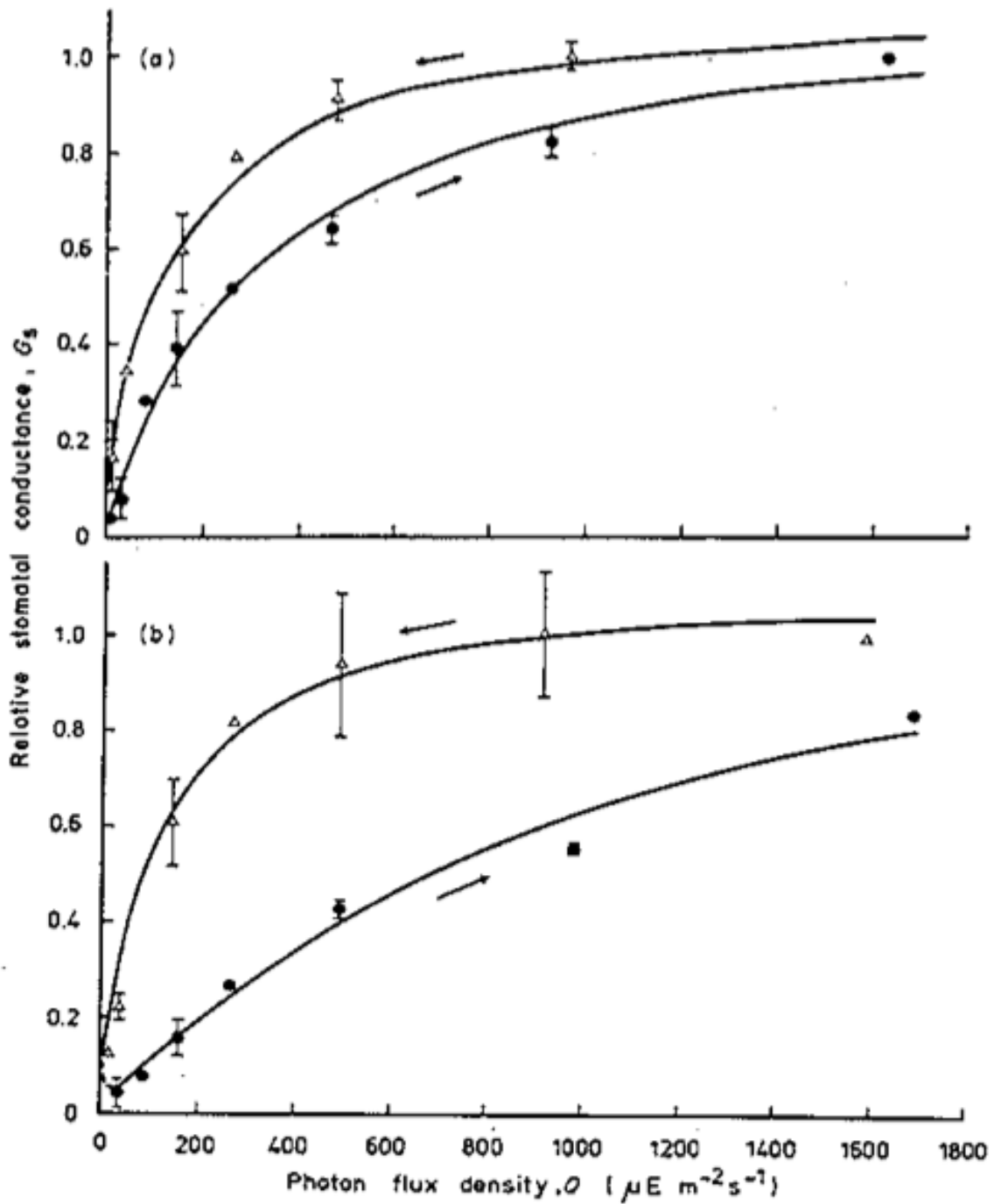


Figure 5: Conductance stomatique relative en fonction de l'irradiance (Photon flux density) dans le cadre (a) d'une augmentation suivie d'une diminution de l'irradiance et (b) d'une diminution suivie d'une augmentation de l'irradiance (Ng et Jarvis, 1980). Température foliaire: 10.2 °C; VPD_i : 0.54 kPa. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard. A chaque niveau d'irradiance, les mesures ont été réalisées après 45 à 60 min de stabilisation.

5. Conséquences de la lente réponse temporelle des stomates

En 1980, Ng et Jarvis constatèrent que lors d'une variation par palier de l'irradiance, les courbes de conductance stomatique (g_s) réalisées en augmentant ou en diminuant l'irradiance ne coïncidaient pas (Fig. 5). De plus, les deux courbes étaient différentes en fonction de l'état initial de la conductance. Ils observèrent aussi que ce phénomène tendait à disparaître en augmentant l'intervalle de temps entre deux variations d'irradiance. Ils en conclurent que la différence entre les deux courbes était due à un effet temporel de la réponse de g_s à l'irradiance. En effet, selon l'intervalle de temps entre deux changements de l'irradiance, g_s n'avait pas le temps d'atteindre son régime permanent. La différence entre deux courbes, si l'on commençait en augmentant ou en diminuant l'irradiance, tient à l'asymétrie de la réponse temporelle de g_s . Ces effets temporels peuvent être qualifiés d'hystérésis de la conductance stomatique. L'hystérésis est définie comme une propriété présentée par un système dont les propriétés à un instant donné dépendent de toute son évolution antérieure et pas seulement des paramètres décrivant le système à cet instant. Cela signifie que la valeur de g_s à un instant donné ne dépend pas uniquement du microclimat à cet instant mais aussi de l'évolution temporelle des conditions auxquels la feuille était soumise.

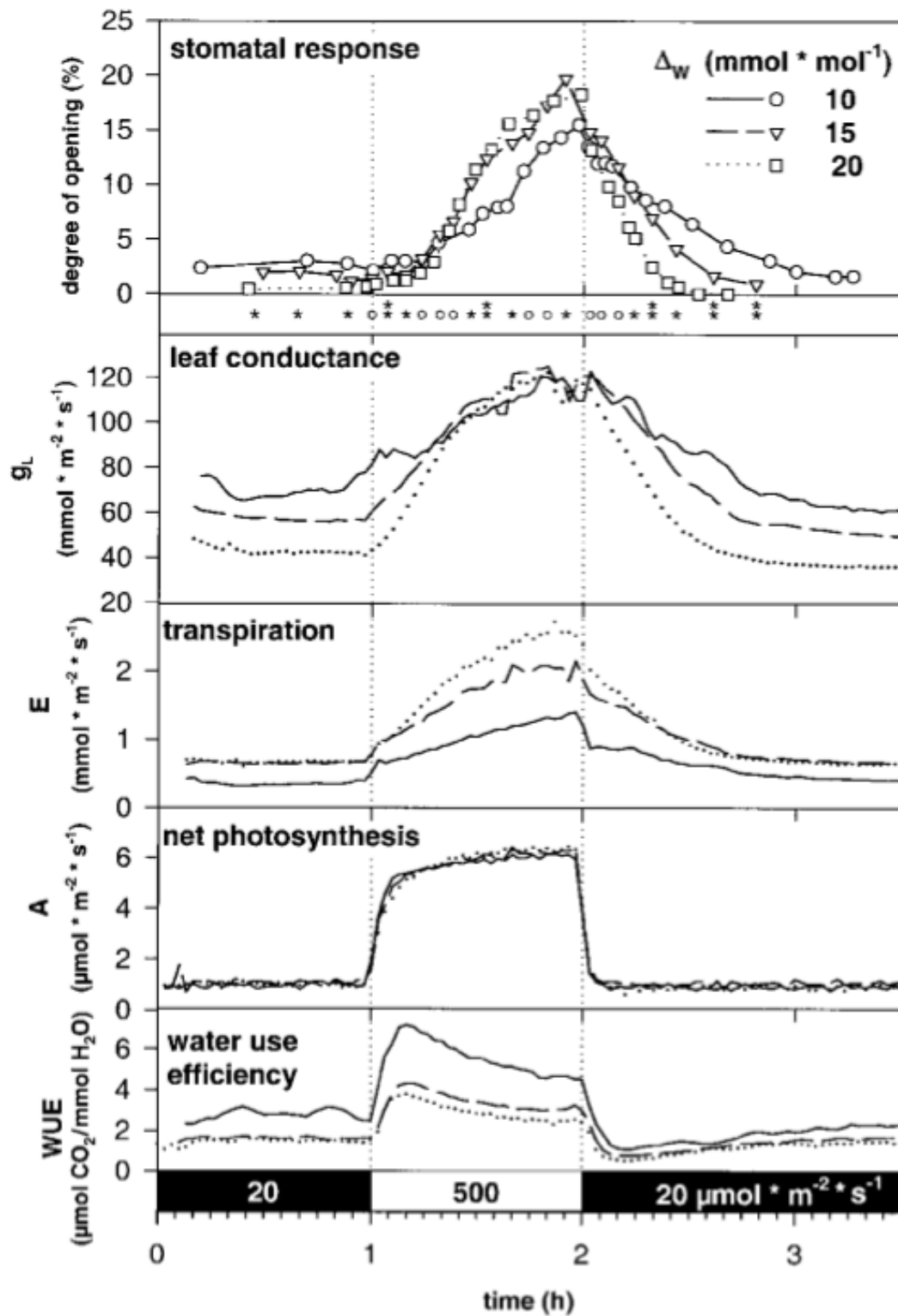


Figure 6: Cinétiques de réponses à une transition brutale de la quasi obscurité ($PPFD$: $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) à une forte irradiance ($PPFD$: $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) du degré d'ouverture des stomates, de la conductance stomatique (g_s), de la transpiration (E), de l'assimilation nette de CO_2 (A) et de l'efficacité instantanée d'utilisation de l'eau (WUE). Le flash de lumière saturante a duré 1 heure. Trois niveaux de déficit de pression de vapeur d'eau ($\Delta_w = VPD_i$) ont été appliqués: 10, 15, 20 mmol mol^{-1} quand la feuille était éclairée et 2 à 5 mmol mol^{-1} à l'ombre avec une température de l'air de 20°C (Kaiser, 2000).

L'approche la plus communément utilisée pour la modélisation des échanges gazeux foliaires considère que g_s atteint instantanément un régime permanent ou « steady state » en équilibre avec le microclimat foliaire. Cette approche de régime permanent est relativement simple à mettre en œuvre en identifiant les valeurs de régime permanent lors de l'établissement de courbes de réponse de g_s à différentes variables environnementales (irradiance, CO_2 ...). Cependant, les processus de régulation stomatique ne sont pas instantanés (Fig. 6) et le décalage observé entre le changement d'une variable environnementale et la réponse de g_s n'est pas prise en charge par les modèles de régime permanent. En effet, les variations de g_s dépendent du délai de perception/transduction du signal et du mouvement des cellules de garde des stomates. La perception du signal lumineux est souvent due à une cascade de réactions enzymatique entraînant un délai avant la réponse effective de la conductance stomatique. L'évolution temporelle de la conductance stomatique dépend de l'accumulation d'ions dans la vacuole (K^+ , Cl^- , Malate²⁻) qui diminue le potentiel hydrique de la cellule de garde et stimule l'absorption d'eau par osmose. Ces processus induisent une augmentation progressive de la turgescence des cellules de garde et donc une ouverture des stomates. Pour modéliser la conductance stomatique à l'échelle journalière, il est donc nécessaire de prendre en compte les différents processus induisant une réponse temporelle tels que la perception du signal, le changement de pression osmotique et le changement de potentiel hydrique. Kirschbaum *et al.* (1988) ont proposé un modèle décrivant ces différents processus pour prédire g_s et dont la réponse temporelle résultante était une sigmoïde. Cependant, l'inconvénient de ce modèle était son nombre élevé de paramètres inter-corrélés (Violet-Chabrand *et al.*, 2013b).

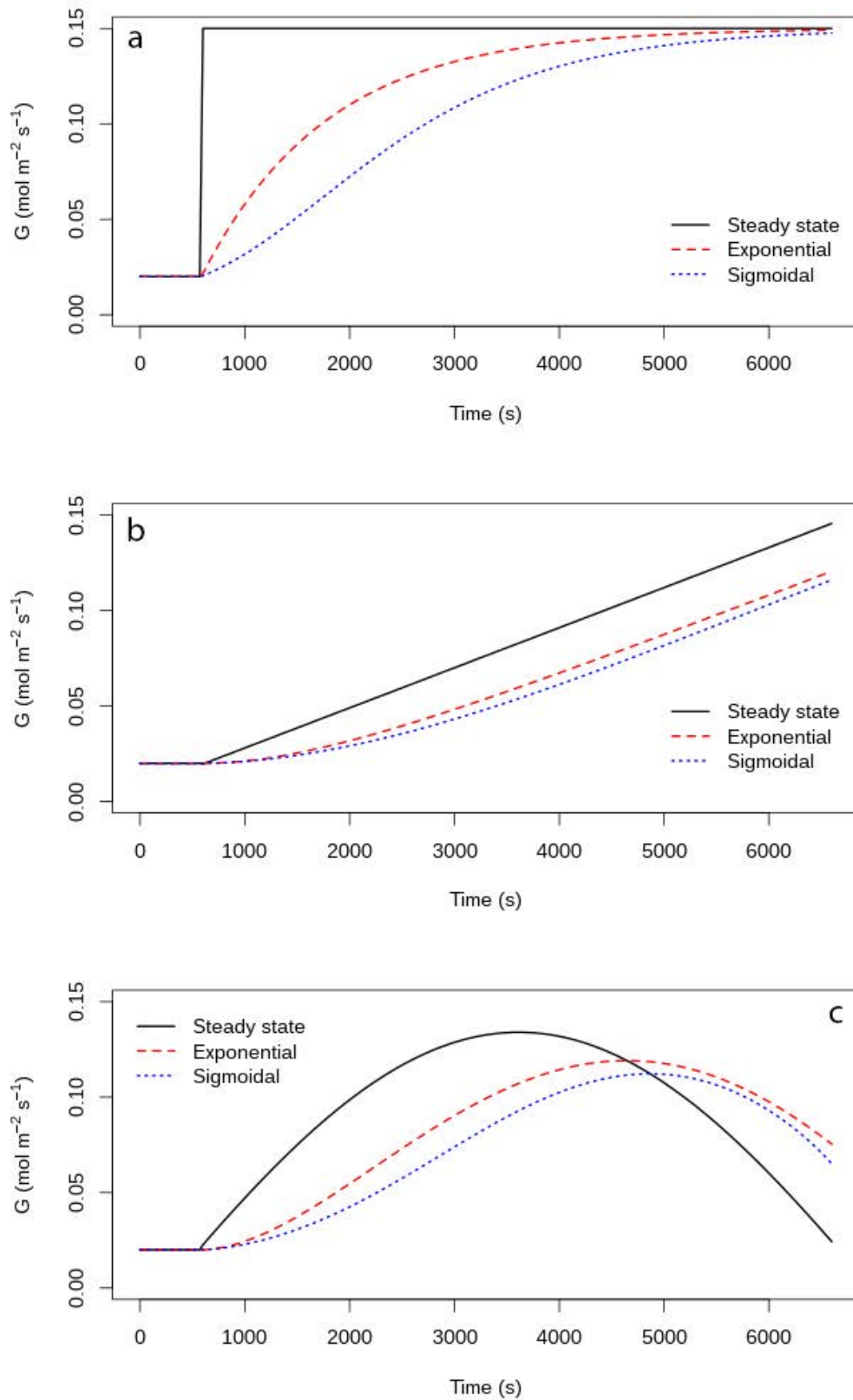


Figure 7: Trois types de modèles décrivant des réponses temporelles de la conductance stomatique à des changements hypothétiques de microclimat. Le modèle steady-state se superpose directement à la variation du microclimat (variation instantanée en **a**, variation linéaire en **b** et variation sinusoïdale en **c**).

La réponse temporelle de g_s impacte la transpiration (E) et l'assimilation nette de CO_2 (A) provoquant des variations transitoires de l'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE) (Fig. 6). Ces variations transitoires dépendent des variations du microclimat et impactent WUE intégré sur une journée complète (Will et Teskey, 1999). Il est donc important d'inclure la réponse temporelle de g_s dans la modélisation des flux d'échange gazeux au niveau foliaire. La figure 7 présente les trois principaux modèles décrivant les réponses temporelles de g_s . Le modèle « steady state » (Fig. 7a) suppose l'établissement instantané d'une nouvelle valeur de régime permanent après une variation d'une variable environnementale induisant une augmentation de la conductance stomatique (ex: augmentation de l'irradiance). Le modèle exponentiel (Fig. 7b) présente une réponse temporelle qui permet de prendre en compte les mécanismes d'ouverture/fermeture liés aux modifications de turgescence des cellules de garde. Le modèle sigmoïdal (Fig. 7c) tient compte du délai de réponse lors de la perception du signal suivie par une phase exponentielle. Le modèle sigmoïdal semble bien le plus complet dans la description des différentes phases de variations de la conductance stomatique. Néanmoins, dans le cas de variations continues ou rapides du microclimat, les modèles exponentiel et sigmoïdal présentent des performances très proches. **L'utilisation d'un modèle tenant compte de la réponse temporelle de g_s devrait donc permettre d'améliorer les prédictions de g_s à l'échelle journalière. Toutefois, pour décrire les réponses temporelles de g_s à l'échelle journalière, il est aussi nécessaire de décrire la réponse de g_s aux différentes variables microclimatiques.**

L'étude des réponses temporelles de g_s à une échelle journalière doit prendre en compte aussi bien la période éclairée que la période nocturne. La période nocturne a été très peu étudiée et pourrait représenter une part non négligeable des pertes en eau journalières (Hosy *et al.*, 2003; Lebaudy *et al.*, 2008; Vialet-Chabrand *et al.*, 2013a).

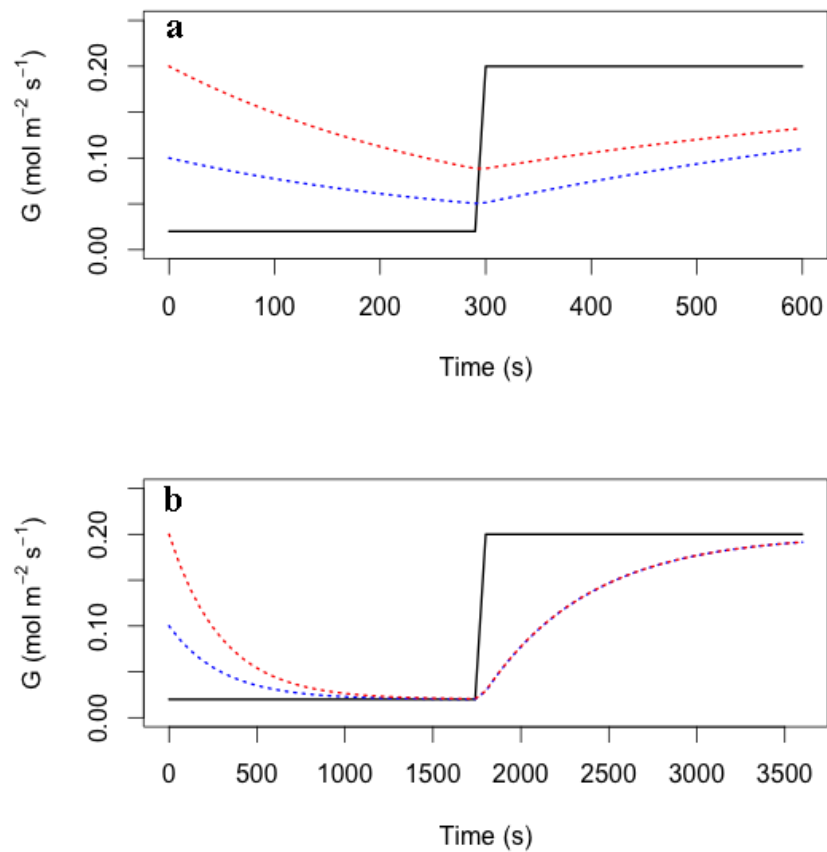


Figure 8: Modélisation de la réponse temporelle de la conductance stomatique (g_s) avec un modèle exponentiel et une variation instantanée d'un facteur microclimatique. En ligne continue noire, une réponse simulée avec un modèle steady-state se superposant directement à la variation du microclimat (G , ligne continue noire) selon différents pas de temps (**a** et **b**). Les courbes rouge et bleue représentent l'évolution temporelle de g_s avec deux conditions initiales différentes mais les mêmes constantes de temps. Dans la figure **a**, le temps avant la variation de microclimat n'est pas suffisant pour atteindre le régime permanent correspondant à la nouvelle condition, et les deux courbes suivent des trajectoires différentes. Les pentes des deux courbes dépendent de la valeur initiale alors que la constante de temps est identique. Dans la figure **b**, le délai avant changement du facteur microclimatique est plus long permettant aux deux courbes d'atteindre un nouveau régime permanent et de ce fait la réponse à la variation de microclimat est identique (courbes confondues).

6. Réponses temporelles de la conductance stomatique et régime permanent

La conductance stomatique (g_s) atteint un niveau de régime permanent sous des conditions environnementales stables, au bout d'un temps dépendant des conditions antérieures (Fig. 8a et b). Au cours de mes expérimentations, les réponses temporelles de g_s suite à une variation instantanée de l'irradiance chez le chêne atteignaient un régime permanent dans un temps compris entre 45 et 120min environs. Cette conductance stomatique en régime permanent ou « steady state » est utilisée pour la modélisation dynamique comme la valeur de consigne (G) à atteindre lors d'une réponse temporelle de g_s sous un microclimat donné. A la différence des modèles « steady state » qui considèrent que chaque valeur de g_s équivaut à un régime permanent en équilibre avec l'environnement, les modèles incluant une réponse temporelle considèrent que c'est la cible G qui change en fonction du microclimat. La valeur courante de g_s dépend elle de l'historique des variations précédentes et de la nouvelle valeur cible à atteindre. La nouvelle cible sera atteinte si les conditions restent stables durant un temps suffisant (Fig. 8b).

En conditions naturelles, les variations microclimatiques (irradiance, température, VPD_i ,...) sont nombreuses et continues, ce qui entraîne une variation quasi continue de la cible G (Fig. 7c). L'utilisation de données de cinétiques journalières pour calibrer un modèle « steady state » introduit un biais car la relation entre les variations de l'environnement et celle de g_s est partiellement découplée par la réponse temporelle des stomates. Ce problème peut être résolu par l'introduction des réponses temporelles de g_s dans le modèle, telles que décrites par le modèle exponentiel ou sigmoïdal.

Pour calibrer un modèle dynamique, une des méthodes consiste à mesurer g_s en régime permanent sous différentes conditions environnementales puis d'estimer les constantes de temps en régime transitoire (Violet-Chabrand *et al.*, 2013b). Par exemple, sous différents niveaux d'irradiance, on peut établir une relation entre les cibles G et le niveau d'irradiance. La même démarche peut être appliquée à toutes les variables influençant g_s .

L'estimation des constantes de temps décrivant la réponse temporelle de g_s nécessite l'ajustement d'un modèle sur des données observées. En effet, comme décrit précédemment, la réponse temporelle de g_s dépend du niveau initial et final de g_s empêchant une estimation graphique fiable de la constante de temps. La réponse temporelle de g_s à un changement instantané de l'irradiance peut servir à l'ajustement du modèle exponentiel ou sigmoïdal et donc des constantes de temps. On peut donc facilement obtenir tous les paramètres nécessaires à la modélisation dynamique de g_s en conditions contrôlées.

Il est donc possible d'associer les modèles décrivant g_s en régime permanent en fonction du microclimat avec les modèles de réponses temporelles de g_s . On obtiendrait alors un modèle dynamique pour décrire g_s introduisant de nouvelles hypothèses sur les réponses de g_s aux variables microclimatiques qui pourrait être confronté aux récentes avancées sur le sujet.

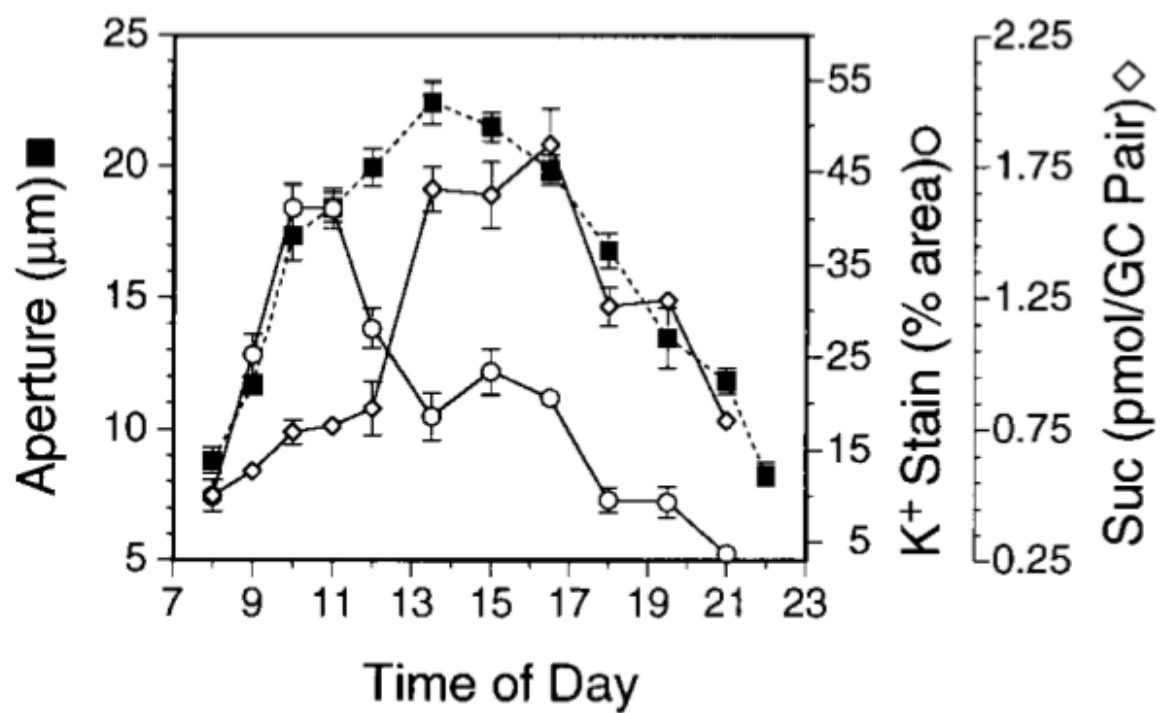


Figure 9: Cinétique diurne de l'ouverture stomatique, du contenu en K⁺ et en saccharose des cellules de garde de *Vicia faba* (Talbot & Zeiger, 1998).

7. Réponse de la conductance stomatique aux variations du microclimat

Les expérimentations décrites dans ce document ont été réalisées en conditions non limitantes en eau et en nutriments. L'effet d'un stress hydrique sur g_s ne sera donc pas abordé.

7.1. Conductance stomatique de jour

7.1.1. Lien entre photosynthèse et conductance stomatique

La conductance stomatique (g_s) montre très souvent une relation forte avec la photosynthèse (A) (Radin *et al.*, 1988; Hetherington et Woodward, 2003). Cette relation entre A et g_s pourrait être uniquement due à la covariation de ces deux variables en réponse à un signal lumineux. Cependant, certains auteurs ont suggéré que les variations de g_s étaient sous la dépendance des variations de CO_2 à l'intérieur de la feuille (Roelfsema *et al.*, 2002, 2006). Le CO_2 à l'intérieur de la feuille étant lui-même dépendant de A et g_s , il en résulterait un couplage fort entre ces deux processus. Cependant, la question selon laquelle le signal CO_2 est perçu directement par les cellules de garde (Roelfsema *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008) ou par les cellules mésophylliennes (Hedrich et Marten, 1993; Mott *et al.*, 2008) est encore sujette à débats. Ainsi, une augmentation de l'assimilation de CO_2 par les cellules mésophylliennes ou une diminution du CO_2 de l'air entraîneraient une baisse du CO_2 à l'intérieur de la feuille et seraient un signal pour l'augmentation de g_s . Inversement, une augmentation du CO_2 dans l'air ou dans la feuille, à cause de la respiration par exemple, entraînerait une diminution de g_s (Kim *et al.*, 2010; Goh *et al.*, 2011). Dans ce cadre, on suppose que la lumière (bleue ou rouge) participerait à la régulation de g_s par l'intermédiaire de A et des variations de CO_2 résultantes. Récemment, Fujita *et al.* (2013) ont suggéré que le signal, résultant d'une variation du CO_2 , issu des cellules mésophylliennes et à destination des cellules de garde transiterait par l'apoplaste. Néanmoins, de nombreux points restent à éclaircir sur les différents mécanismes responsables de la réponse au CO_2 et sur les signaux provenant des cellules mésophylliennes et des cellules de garde (Kim *et al.*, 2010).

7.1.2. Sensibilité à la lumière bleue: rôle des phototropines

Une deuxième voie d'activation de l'ouverture stomatique indépendante de l'activation par la photosynthèse a été identifiée (Iino *et al.*, 1985; Kinoshita *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2010). En effet, il existe des récepteurs (phototropines: phot1 et phot2) dans les cellules de garde sensibles à la lumière bleue (Kinoshita *et al.*, 2001; Briggs et Christie, 2002; Shimazaki *et al.*, 2007). La zéaxanthine serait aussi impliquée dans la réponse à la lumière bleue mais son rôle est encore sujet à débat (Zeiger et Zhu, 1998; Talbott et Shmayevich, 2003). Ces récepteurs peuvent être activés par de faibles quantités de lumière bleue et induisent une ouverture stomatique. De plus, cette réponse est amplifiée en présence de lumière rouge dépendant de l'activité des chloroplastes des cellules de garde (Assmann, 1988; Shimazaki *et al.*, 2007). Une faible quantité de lumière bleue contribue peu à une augmentation de A mais entraîne souvent une variation importante de g_s ce qui se traduit par une diminution de W_i . Durant les premières heures de la journée et en fin de soirée, la proportion de lumière bleue est plus importante (Hughes *et al.*, 1984). Cependant la réponse à la lumière bleue se produirait surtout le matin et induirait une ouverture rapide des stomates levant ainsi une partie de la limitation de A par g_s (Lawson, 2009; Košvancová-Zitová *et al.*, 2009).

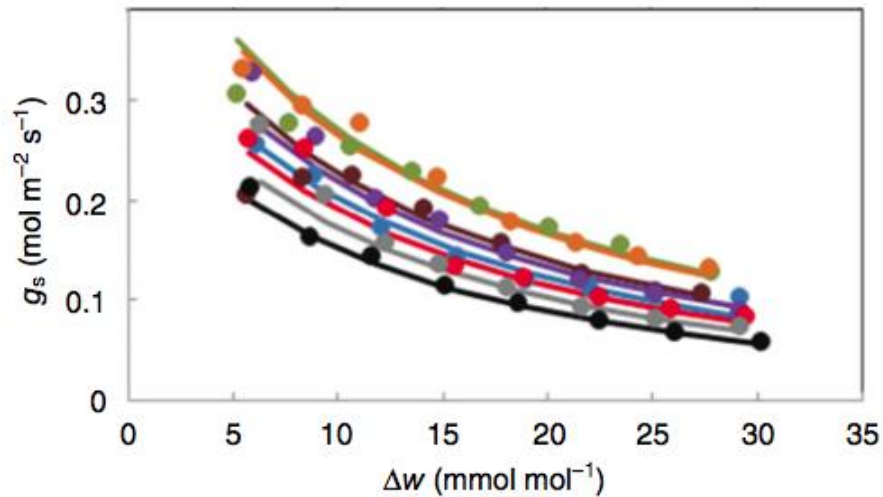


Figure 10: Conductance stomatique (g_s) en fonction du déficit de pression partielle de vapeur d'eau entre la feuille et l'air (Δw) chez *Nerium oleander*. Les points montrent les données mesurées, et les lignes montrent les simulations du modèle de Mott et al (2013). Chaque jeu de données représente une feuille différente soumise à une irradiance entre 100 et 800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, et une pression partielle en CO_2 entre 150 et 800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$.

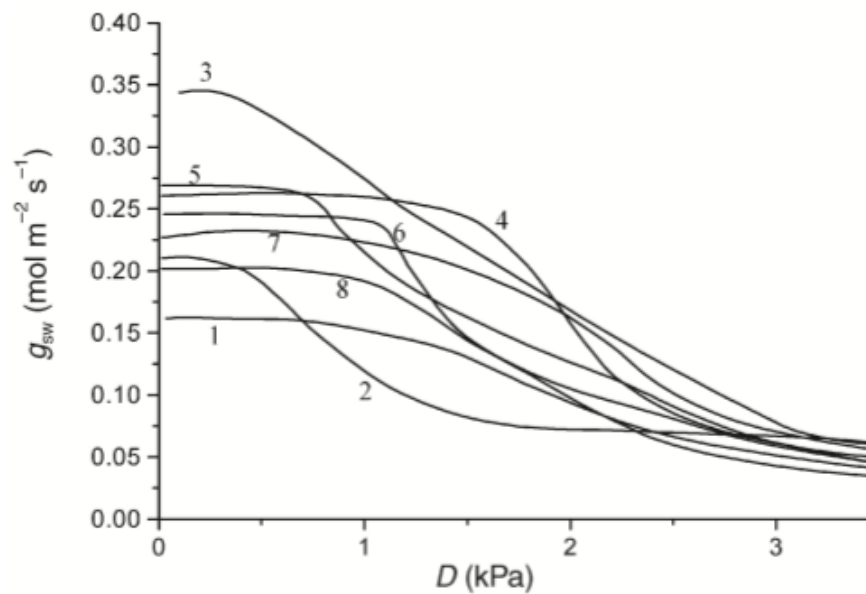


Figure 11: Réponse de la conductance stomatique (g_s) au déficit de pression de vapeur d'eau entre la feuille et l'air (D) chez des arbres et arbustes forestiers du nord-ouest du Pacifique (USA): (1) *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco; (2) *Tsuga heterophylla* (Raf.) Sarg.; (3) *Cornus nuttallii* Aud.; (4) *Acer macrophyllum* Pursh; (5) *Castanopsis chrysophylla* (Dougl.) A. DC.; (6) *Acer circinatum* Pursh; (7) *Rhododendron macrophyllum* G. Don; (8) *Gaultheria shallon* Pursh. (Franks, 2004)

Cette différence de réponse entre le début et la fin de la journée serait due aux changements d'osmotica responsables de l'ouverture stomatique au cours de la journée. En effet, l'impact de la lumière bleue sur g_s dépend de la concentration en K^+ et Cl^- et/ou de la synthèse de malate²⁻ à partir de squelettes carbonés dérivés de l'amidon (Outlaw et Lowry, 1977; Outlaw et Manchester, 1979). La concentration de ces différents éléments est plus élevée en début de journée ce qui pourrait expliquer un effet plus important de la lumière bleue durant cette période (Fig. 9) (Talbot et Zeiger, 1996, 1998). La réponse de g_s à la lumière bleue saturant à de faibles niveaux d'irradiance (Shimazaki *et al.*, 2007), durant la journée la réponse de g_s à l'irradiance dépend principalement de l'effet de la lumière rouge (Zeiger et Field, 1982).

7.1.3. Sensibilité de la conductance stomatique au déficit de pression de vapeur d'eau (VPD_i) et à la température

Les stomates répondent à la fois au déficit de pression de vapeur d'eau entre la feuille et l'air (VPD_i , Fig. 10) et à la température foliaire mais il n'y a pas de mécanismes clairement identifiés pour ces réponses. Cette absence d'explication est d'autant plus handicapante pour des efforts de modélisation que ces réponses jouent un rôle essentiel dans le contrôle des variations de conductance stomatique (g_s) au cours d'un cycle journalier sous un environnement naturel (Schulze *et al.*, 1972, 1973; Fredeen et Sage, 1999). Deux types de mécanismes ont été proposés en faisant l'hypothèse d'une régulation stomatique en fonction de la transpiration. Le premier prédit une fermeture des stomates due à un fort taux de transpiration au niveau des cellules de gardes comparé aux cellules épidermiques qui l'entourent. Cela réduit le potentiel hydrique des cellules de garde proportionnellement au VPD_i et provoque une fermeture des stomates quand le VPD_i augmente. Selon les interprétations, la transpiration intervient au travers de la cuticule recouvrant plus ou moins les cellules de garde (Lange *et al.*, 1971; Maier-Maercker, 1983) ou par la surface interne des cellules de garde (Dewar, 2002). Le deuxième mécanisme fait l'hypothèse d'un signal de fermeture des stomates qui serait généré dans le mésophylle ou dans l'épiderme en réponse à un faible potentiel hydrique ou à une faible pression de turgescence. Ce signal tendrait à la fermeture des stomates en réponse à une diminution du potentiel hydrique foliaire due à un fort taux de transpiration (Buckley *et al.*, 2003).

La plupart des modèles décrivent la réponse au VPD_i par une exponentielle décroissante (Fig. 10) (Oren *et al.*, 1999; Mott et Peak, 2012). Néanmoins, certains modèles (Franks, 2004) et certaines observations suggèrent plutôt une forme sigmoïdale (Fig. 11). Cette différence de forme influe fortement sur la valeur de g_s prédite par les modèles sous un faible VPD_i . Néanmoins, les mesures de g_s à faible VPD_i sont très difficiles à réaliser du fait des risques de condensation pour le matériel de mesure ce qui explique le manque de données dans la littérature.

7.1.4. Règles de priorité des réponses de la conductance stomatique à différentes variables environnementales

En plus des interactions entre les différentes variables environnementales, Aasamaa et Söber (2011) ont identifié des règles de priorité pour la réponse de g_s . Ainsi, g_s réagit en priorité aux changements de potentiel hydrique foliaire ce qui a aussi été observé au cours de cinétiques diurnes par Dzikiti *et al.* (2007). Ensuite, la deuxième variable environnementale d'importance dans la régulation de g_s correspond au VPD_l , suivie à égalité par la lumière et le CO_2 . On note ainsi la prédominance de la régulation stomatique en fonction des pertes en eau. Dans le cas d'un plant bien irrigué, le VPD_l est donc la variable environnementale dominante dans la réponse de g_s . Ces règles de priorité devraient aussi s'appliquer au cours d'une journée.

7.2. Conductance stomatique de nuit

La conductance stomatique de nuit (g_{night}) est significative chez de nombreuses espèces et présente une large diversité inter et intra-spécifique (Musselman et Minnick, 2000; Snyder, 2003). Elle répond aux variables environnementales comme le VPD_l , la température et la vitesse du vent (Caird *et al.*, 2007). Il en résulte une transpiration nocturne qui diminue l'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE) intégrée sur la journée complète. L'avantage que procure une transpiration nocturne pour la plante est encore sujet à débat mais le maintien d'une ouverture stomatique est un mécanisme actif qui nécessite de l'énergie. La plante doit donc en retirer un certain bénéfice en termes de croissance si l'on considère la théorie d'optimisation de Cowan et Farquhar (1977). De plus, lors de la diminution de l'irradiance en fin de journée, g_s décrit une lente réponse temporelle qui accroît les pertes en eau par transpiration en absence de photosynthèse (Hosy *et al.*, 2003; Lebaudy *et al.*, 2008; Vialet-Chabrand *et al.*, 2013b).

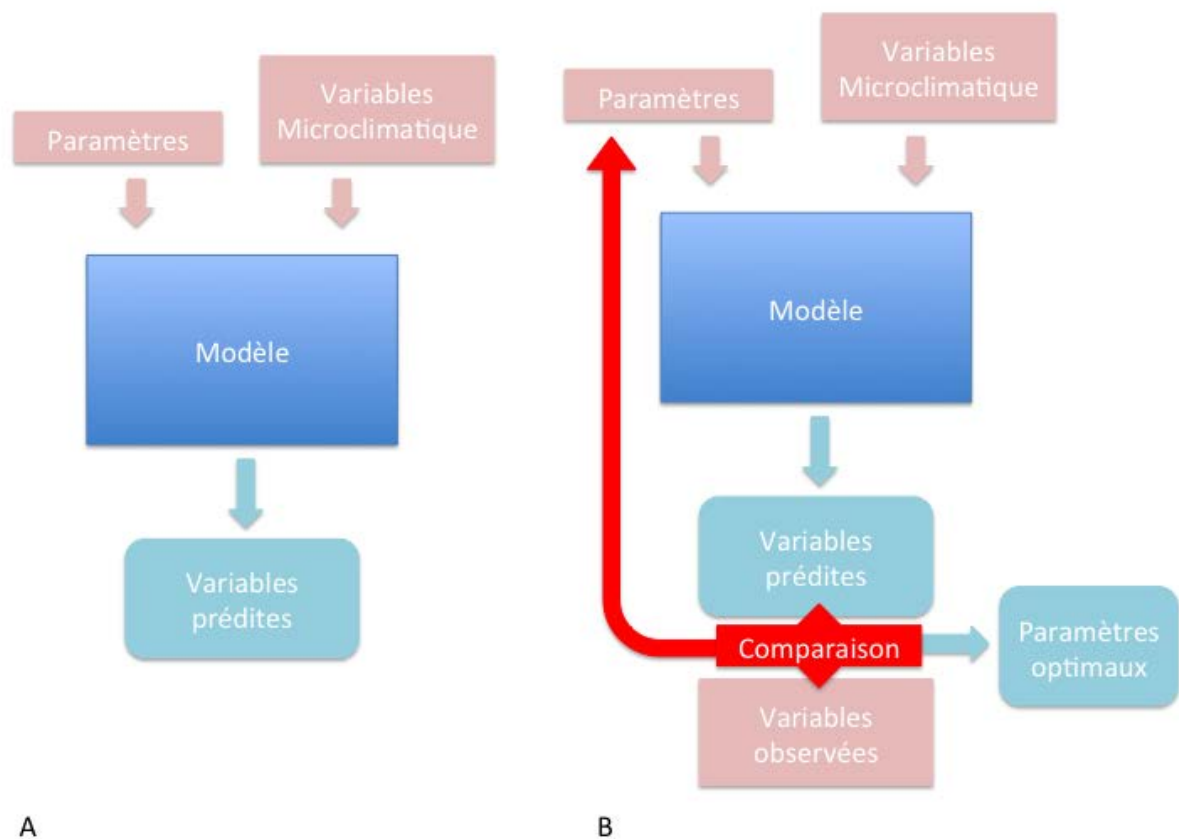


Figure 12: Comparaison entre démarches de modélisation traditionnelle (A) et inversée (B). Lors de la modélisation inversée, les variables observées sont comparées aux variables prédites par le modèle. Cette comparaison permet d'établir si le jeu de paramètres utilisé permet de reproduire avec justesse les données observées. Un processus itératif permet alors de converger vers des jeux de paramètres optimaux, compte tenu des données observées et du modèle utilisé.

8. Modélisation inversée: un accès à la diversité des paramètres d'échanges gazeux

La modélisation permet habituellement de décrire des phénomènes naturels tels que la conductance stomatique (g_s). Elle permet alors de prédire g_s en fonction de paramètres prédéfinis et de conditions environnementales données au cours du temps (Fig. 12A). Cependant, cette utilisation de la modélisation n'est pas la seule possible. En effet, au lieu d'essayer de prédire g_s , on peut aussi ajuster les paramètres du modèle de telle façon que l'écart entre les données observées et modélisées soit le plus petit possible. On obtient alors un jeu de paramètres correspondant aux données observées et dépendant du modèle utilisé (Fig. 12B). Cette démarche permet d'avoir accès à un grand nombre de paramètres qui auraient nécessité une démarche expérimentale plus conséquente s'ils avaient été mesurés séparément. De plus, l'ajustement d'un modèle sur plusieurs espèces/individus/génotypes donne alors accès à la diversité inter et/ou intra spécifique des paramètres.

Une telle démarche nécessite de définir: (i) un ou plusieurs modèles à tester et (ii) une procédure d'ajustement des paramètres. Le choix du modèle est important car ses performances impactent les valeurs des paramètres et donc les différences relatives entre plusieurs ajustements. Dans le cas d'un modèle décrivant fidèlement les données mesurées, les différences de paramètres sont alors uniquement dues aux différences entre individus. Pour l'ajustement des paramètres, l'inférence bayésienne présente de nombreux avantages tels que la possibilité d'ajuster simultanément un grand nombre de paramètres, une description des valeurs possibles des paramètres (et pas uniquement une valeur optimale) (Dietze *et al.*, 2012) et la possibilité d'intégrer différentes échelles de variabilité (ex: génotype, traitement...) directement dans un modèle (Van Oijen *et al.*, 2005; Patrick *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2011).

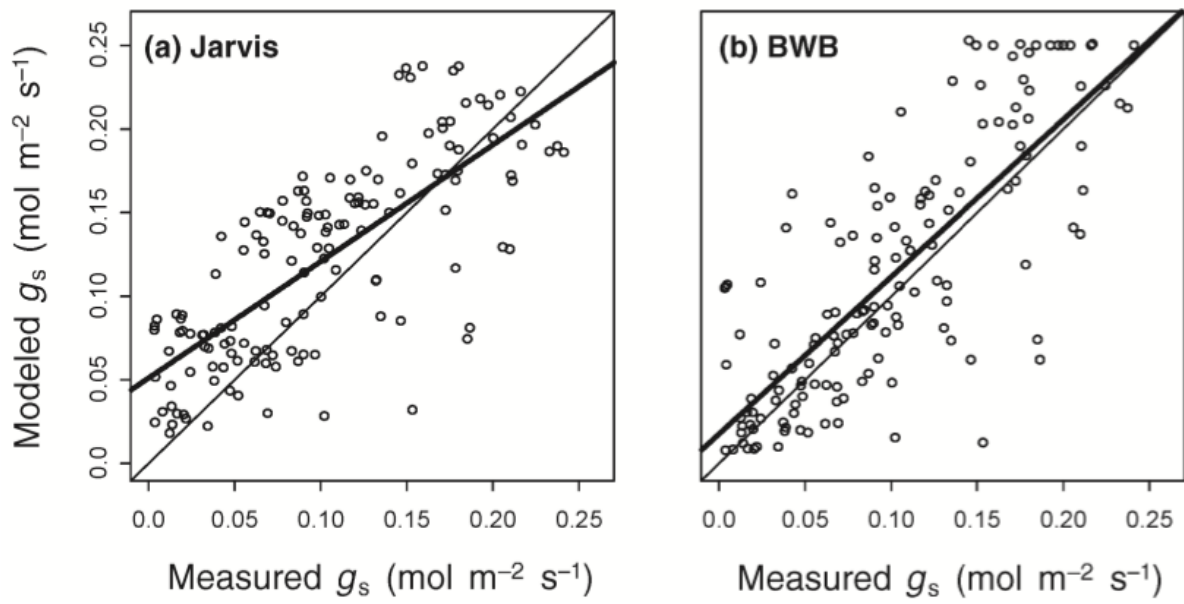


Figure 13: Comparaison de la conductance stomatique (g_s) modélisée et observée durant des cinétiques journalières (pas de temps: 1.5 heures) réalisées une fois par mois de mai à septembre avec le modèle de Jarvis ($R^2=0,57$; $\text{RMSE}=0.048$) et de Ball (BWB, $R^2=0,62$; $\text{RMSE}=0.048$) (Misson *et al.*, 2004). La fine ligne représente la relation 1:1 et la ligne en gras la ligne de régression entre les observations et les simulations.

Modélisation de la conductance stomatique

1. Principaux modèles décrivant la conductance stomatique en régime permanent

Il existe de nombreux modèles de régime permanent (steady state) décrivant la conductance stomatique en fonction des variations de l'environnement. Toutefois, les modèles de Jarvis (1976) et de Ball *et al.* (1987) sont largement utilisés à différentes échelles et représentatifs de leurs nombreux dérivés (Damour *et al.*, 2010).

1.1. Jarvis (1976)

Le modèle de Jarvis fait l'hypothèse que les variations de g_s dépendent du niveau d'irradiance et que les autres variables environnementales modifient cette valeur à l'équilibre indépendamment les unes des autres. Il décrit cette idée sous la forme d'un modèle multiplicatif où la fonction décrivant la réponse à l'irradiance varie entre 0 et une conductance stomatique maximale (g_{max}) et où les autres fonctions de réponse sont standardisées entre 0 et 1:

$$g_s = f_1(PPFD) \cdot f_2(T_f) \cdot f_3(VPD_l) \cdot f_4(C_a) \cdot f_5(\psi_f) \quad 4.$$

où les fonctions f décrivent les variations de g_s en fonction de PPFD: la densité de flux de photons, de T_f : la température foliaire, du VPD_l : déficit de pression de vapeur d'eau entre la feuille et l'air, C_a : la pression partielle de CO_2 dans l'air et ψ_f : le potentiel hydrique foliaire.

Néanmoins, le grand nombre de paramètres et l'absence d'interaction entre eux rend le modèle difficilement paramétrable et généralisable à différentes conditions environnementales (Fig. 13a; Misson *et al.*, 2004). De plus, en l'état actuel des connaissances, l'hypothèse d'indépendance des variables environnementales n'est plus vérifiée. En effet, les réponses de g_s à l'irradiance et au CO_2 font intervenir des mécanismes de réponse communs (Mott *et al.*, 2008; Fujita *et al.*, 2013), de même pour celle décrivant la réponse à la température foliaire et au VPD_l (Peak et Mott, 2011; Mott et Peak, 2012). Il reste aussi à éclaircir l'influence du spectre lumineux (surtout les longueurs d'onde rouge et bleue) sur g_s au cours d'un cycle journalier. De plus, ce modèle ne prend pas en compte les règles de priorité de réponses de g_s aux variables environnementales identifiées par Aassamaa *et al.* (2011).

L'approche utilisée par Jarvis (1976) manque donc d'une base mécaniste actualisée de la réponse de g_s aux différentes variables environnementales. Elle permettrait de réduire le nombre de paramètres utilisés par le modèle et faciliterait son utilisation.

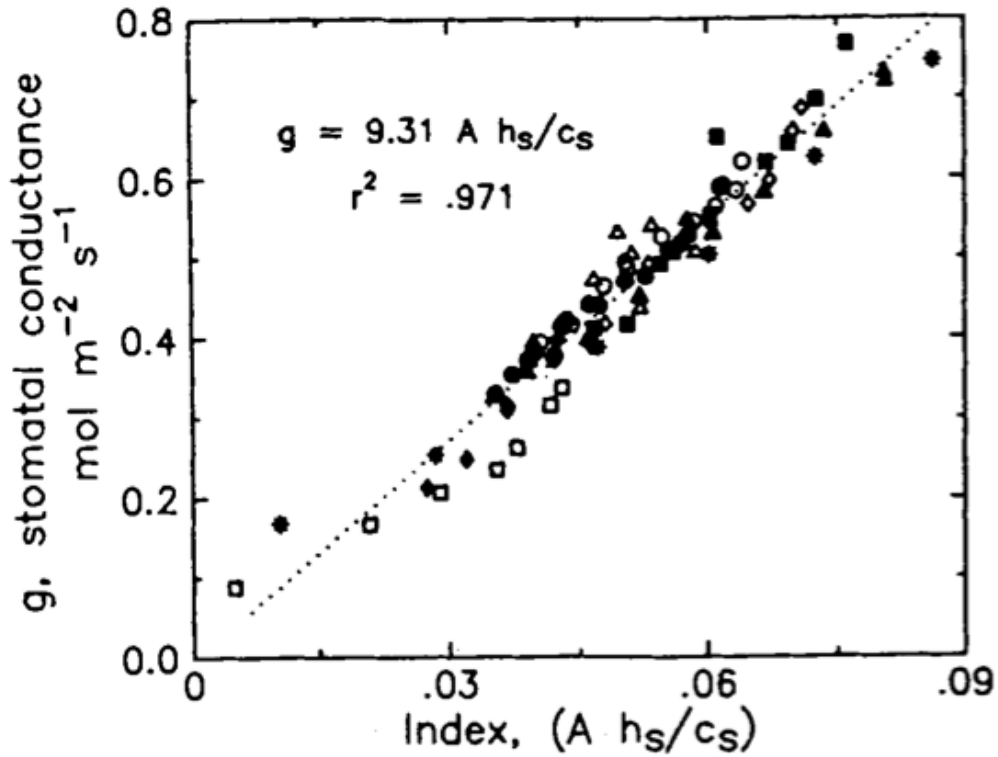


Figure 14: Modèle empirique simple de conductance stomatique (g_s) en fonction d'un index représentant le produit de l'assimilation nette de CO_2 (A) et de l'humidité relative à la surface de la feuille (h_s) divisé par la fraction molaire de CO_2 à la surface de la feuille (C_s) chez *Glycine max*. La ligne en pointillés représente la régression linéaire des données. (Ball *et al.*, 1987)

1.2. Ball (1987)

Le modèle de Ball *et al.* (1987) utilise la relation forte entre A et g_s décrite précédemment pour prédire g_s (Fig. 14):

$$g_s = g_0 + a \cdot A \cdot \frac{HR}{C_a} \quad 5.$$

ou g_0 représente une conductance résiduelle à l'obscurité, a un coefficient empirique, A l'assimilation nette de CO_2 et HR l'humidité relative. Les performances de ce modèle sont similaires à celle du modèle de Jarvis (Fig. 13b) mais il présente l'avantage d'une paramétrisation aisée du fait d'un faible nombre de paramètres. Néanmoins, au contraire du modèle de Jarvis, ces paramètres sont purement empiriques et très sensibles à la variance résiduelle.

Cette version a été améliorée sur plusieurs points par Leuning (1995):

$$g_s = g_0 + a \cdot \frac{A}{\left(1 + \frac{VPD_l}{VPD_0}\right) \cdot (C_a - \Gamma)} \quad 6.$$

Les modifications concernent une réponse au VPD_l plutôt qu'à l'humidité relative. De plus, l'introduction d'un point de compensation au CO_2 (Γ) a permis d'améliorer les prédictions pour les faibles pressions partielles de CO_2 où A est nulle quand C_a est égale à Γ . Néanmoins, ces améliorations ne suffisent pas à apporter dans tous les cas de meilleurs performances que le modèle de Ball original (Medlyn *et al.*, 2011).

Plusieurs critiques peuvent être faites sur ce modèle, comme par exemple le paramètre g_0 qui ne représente pas la conductance stomatique nocturne mais l'intercepte de la relation entre g_s et $A_{net} \cdot \frac{HR}{C_a}$. En effet, en absence de photosynthèse les prédictions du modèle ne peuvent plus reproduire correctement les variations de g_s observées à l'obscurité (Barbour et Buckley, 2007). De plus, utiliser une relation linéaire pour décrire la relation entre A et g_s se traduit par l'hypothèse d'une W_i moyenne quasi constante durant la journée. Or W_i présente des variations fines en réponse à des variations rapides de l'environnement (Kaiser, 2000). Cette relation fait aussi l'hypothèse d'une conductance mésophyllienne (g_m) infinie où chaque variation de A correspond à une variation de g_s . Or de nombreuses études concluent à de possibles variations de conductance mésophyllienne en fonction de l'environnement qui découplerait les variations de A et g_s (ex la lumière: Flexas *et al.*, 2012).

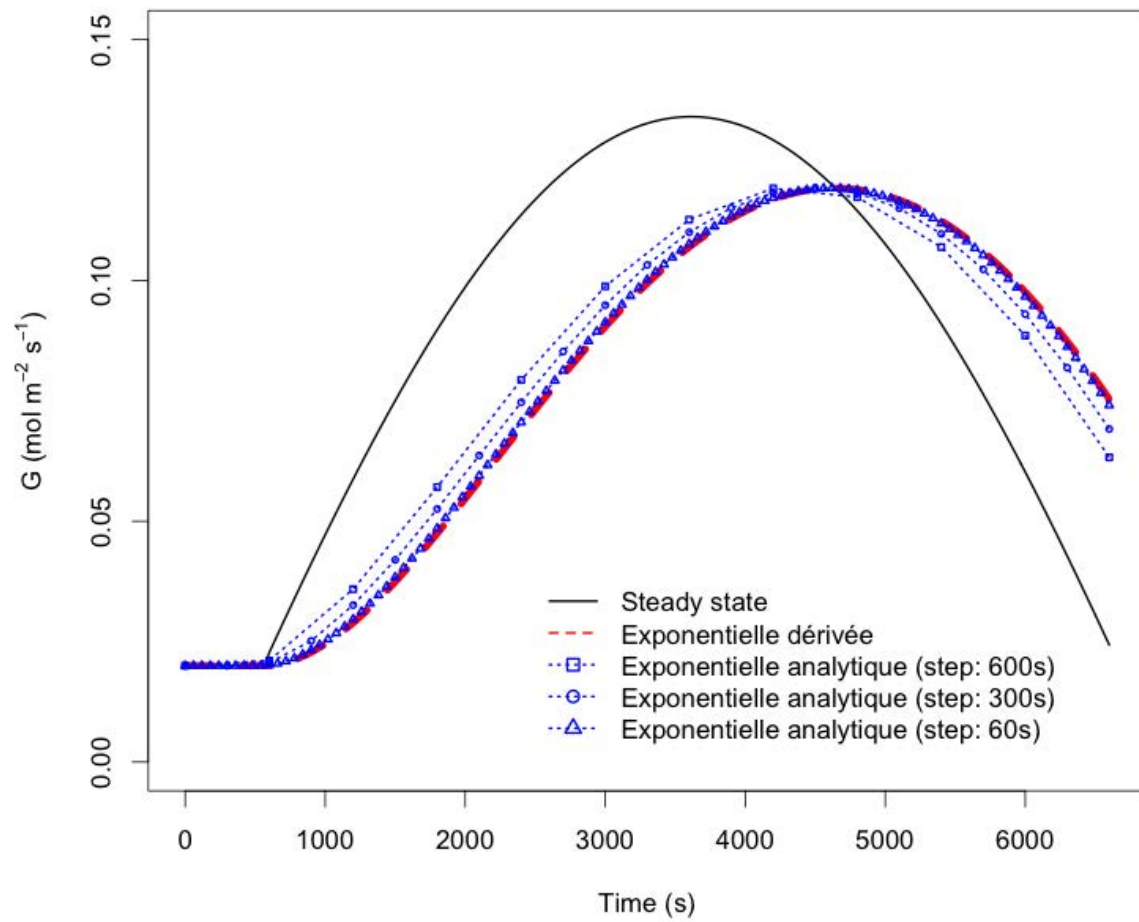


Figure 15: Effet du pas de temps sur les simulations du modèle exponentiel analytique de conductance stomatique. L'erreur de prédiction augmente avec le pas de temps du fait de l'approximation selon laquelle la cible en régime permanent (G) reste constante entre deux points successifs. La courbe en steady-state représente l'influence de l'environnement sur la cible à l'équilibre.

2. Modèles dynamiques décrivant la conductance stomatique

2.1. Equations analytiques décrivant la réponse temporelle

Les équations analytiques décrivent directement les variations temporelles de la conductance stomatique (g_s) en fonction du temps. On dénombre deux principaux types de modèle: le modèle exponentiel et le modèle sigmoïdal.

2.1.1. Modèle utilisant une réponse temporelle exponentielle

Le modèle exponentiel est défini par:

$$g_s = G + [g_0 - G] \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad 7.$$

ou G est la cible à l'équilibre de g_s , g_0 est la valeur initiale de g_s à $t=0$ et τ est une constante de temps. Par définition, τ représente le temps nécessaire pour atteindre 63% de la variation entre g_0 et G .

Dans la figure 15, j'ai généralisé ce modèle pour tenir compte de la variation continue de G et montrer l'impact du pas de temps choisi entre chaque point de mesure:

$$\begin{cases} g_s(t=0) = G_{(t=0)} \\ g_s(t) = G_t + [g_s(t^{-1}) - G_t] \cdot \exp\left(-\frac{(t - t^{-1})}{\tau}\right) \end{cases} \quad 8.$$

Ce modèle nécessite donc de définir un pas de temps entre t^{-1} et t qui impacte la mise à jour du paramètre G et donc la variation de g_s au cours du temps.

2.1.2. Modèle utilisant une réponse temporelle sigmoïdale

Le modèle sigmoïdal que j'ai développé, intègre un délai de réponse par rapport au modèle exponentiel:

$$g_s = (G - r_0) \cdot \exp\left(-\exp\left(\frac{1}{k} \cdot (\lambda - t) + 1\right)\right) + r_0 \quad 9.$$

ou G est la cible de g_s à l'équilibre, r_0 représente la valeur initiale de la variation de la sigmoïde, k est une constante de temps et λ le délai de réponse de g_s .

2.2. Equations différentielles décrivant la réponse temporelle

2.2.1. Modèle utilisant une réponse temporelle exponentielle

Le modèle exponentiel peut s'écrire sous la forme d'une équation différentielle qui décrit les variations de g_s en fonction du temps:

$$\frac{dg_s}{dt} = \frac{(G - g_s)}{\tau} \quad 10.$$

Cette équation peut être résolue à partir de conditions initiales et d'un solveur qui va calculer les valeurs de g_s au cours du temps.

2.2.2. Modèle utilisant une réponse temporelle sigmoïdale

De même pour le modèle sigmoïdal, j'ai défini une équation différentielle:

$$\frac{dg_s}{dt} = \frac{1}{k} \cdot (\ln(G - r_0) - \ln(g_s - r_0)) \cdot (g_s - r_0) \quad 11.$$

A la différence des modèles analytiques, les modèles utilisant des équations différentielles pour décrire les variations de la conductance stomatique (g_s) sont insensibles au pas de temps des mesures (Fig. 15). Cette différence tient au fait qu'ils suivent en continu les variations de l'environnement et donc de la cible en régime permanent (G). En effet, au lieu d'utiliser le modèle entre deux mesures successives en considérant l'environnement comme stable, j'ai introduit des splines qui, appliquées aux variables environnementales, prédisent en continu les valeurs de G . Cette différence importante permet de suivre finement les variations de l'environnement et de mieux décrire les effets temporels sur g_s . Au contraire, pour les modèles analytiques, les mises à jour des valeurs de G dépendent du pas de temps, ce qui conduit à des approximations qui sont acceptables avec un faible pas de temps mais induisent rapidement des erreurs de prédictions plus la valeur du pas de temps augmente et les variations de l'environnement sont rapides (Fig. 15).

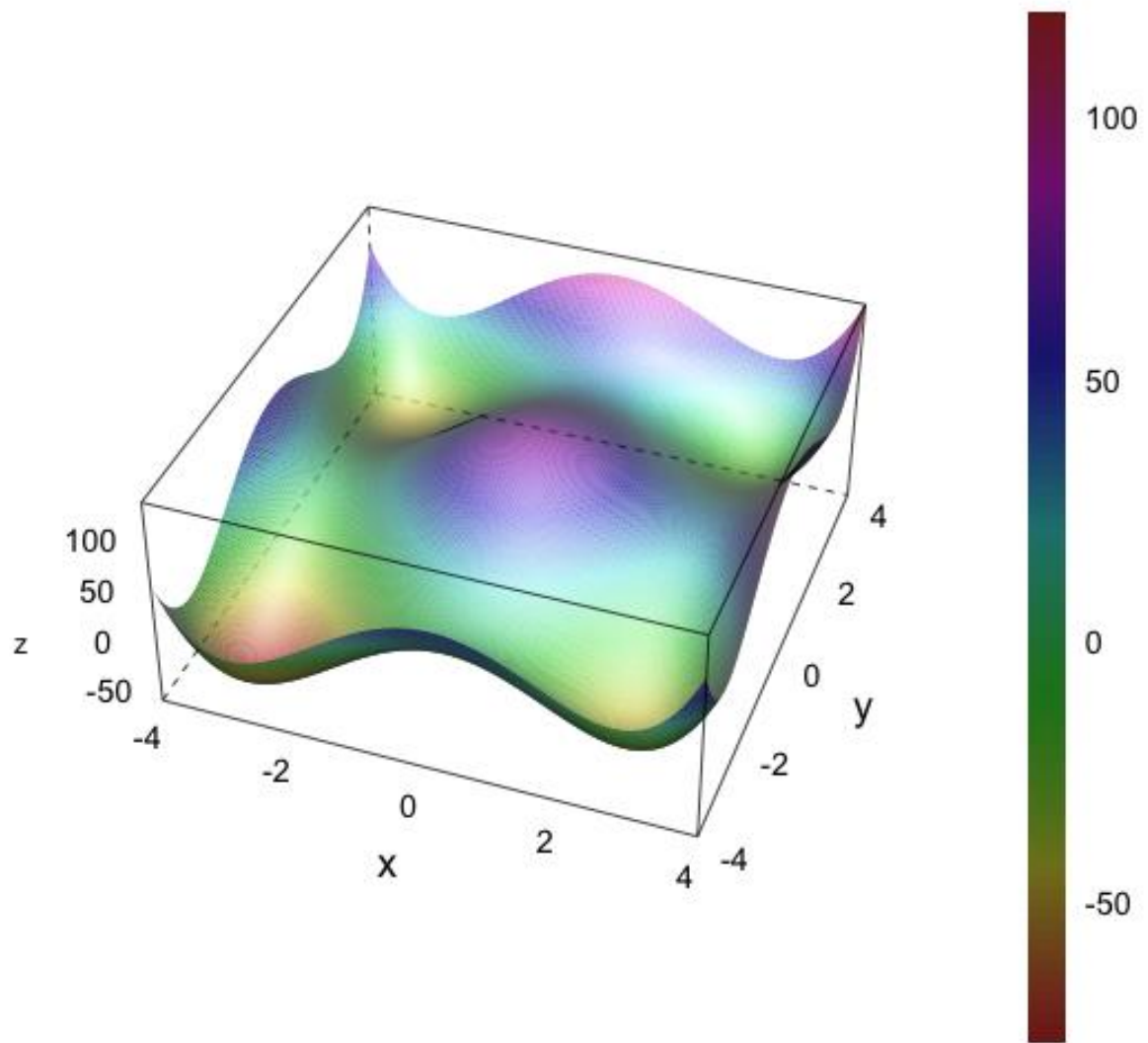


Figure 16: Représentation de l'équation f de Styblinski-Tang utilisée dont le minimum global est défini en $(x,y)=(-2,903534018185960, -2,903534018185960)$.

Modélisation inversée: optimisation des valeurs de paramètres.

L'ajustement des modèles est souvent basé sur la comparaison des sorties du modèle avec des données mesurées. Cette comparaison peut s'effectuer par le calcul de la distance entre les données modélisées et observées produisant ainsi un critère d'optimisation des valeurs de paramètres. Différents calculs permettent d'évaluer cette distance comme par exemple la distance euclidienne, l'erreur quadratique moyenne (MSE)... Pour mettre en évidence les différences entre techniques d'ajustement, nous utiliserons une fonction qui simule un calcul de distance présentant une surface complexe. Cette fonction est représentée par l'équation f de Styblinski-Tang (Fig. 16):

$$f = \sum_{i=1}^n (x_i^4 - 16x_i^2 + 5x_i) \quad 12.$$

Celle ci possède plusieurs minima locaux et un optimum global défini en $(x,y)=(-2,903534018185960, -2,903534018185960)$. Ceci peut sembler un cas extrême mais permet de tester en deux dimensions des problèmes qui se posent avec un plus grand nombre de paramètres et donc de dimensions.

1. Recherche de l'optimum

1.1. Recherche locale

Les méthodes les plus simples d'exploration locale définissent arbitrairement un point de départ et évaluent ensuite le gradient dans une direction. Dans le cas d'une fonction concave, ces algorithmes aboutissent à une convergence rapide vers le minimum de la fonction cible. Néanmoins, avec un plus grand nombre de dimensions ou si la fonction présente des minima locaux (comme la fonction f), ces algorithmes ont de grands risques de rester bloqués car leur déplacement ne se fait que dans le sens d'une minimisation de la fonction cible (Fig. 17a).

D'autres méthodes existent qui permettent de résoudre ce problème de minimum local. Ainsi, le recuit simulé permet l'exploration locale de la surface de la fonction f à l'aide d'une chaîne de Markov. Celle-ci se définit comme une suite de valeurs de paramètres $\{\theta_j\}_j$ où θ_{j+1} dépend de θ_j . Les déplacements s'effectuent par une altération (ϵ_j) des valeurs de paramètres actuelles:

$$\theta_{j+1} = \theta_j + \epsilon_j \quad 13.$$

Le recuit simulé propose un déplacement aléatoire où les déplacements qui tendent à minimiser f sont toujours acceptés et les déplacements qui augmentent f sont acceptés avec une probabilité non nulle. Cette méthode définit ϵ_j par une loi arbitraire mais symétrique en 0 et accepte ou rejette θ_{j+1} en fonction d'une probabilité pondérée par une suite décroissante vers 0 appelée température. Celle-ci permet des déplacements ne tendant pas vers l'optimum global de f en début de chaîne mais dont les probabilités d'acceptation diminuent progressivement.

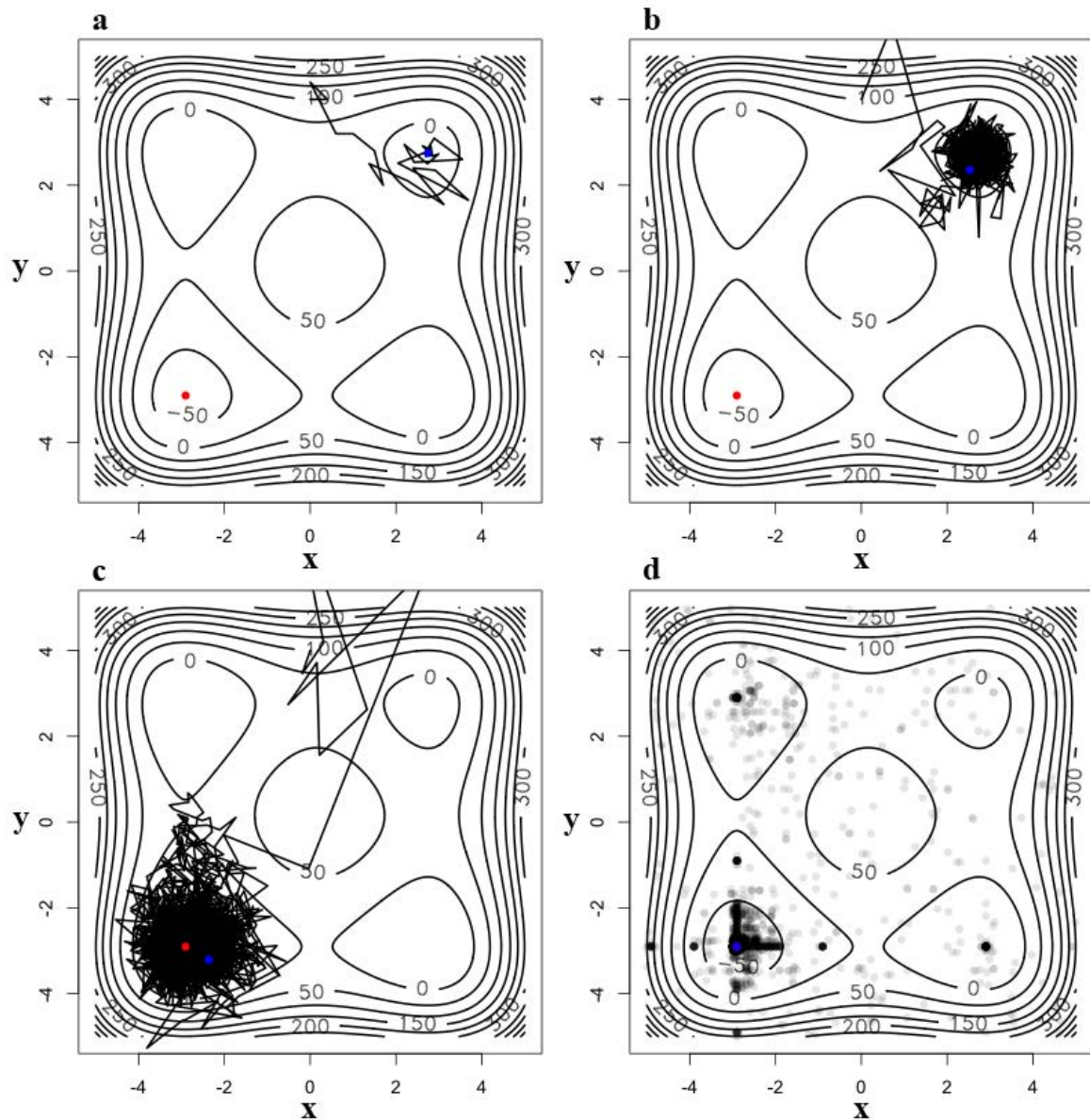


Figure 17: Exemple de méthodes d'ajustement de paramètres appliquées à la fonction f : (a) méthode déterministe de Nelder et Mead (1965) (ligne), (b) variante du recuit simulé de Bélisle (1992) (ligne) avec paramètres: itérations: 2000, température: 20, échelle des altérations: (1,1) (c) variante du recuit simulé de Bélisle (1992) (ligne) avec paramètres: itérations: 2000, température: 100, échelle des altérations: (2,2), (d) algorithme génétique (points). Les points rouges symbolisent l'optimum global de f et les points bleus, la valeur finale des paramètres x et y estimés en fonction de l'algorithme.

Les performances de cet algorithme dépendent de la fonction de température et des paramètres choisis pour simuler ϵ_j car si les déplacements sont trop importants θ_{j+1} sera très souvent rejeté et si les déplacements sont trop petits l'algorithme aura du mal à explorer la surface de f (Fig. 17b-c). La probabilité d'acceptation pour un déplacement correct devrait se situer entre 0,15 et 0,5. La convergence de ce type d'algorithme ne garantit en aucune manière de trouver l'optimum global (Fig. 17b). Il est donc conseillé de lancer plusieurs chaînes avec différentes valeurs initiales pour contrôler la convergence. Une fois la convergence atteinte, il est possible de combiner plusieurs approches pour affiner le résultat comme dans le cas de la figure 17c où l'emploi d'une méthode basée sur les gradients aurait permis d'affiner le résultat.

1.2. Recherche globale

Les algorithmes génétiques (ou évolution différentielle) sont des techniques méta-heuristiques qui tirent leur nom d'une analogie avec la génétique mendélienne. Il existe différentes implémentations de ces algorithmes et les explications qui suivent sont celles de l'algorithme que j'ai développé et utilisé dans le reste du manuscrit. Leur principe réside dans la génération d'une population ($n=0$) de jeux de valeurs de paramètres initiale qui sera sélectionnée au fil des générations suivant leurs valeurs de fitness (représentée ici par la fonction f). Le fitness est défini par la fonction à minimiser (ex: erreur quadratique moyenne) appliquée à chaque jeu de valeurs de paramètres. L'évolution de la population se fera par croisements successifs de couples de jeux de valeurs de paramètres choisis aléatoirement ou en fonction de leur fitness. Le croisement est réalisé par analogie avec le phénomène de « crossing-over » et aboutira à un échange de valeurs de paramètres. Lors de ce croisement des mutations peuvent se produire et générer de nouvelles valeurs de paramètres avec une probabilité prédéfinie. Les différents croisements permettent de produire une nouvelle population ($n+1$) de jeux de valeurs de paramètres. Les deux générations n et $n+1$ sont alors regroupées et les individus sont sélectionnés en fonction de leur fitness pour garder une taille de population constante. Ces différents mécanismes permettent une exploration simultanée de plusieurs points de la surface à explorer et une convergence progressive vers l'optimum global sans être attiré par des minima locaux. Ici, la question du choix d'une valeur initiale ne se pose pas car la population de jeux de valeurs de paramètres est générée aléatoirement sur toute la surface à explorer. De plus, ces algorithmes sont souvent plus simples pour l'utilisateur car ils dépendent moins du choix des paramètres d'entrée. Néanmoins, ils sont un peu plus coûteux en temps de calculs mais facilement parallélisables.

Sur la figure 17d, l'algorithme génétique explore une grande partie de la surface de f et détecte bien les minima locaux. Une partie de la population des jeux de paramètres concernant les optima locaux est conservée au fil des générations car leurs fitness sont proches. Néanmoins, la présence de ces minima n'empêche pas l'algorithme de converger progressivement vers l'optimum global. De plus la valeur estimée de l'optimum global est exactement celui de la fonction f . Pour des modèles avec de nombreux paramètres, cette méthode est donc plus adaptée pour estimer l'optimum. Elle a ainsi permis de calibrer des modèles écologiques (Wang, 1997; Chen *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2009; Vialet-Chabrand *et al.*, 2013b) sans toutefois estimer la précision des paramètres qui dépend en partie de la sensibilité des paramètres du modèle et de leur inter-corrélation.

2. Estimation des distributions de probabilité des paramètres

Après avoir estimé des valeurs optimales de paramètres d'un modèle, l'étape suivante est d'estimer la probabilité d'erreur de chaque paramètre ajusté. Cette erreur dépend en partie de la sensibilité du modèle pour chaque paramètre et est représentée sous la forme d'une distribution de probabilité décrivant les valeurs possibles de paramètres compte tenu des données observées.

2.1. Inférence bayésienne

2.1.1. Théorème de Bayes

Le théorème de Bayes est la base de l'inférence bayésienne. Ce théorème est nommé d'après le révérent Thomas Bayes (1702-1761). Il fournit une expression pour la probabilité conditionnelle de A sachant B qui est égale à :

$$P(A|B) = \frac{P(B|A)P(A)}{P(B)} \quad 14.$$

Pour l'inférence basée sur un modèle bayésien, B est remplacé par les observations y , A par le jeu de paramètres θ et les probabilités P par des densités de probabilité p . On obtient la formule suivante :

$$p(\theta|y) = \frac{p(y|\theta)p(\theta)}{p(y)} \quad 15.$$

Ce que l'on peut littéralement traduire par : la probabilité des paramètres connaissant les données $p(\theta|y)$ est égale à la probabilité d'observer les données connaissant les paramètres $p(y|\theta)$ multipliée par la probabilité (a priori) d'observer ces paramètres $p(\theta)$, divisé par la probabilité d'observer ces données $p(y)$.

En pratique, on cherche à estimer $p(\theta|y)$ (la distribution jointe a posteriori du jeu de paramètres θ) qui représente la distribution de probabilité des paramètres du modèle en fonction des données observées y . Pour la déterminer, on utilise le produit de la vraisemblance des données modélisées à partir des paramètres θ comparé aux données observées y et la probabilité a priori $p(\theta)$ des paramètres. Cette probabilité a priori (ou prior) est établie en amont de l'ajustement pour chaque paramètre à partir de données déjà existantes (différente de y) et apporte une information supplémentaire.

La distribution prédictive a priori $p(y)$ indique à quoi y devrait ressembler étant donné le modèle avant que y ait été observé et peut être remplacée par une valeur constante inconnue. La formule précédente peut être simplifiée en supprimant $p(y)$ ce qui change la relation de « égal » à « proportionnel à », $\propto$:

$$p(\theta|y) \propto p(y|\theta)p(\theta) \quad 16.$$

Cette formulation définit la distribution jointe a posteriori non normalisée comme étant proportionnelle à la vraisemblance multiplié par les prior. A partir de cette distribution jointe a posteriori non normalisée, il est possible d'inférer la distribution marginale des paramètres. On a donc un moyen d'estimer la probabilité d'un jeu de paramètres Θ en fonction de données observées comme par exemple des données d'échanges gazeux foliaires. Néanmoins, il reste à trouver une méthode pour générer plusieurs jeux de paramètres Θ pour décrire les distributions de paramètres probables. Dans un premier temps, je vais décrire plus en détail les différentes parties du théorème de Bayes et je reviendrai ensuite sur la génération des paramètres.

2.1.2. Utilisation des informations disponibles et choix d'une distribution a priori

Pour chaque paramètre du jeu de paramètres Θ , on définit une densité de probabilité a priori ou prior. Celle-ci représente l'information déjà connue sur le paramètre avant l'application du modèle sur les données y . Par exemple, dans le cas du modèle de Farquhar, il existe déjà de nombreuses estimations de $V_{C_{max}}$ et J_{max} dans la littérature pour de nombreuses espèces qui peuvent être utilisées pour définir une distribution des valeurs possibles de paramètres. Ces priors peuvent être plus ou moins informatifs selon les informations disponibles sur les paramètres et permettent souvent une meilleure convergence du modèle. On peut prendre comme exemple une moyenne et un écart type qui vont caractériser une distribution normale des paramètres ou des valeurs minimales et maximales qui vont définir une distribution uniforme des paramètres.

2.1.3. Comparaison des données observées vs simulées et calcul de vraisemblance

La vraisemblance $p(y|\Theta)$ contient l'information disponible sur Θ apportée par les données et se définit par:

$$p(y|\Theta) = \prod_{i=1}^n p(y_i|\Theta) \quad 17.$$

Les données y affectent la distribution a posteriori $p(\Theta|y)$ seulement au travers de la fonction de vraisemblance $p(y|\Theta)$. De cette façon, l'inférence bayésienne obéit au principe de vraisemblance qui établit que pour un échantillon donné de données, deux modèles de probabilité $p(y|\Theta)$ ayant la même fonction de vraisemblance produisent la même inférence pour Θ . Par exemple si l'erreur sur les données est normalement distribuée, la fonction de densité de probabilité d'une distribution normale sera utilisée. Elle est habituellement définie par:

$$f(y) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp\left[\left(-\frac{1}{2}\sigma^2\right)(y_i - \mu_i)^2\right]; y \in (-\infty, \infty) \quad 18.$$

ou μ_i représente la valeur prédite par le modèle, y_i la valeur observée et σ^2 la variance estimée.

Pour des raisons techniques, on calcule souvent la vraisemblance sous forme de la log-vraisemblance:

$$\log[p(y|\theta)] = \sum_{i=1}^n \log[p(y_i|\theta)] \quad 19.$$

Cela permet entre autre d'utiliser une somme plutôt qu'un produit qui produirait un nombre trop grand pour être géré facilement par les ordinateurs actuels.

Pour calculer la vraisemblance des modèles de conductance stomatique, j'ai utilisé la fonction `R` `dnormv` qui décrit une erreur normale sur les données observées y . Elle permet de comparer les données observées y avec les données modélisées à partir du jeu de paramètre θ connaissant la variance σ^2 . Cependant, dans certains cas, les erreurs sur les données observées ne sont pas indépendantes ou trop complexes à décrire, on utilise donc une approximation de la vraisemblance.

2.1.4. Méthode alternative du calcul de vraisemblance: Aproximated Bayesian Computation (ABC)

Dans certains cas où la vraisemblance est difficilement calculable (ex: série temporelle où l'erreur dépend de la valeur courante de la variable mesurée), on peut remplacer cette vraisemblance par un estimateur non biaisé comme l'erreur moyenne au carré (*MSE*) plus facile à calculer (Marjoram *et al.*, 2003). Celle-ci permet de la même façon que la vraisemblance d'extraire l'information contenue dans les données sur les paramètres sans faire d'hypothèse sur la distribution de la variance résiduelle. Pour prendre en compte l'erreur de mesure sur les données observées, il est nécessaire de définir une limite d'acceptation du *MSE* qui correspond à l'erreur maximale tolérée sur les données observées (Toni *et al.*, 2009). L'utilisation se fait ensuite de la même façon que l'inférence bayésienne classique.

2.1.5. Metropolis-Hasting et chaines de Markov

Pour générer des jeux de paramètres Θ décrivant la distribution cible $p(\theta/y)$, il est possible de partir d'un jeu de paramètres Θ défini aléatoirement et d'altérer les valeurs de paramètres pour générer un déplacement de la chaîne dans l'espace des paramètres. Les valeurs d'un jeu de paramètres Θ ne dépendent alors que des valeurs des paramètres précédents. Ce type de déplacement s'appelle une chaîne de Markov et va servir à l'approximation de la distribution cible $p(\theta/y)$ avec la méthode de Monte Carlo.

Les algorithmes Monte Carlo à chaîne de Markov (MCMC), aussi appelés échantillonneurs, sont des algorithmes d'approximation numérique. Il existe un très grand nombre d'algorithmes MCMC qui ne pourraient être détaillés ici. Sans tenir compte de l'algorithme utilisé, le but de l'inférence bayésienne est de collecter des échantillons des distributions cibles $p(\theta/y)$ en utilisant une chaîne de Markov qui se déplace dans le sens d'une minimisation du produit de la fonction de vraisemblance $p(y|\theta)$ et des priors $p(\theta)$. Ces déplacements ne se font pas exclusivement en minimisant ce produit mais selon une probabilité d'acceptation. C'est-à-dire que chaque nouveau jeu de paramètres Θ est comparé au précédent et accepté selon une probabilité. On obtient donc une distribution de probabilités au lieu d'une valeur unique.

La plupart des algorithmes MCMC sont des cas particuliers de l'algorithme de Metropolis-Hastings. Cet algorithme associé à la distribution cible π (ici, $p(\theta/y)$) et la loi de proposition q fournit une chaîne de Markov ($A^{(t)}$) suivant un processus générant de nouvelles valeurs de Θ représentatives de $p(\theta/y)$ appelé noyau de transition:

Etant donné $a^{(t)}$ un jeu de paramètre Θ à l'itération t de la chaîne de Markov et B_t une proposition de nouveau jeu de paramètres Θ suivant la loi de proposition q :

1. Générer $B_t \sim q(b|a^{(t)})$
2. Choisir

$$X^{(t+1)} = \begin{cases} B_t & \text{avec probabilité } p(a^{(t)}, B_t), \\ a^{(t)} & \text{avec probabilité } 1 - p(a^{(t)}, B_t), \end{cases}$$

où

$$p(a, b) = \min \left\{ 1, \frac{q(a|b) \pi(b)}{q(b|a) \pi(a)} \right\} \quad 20.$$

La loi de proposition q correspond à la loi qui définit les déplacements de la chaîne de Markov et peut être symétrique ou asymétrique. On dit qu'elle est symétrique quand la probabilité de l'altération de la valeur d'un paramètre est identique quel que soit le sens de la variation. On peut parfois avoir besoin d'une loi asymétrique q lorsque l'on souhaite par exemple exclure les valeurs inférieures à 0 comme valeur de paramètres dans le modèle. Dans ce cas, la probabilité de générer des déplacements n'est plus symétrique mais dépend de la valeur actuelle du paramètre. En général, on choisit une distribution de proposition symétrique où $q(a|b) = q(b|a)$ permettant de simplifier le calcul de la probabilité d'acceptation:

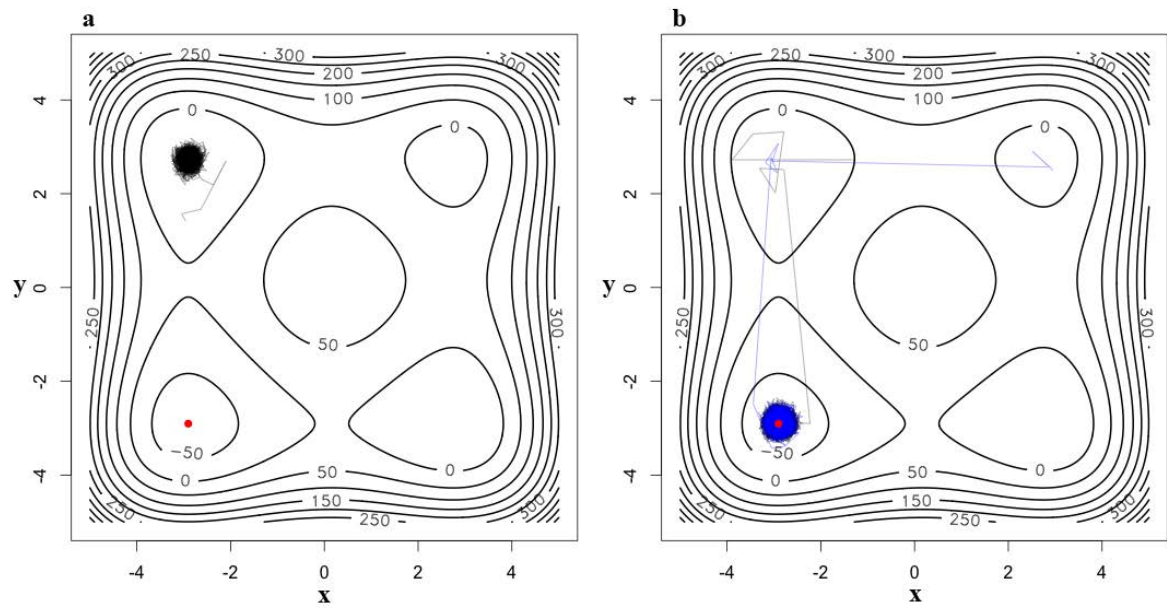


Figure 18: Exemple d'algorithme de Metropolis-Hasting appliqués à la fonction f : **(a)** Random Walk Metropolis, version simple de l'algorithme; **(b)** Interchain Adaptation (INCA), algorithme adaptatif permettant l'échange d'informations entre chaînes.

$$p(a, b) = \min \left\{ 1, \frac{\pi(b)}{\pi(a)} \right\} \quad 21.$$

Ainsi, la fonction d'acceptation de l'échantillonneur se résume à faire le ratio des $p(\theta/y)$ calculés pour chaque jeu de paramètres θ , de comparer la valeur de ce ratio avec une valeur prise aléatoirement entre 0 et 1 et d'accepter θ si sa probabilité d'acceptation est supérieure à celle définie aléatoirement. Ainsi un jeu de paramètres avec une forte probabilité d'acceptation sera souvent accepté et inversement avec une faible probabilité d'acceptation. On génère donc la distribution cible en fonction de la probabilité d'acceptation des jeux de paramètres θ . Les premières itérations sont souvent éliminées (burn-in) le temps que la distribution des valeurs de paramètres θ tende vers la distribution cible. On procède alors à des vérifications sur la chaîne ainsi générée pour contrôler sa convergence, sa stationnarité,...

La loi de proposition q nécessite de définir l'amplitude de l'altération de chaque paramètre. La probabilité d'acceptation définie précédemment est directement proportionnelle à l'amplitude de l'altération des valeurs de paramètres. On retrouve donc les mêmes problèmes que ceux présents dans l'optimisation locale ou l'amplitude des altérations permet ou non de converger vers le maximum de vraisemblance (Fig. 18a). Pour proposer de nouveaux déplacements, on utilise souvent une loi normale ou multi-normale centrée sur la valeur courante du paramètre et dont la variance ou la covariance peut soit être prédéfini ou soit mis à jour au cours des itérations (Haario *et al.*, 2001). Dans le cas d'une covariance mis à jour au cours des itérations, on parle d'algorithmes adaptatifs (Fig. 18b). Ceux-ci permettent une estimation de la matrice de covariance des paramètres en utilisant les jeux de paramètres déjà acceptés et donc une proposition de déplacements qui tient compte des corrélations entre paramètres. Cette matrice de covariance sera alors utilisé avec une version simple de l'algorithme de Metropolis-Hastings nommé Random Walk Metropolis (*RWM*) qui permettra de produire un échantillon représentatif de la loi à postériori sans effets adaptatifs.

Comprendre le principe du théorème de Bayes et du MCMC m'a permis de programmer sous R la fonction nécessaire au calcul de la distribution cible $p(\theta/y)$ pour ajuster un modèle dynamique d'échange gazeux foliaire sur des cinétiques journalières. Une fois cette fonction implémentée, il m'a suffi d'utiliser des packages tel que LaplacesDemon pour générer des échantillons représentatifs des distributions cibles $p(\theta/y)$. De plus, la vraisemblance d'un modèle pourrait être comparée à d'autres sur les mêmes données en utilisant les informations issues de l'inférence bayésienne. Les informations ainsi générées pourront à leur tour servir pour de futurs ajustements sur de nouveaux jeux de données observés sous la forme de prior (Dietze *et al.*, 2013).

Problématique

Les études décrivant l'efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau (W_i) intégrée dans le temps ont révélé une forte diversité inter et intra-spécifique de ce trait. L'étude des causes de cette diversité nécessite de travailler à une échelle plus fine de variations temporelles (Will *et al.*, 1999). Chez le chêne, les variations journalières de g_s semblent avoir un poids plus important pour expliquer la diversité de W_i que les variations de A (Roussel *et al.*, 2009). **Pour comprendre comment les variations de W_i s'intègrent dans le temps, il est donc nécessaire d'identifier les variables microclimatiques influençant la réponse de g_s au cours d'un cycle journalier et de caractériser leur impact sur g_s .**

Une variation du microclimat induit une variation lente de g_s au cours du temps. Les modèles actuels décrivant g_s en régime permanent ne tiennent pas compte de ces réponses temporelles. Il existe des modèles simples décrivant la réponse temporelle de g_s en réponse à des variations instantanées de l'irradiance. Néanmoins, ces modèles ne reproduisent pas complètement les réponses temporelles de g_s observées chez le chêne. **Un modèle intégrant le délai de réponse observé suite à une variation instantanée du microclimat permettrait de décrire avec plus de justesse les différentes étapes de la réponse temporelle de g_s . Un modèle ainsi défini permettrait d'étudier les réponses temporelles de g_s à différentes variables microclimatiques et ainsi de mieux comprendre leur impact sur W_i .**

*Ces deux problématiques ont été traitées dans le cadre d'une expérimentation sur la caractérisation de la réponse temporelle de g_s à différentes variations de l'environnement et décrites dans l'article intitulé: « **Dynamics of stomatal responses to red light, blue light and CO₂ are not linked with stomatal length in oaks.** ». Le modèle dynamique a permis de décrire la réponse temporelle de g_s à des variations séquentielle de la lumière (rouge puis rouge+bleue) et de CO₂ (faible puis fort) chez deux espèces tempérées et deux espèces Méditerranéennes de chêne. L'objectif était de tester la sensibilité de la réponse de g_s à des variations spécifiques du microclimat et de corrélérer les paramètres décrivant la réponse temporelle de g_s avec la diversité détectée de densité stomatique et de taille des stomates. Nous avons détecté des différences significatives des réponses de g_s aux variations séquentielles du microclimat chez toutes les espèces. Dans chaque espèce, le paramètre décrivant la rapidité de la réponse temporelle affichait des différences significatives entre chaque microclimat testé. La conductance stomatique en régime permanent atteinte pour chaque feuille mesurée était corrélée positivement avec la densité stomatique. Cependant, la large variabilité détectée entre individus pour la rapidité de la réponse temporelle n'était pas corrélée à la densité stomatique ni à la taille des stomates. Ceci suggère que pour les espèces de chêne étudié ici, la taille des stomates n'avait pas d'impact sur la rapidité de leur réponse à la lumière et au CO₂.*

Les variations du microclimat sont continues en conditions naturelles, il est donc important d'en tenir compte pour estimer la réponse temporelle de g_s au cours d'un cycle journalier. **A partir d'un modèle de réponse temporelle de g_s associé à un modèle prédisant la réponse de g_s en régime permanent à l'irradiance, il est possible de définir un modèle de réponse temporel de g_s qui tienne compte des**

variations continues de l'irradiance. Ce modèle permettrait de déterminer la diversité de l'impact de la réponse temporelle de g_s sur W_i au cours d'un cycle journalier d'irradiance en conditions contrôlées.

*Cette problématique a été traitée dans le cadre d'une expérimentation sur la modélisation dynamique de g_s au cours d'une variation journalière d'irradiance en conditions contrôlées et décrite dans l'article: « **Performance of a new dynamic model for predicting diurnal time courses of stomatal conductance at the leaf level** ». Nous avons testé un modèle dynamique pour prédire la réponse temporelle de g_s à l'échelle foliaire en utilisant une fonction sigmoïde asymétrique et une constante de temps unique pour l'augmentation et la diminution de g_s . Les paramètres du modèle ont été ajustés sur des données observées en utilisant l'inférence Bayésienne. Nous avons testé les performances du modèle pour (i) des changements instantanés de l'irradiance; ou (ii) des variations continues et contrôlées de l'irradiance simulant une cinétique diurne. Comparé au deux modèles de régime permanent les plus utilisés (Jarvis, 1976; Ball et al, 1987) notre modèle dynamique a décrit les cinétiques journalières de g_s avec une plus grande justesse. En particulier, il a été capable de décrire l'hystérésis des réponses de g_s à une augmentation/diminution de l'irradiance et les variations rapides de W_i . Le modèle décrivant la réponse temporelle de g_s établi par Kirschbaum et al (1988) n'a pas permis d'estimer avec précision les constantes de temps contrairement à notre modèle.*

La conductance stomatique nocturne (g_{night}) est un élément important de la régulation du bilan hydrique de la plante durant un cycle journalier. Toutefois, les modèles couramment utilisés tel que celui de Ball et al. (1987) ne prennent pas en charge correctement cette conductance stomatique nocturne. **Chez le chêne, il n'existait pas de mesure précise de g_{night} , il était donc nécessaire d'estimer g_{night} ainsi que sa variabilité inter et intra-spécifique.**

Les réponses temporelles de g_s ont souvent été étudiées au niveau foliaire. Dans le cadre d'un éventuel changement d'échelle, il n'existe pas à notre connaissance dans la littérature d'étude de la réponse temporelle de g_s à l'échelle du plant. **Nous avons donc testé et de modélisé la réponse temporelle de g_s intégrée sur le plant entier.**

*Ces deux problématiques ont été traitées dans le cadre d'une expérimentation sur la caractérisation de la réponse temporelle de g_s au niveau du plant entier au cours d'une alternance de lumière et d'obscurité. Cette expérimentation est décrite dans l'article intitulé: « **Assessing and modelling the dynamic variations of whole plant transpiration during light-dark transitions in different oak species** ». Nous avons évalué la réponse temporelle de g_s et la transpiration à l'échelle de la plante entière après des transitions de la lumière vers l'obscurité et de l'obscurité vers la lumière. Notre modèle dynamique de g_s a permis de reproduire avec justesse la cinétique des pertes en eau enregistrée par pesées de plantes en pot de deux espèces tempérées et deux espèces Méditerranéennes de chêne. Cela nous a permis d'estimer les constantes de temps et les temps de réponse de la réponse temporelle de g_s de la plante entière. Les différences de paramètres suggéraient un control différent de la réponse temporelle de g_s lors des transitions de la lumière à l'obscurité et de l'obscurité à la lumière. De plus, la diversité des*

réponses temporelles de g_s impactaient significativement la perte en eau à l'échelle de la plante, ce qui souligne son importance dans le budget en eau de la plante.

A partir de ces travaux et des éléments disponibles dans la littérature sur les modèles décrivant g_s en régime permanent, il est possible de définir un modèle dynamique décrivant les réponses temporelles de g_s aux principales variables microclimatiques. **Ce modèle permettrait de comparer les performances d'un modèle dynamique à celle d'un modèle steady-state au cours d'un cycle journalier complet en conditions naturelles.**

Cette problématique a été traitée dans le cadre d'une expérimentation sur la modélisation dynamique de g_s au cours d'un cycle journalier et décrite dans le chapitre intitulé: Application à une cinétique journalière en conditions naturelles.

Matériels et méthodes

Choix des espèces

Cinq espèces de chêne ont été sélectionnées pour ces expérimentations: *Quercus robur* L., *Q. afares* Pomel, *Q. suber* L, *Q. canariensis* Willd. et *Q. petraea* Matt. Liebl. Les observations déjà disponibles sur ces espèces faisaient état d'une importante diversité au niveau de l'anatomie foliaire (ex: densité stomatique) et de l'efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau (W_i). Nous avons donc fait l'hypothèse que cette diversité permettrait de mettre en évidence une diversité de la réponse temporelle de g_s .

Modélisation dynamique et pas de temps de mesures.

La modélisation dynamique des échanges gazeux foliaires impose un faible pas de temps de mesure des variables microclimatiques pour capturer leurs variations fines. En effet, l'utilisation de mesures avec des pas de temps de l'ordre de plusieurs minutes introduit une approximation des variations du microclimat qui conduit à un biais dans l'estimation de g_s . L'utilisation des splines permet d'obtenir des données continues à partir des enregistrements du microclimat et sont utilisées comme données d'entrée pour les modèles dynamiques. Toutefois, bien que cette méthode se révèle plus précise dans la prédiction journalière des échanges gazeux, elle utilise également plus de ressources de calcul au niveau informatique que les modèles traditionnellement utilisés. La fonction gérant les splines par défaut sous R étant trop lente par rapport aux nombreuses itérations nécessaires à l'ajustement d'un modèle, j'ai dû implémenter une nouvelle fonction faisant l'interface avec une librairie mathématique plus rapide : GNU Scientific Library (GSL). La nouvelle fonction était presque 1000 fois plus rapide que la fonction par défaut permettant de gagner un temps précieux dans le temps d'exécution du modèle.

Statistiques bayésiennes et temps de calcul

L'inférence bayésienne nécessite un minimum d'itérations lors de l'ajustement des paramètres ce qui se traduit par un grand nombre d'appels à la fonction exécutant le modèle. Si le modèle utilisé nécessite 0,5s pour s'exécuter, il faut multiplier ce temps par des dizaines voir des centaines de milliers d'itérations lors de l'inférence bayésienne. Cela conduit à des temps de calcul de plusieurs heures pour l'ajustement d'une cinétique d'échanges gazeux à l'échelle journalière. Le temps de calcul est donc un élément très important à prendre en compte dans la démarche d'ajustement d'un modèle dynamique, à moins de disposer de ressources informatiques suffisantes.

Pour limiter le temps d'exécution des modèles cités dans mes travaux, j'ai donc dû procéder à diverses optimisations telles que la compilation des modèles en langage C puis un chargement sous R pour limiter le temps d'exécution. La qualité du code était aussi un élément important sous R sous peine de chutes très rapides des performances (ex: pré-allocation des tableaux). Mais l'élément le plus important a été le développement d'une procédure d'ajustement parallélisée sur plusieurs cœurs/processeurs d'un ordinateur sous la forme d'une participation au package R LaplacesDemon (www.bayesian-inference.com).

Résolution d'équations différentielles

Les modèles dynamiques sont formulés sous la forme d'équations différentielles décrivant les variations de la conductance stomatique par exemple. Pour obtenir des valeurs à des temps définis, il est nécessaire d'utiliser un solveur d'équations différentielles et de lui fournir une valeur initiale pour chaque équation. A partir de la valeur initiale, un calcul itératif va permettre d'estimer la conductance au temps défini par l'utilisateur. Au cours de ma thèse j'ai utilisé différents solveurs provenant du package deSolve sous R. Les deux principales fonctions utilisées étaient lsoda et rk45dp7 qui se différencient par une vitesse d'exécution plus rapide pour rk45dp7 et une plus grande flexibilité pour lsoda.

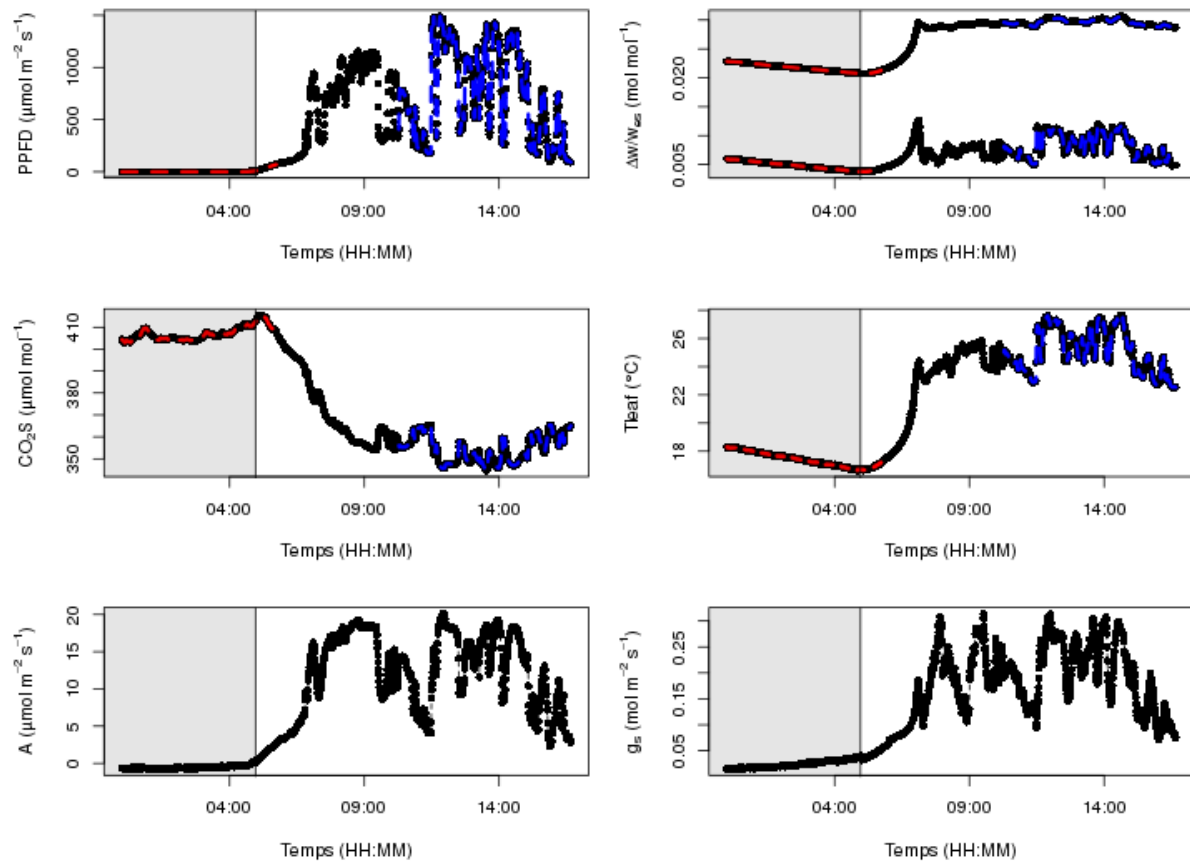


Figure 19: Données microclimatiques, assimilation nette de CO_2 (A) et conductance stomatique à la vapeur d'eau (g_s) enregistrées au cours d'un cycle journalier en conditions naturelles chez un chêne afares. PPFD: irradiance, Δw : différence de fraction molaire de vapeur d'eau entre la feuille et l'air, w_{es} : fraction molaire de vapeur d'eau à saturation dans l'air, CO_2S : fraction molaire de CO_2 dans la chambre de mesure, T_{leaf} : température foliaire. Les courbes rouges et bleues correspondent à l'ajustement de splines pour les parties nocturnes et éclairées respectivement. La zone grisée est définie pour une irradiance inférieure à $10 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Application à une cinétique journalière en conditions naturelles.

En conditions naturelles, les nombreuses fluctuations des variables microclimatiques impactent la conductance stomatique à la vapeur d'eau (g_s) et leurs interactions rendent plus difficile sa modélisation. Comme précédemment évoqué, les modèles couramment utilisés tel que celui de Jarvis (1976) et celui de Ball *et al.* (1987) ne tiennent pas compte de la lente réponse temporelle de g_s (Violet-Chabrand *et al.*, 2013b). De plus, durant la nuit, les variations de g_s ne sont souvent pas ou peu prises en compte par ces modèles (Barbour *et al.*, 2007). Partant de ce constat, j'ai développé un nouveau modèle décrivant g_s qui regroupe les différentes hypothèses testées au cours de ce travail. Je l'ai ensuite ajusté en utilisant l'inférence bayésienne décrite précédemment et des données mesurées en conditions naturelles (Fig. 19).

1. Description d'un modèle dynamique incluant la réponse de la conductance stomatique à l'irradiance, la température et l'humidité.

Pour décrire la réponse temporelle de g_s , j'ai utilisé un modèle de réponse exponentiel qui, malgré l'absence de délais de réponse après un changement du microclimat, reste une approximation raisonnable tout en étant plus simple à mettre en œuvre que le modèle sigmoïdal. Cette réponse exponentielle de g_s au cours du temps est décrite par deux équations différentielles traduisant l'asymétrie de la réponse temporelle de g_s dépendant de son augmentation ou de sa diminution (Ooba et Takahashi, 2003; Vico *et al.*, 2011):

$$\begin{aligned} \frac{dg_s}{dt} &= \frac{1}{k_{up}} \cdot (G - g_s), & \text{si } g_s < G \\ \frac{dg_s}{dt} &= \frac{1}{k_{down}} \cdot (G - g_s), & \text{si } g_s \geq G \end{aligned} \quad 22.$$

où G représente la conductance stomatique cible en régime permanent atteinte si les conditions restent stables et, k_{up} et k_{down} représentent les constantes de temps pour une augmentation et une diminution de g_s respectivement.

Il faut alors prédire G en fonction des variables environnementales. Ici, nous avons sélectionné l'irradiance, la différence de fraction molaire de vapeur d'eau entre la feuille et l'air (Δw) et la fraction molaire de vapeur d'eau à saturation dans l'air (w_{es}). Ces trois variables ont ensuite été utilisées pour ajuster des splines et ainsi prédire les variables environnementales aux différents temps définis par le solveur d'équation différentielle. Cette approche permet un suivi continu des variations microclimatiques. La réponse de g_s à l'irradiance est décrite par une fonction de saturation déjà utilisée au cours des cinétiques journalières en conditions contrôlées (Violet-Chabrand *et al.*, 2013b):

$$G_{PPFD} = g_{min} + \frac{(\alpha_G \cdot PPFD \cdot (g_{max} - g_{min}))}{\sqrt{(g_{max} - g_{min})^2 + (\alpha_G \cdot PPFD)^2}} \quad 23.$$

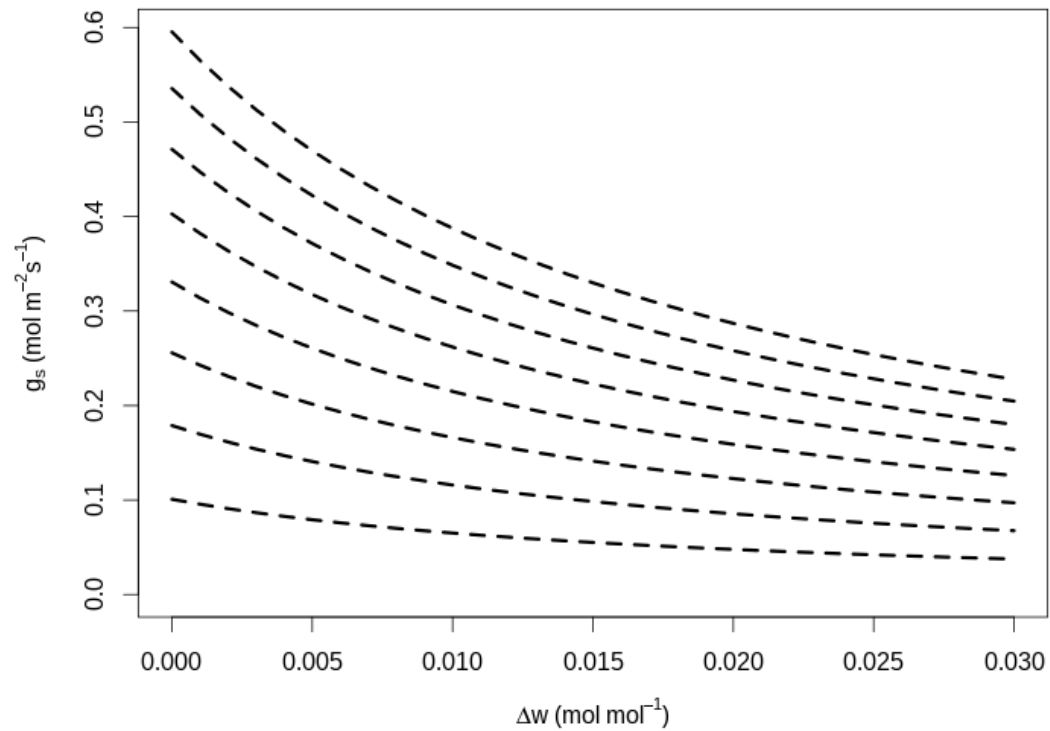


Figure 20: Modélisation de la réponse de la conductance stomatique à la vapeur d'eau (g_s) à l'irradiance (0 à $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) et au déficit de pression partielle de vapeur d'eau entre la feuille et l'air (Δw).

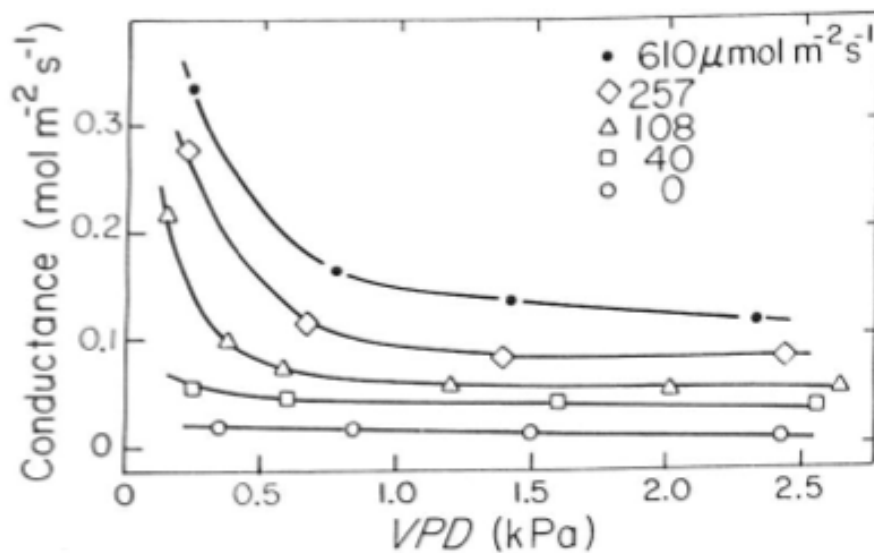


Figure 21: Réponse observée de la conductance stomatique à la vapeur d'eau (g_s) au déficit de pression de vapeur d'eau entre la feuille et l'air (VPD_i) à différents niveaux d'irradiance chez la canne à sucre (Grantz *et al.*, 1987).

où α_G représente la pente initiale de la réponse de g_s à l'irradiance, $g_{\max}$ et $g_{\min}$ la conductance stomatique à la vapeur d'eau maximale et minimale respectivement et $PPFD$ la densité de flux de photons photosynthétiques. Ces différents paramètres sont considérés comme indépendants de la température et de l'humidité. En effet, la réponse de g_s à la température et l'humidité est décrite par le modèle de Mott *et al.* (2012):

$$G_{VPD} = \frac{g_0 - \theta \cdot \frac{\Delta w}{w_{es}}}{1 + Z \cdot \Delta w} \quad 24.$$

où g_0 est égale à la valeur prédite par la fonction G_{PPFD} en fonction de l'irradiance, θ et Z sont des paramètres définis mathématiquement par Peak et Mott (2011).

Cette formulation en cascade permet de respecter l'ordre des priorités des variables microclimatiques impactant g_s défini par Aasamaa *et al.* (2011). C'est-à-dire que le VPD_l impacte toujours g_s quel que soit le niveau d'irradiance (Fig. 20). Ceci est en adéquation avec les observations de Grantz *et al.* (1987) qui ont réalisé des mesures de g_s à différents niveaux de VPD_l et d'irradiance (Fig. 21).

2. Mesures de la conductance stomatique au cours d'un cycle journalier

Pour tester ce modèle, nous avons réalisé des mesures de g_s durant un cycle journalier (jour et nuit) sur une feuille d'un chêne afares. Ces mesures ont été réalisées à l'aide d'un analyseur de gaz infrarouge LiCor 6400 et d'une chambre transparente permettant de suivre les variations naturelles de l'irradiance (Fig. 19). Pour contrôler l'augmentation de température du à l'effet de serre dans la chambre de mesure, nous avons fixé la température de la chambre à 23°C. Les mesures ont été enregistrées avec un pas de temps de 40s pour suivre les variations fines de g_s et de l'environnement. Toutefois, durant le lever du soleil, les variations rapides de température ont entraîné des artéfacts de mesure (référence H_2O instable) qui m'ont contraint à ignorer cette partie du jeu de données lors des ajustements.

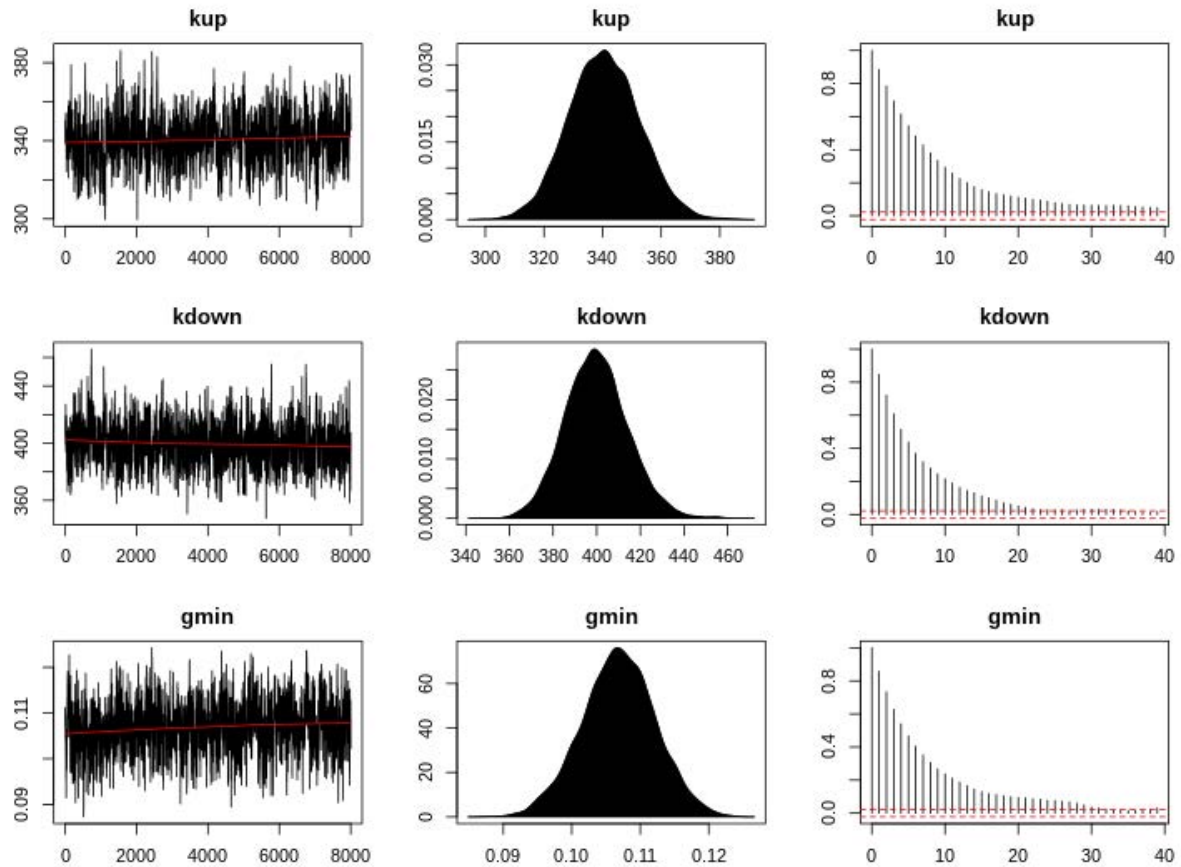


Figure 22: Ajustement des paramètres du modèle dynamique de conductance stomatique par inférence bayésienne. La première colonne correspond aux valeurs des paramètres enregistrées à différentes itérations de la chaîne. Ces valeurs sont un échantillon représentatif de la distribution a posteriori du paramètre, visible dans la deuxième colonne qui représente la probabilité des valeurs de paramètres compte tenu des données et des connaissances a priori sur le paramètre. La troisième colonne correspond à l'autocorrélation de la chaîne qui caractérise sa vitesse de déplacement et donc sa capacité à explorer l'espace de paramètres. Une décroissance rapide vers 0 est le signe que la chaîne n'a pas de problème pour se déplacer dans l'espace de paramètres. Pour une description des paramètres voir les paragraphes 1 et 4.

3. Mise en œuvre de l'inférence bayésienne

L'inférence bayésienne a servi pour l'ajustement des 7 paramètres de ce modèle. Dans un premier temps, j'ai utilisé des priors non informatifs et je n'ai donc utilisé que l'information contenue dans les données observées. Cette démarche a abouti à des valeurs trop élevées pour g_{max} . Dans un deuxième temps, pour faciliter l'ajustement des paramètres, j'ai utilisé l'information obtenue sur g_s à saturation d'irradiance (g_{sat}) durant les cinétiques journalières en conditions contrôlées sur la même espèce (Violet-Chabrand *et al.*, 2013b). Pour cela, j'ai utilisé la valeur de g_{max} produite à chaque itération pour calculer g_{sat} dans les conditions de l'expérimentation à partir de la fonction G_{VPD} (Eq. 10). Une fois le prior défini à partir des informations récoltées sur cette autre expérimentation, les chaînes ont correctement convergé (Fig. 22). L'inférence bayésienne s'est déroulée en plusieurs étapes: (i) la génération aléatoire de valeurs de départ pour chaque paramètre, (ii) une optimisation locale des paramètres pour éviter de démarrer les chaînes trop loin de l'optimum global, (iii) l'estimation de la matrice de covariance des paramètres à l'aide d'un algorithme adaptatif, (iv) puis un échantillonnage de la loi a posteriori. Pour chaque paramètre, j'ai donc ainsi obtenu les valeurs possibles, compte tenu des données observées. L'estimation de la matrice de covariance des paramètres a nécessité 200000 itérations soit un temps de fonctionnement sur un processeur core2duo fonctionnant à 2,5Ghz de 20 heures environ. L'ajustement des paramètres a nécessité 400000 itérations soit un temps de fonctionnement de 18 heures environs (2 chaînes de 200000 itérations en parallèle). Les valeurs de paramètres ont été enregistrées toutes les 50 itérations pour limiter l'autocorrélation et ainsi obtenir un échantillon plus représentatif de la distribution a posteriori. L'ajustement est donc très coûteux en temps mais des ressources de calcul plus conséquentes peuvent rapidement réduire le temps d'attente.

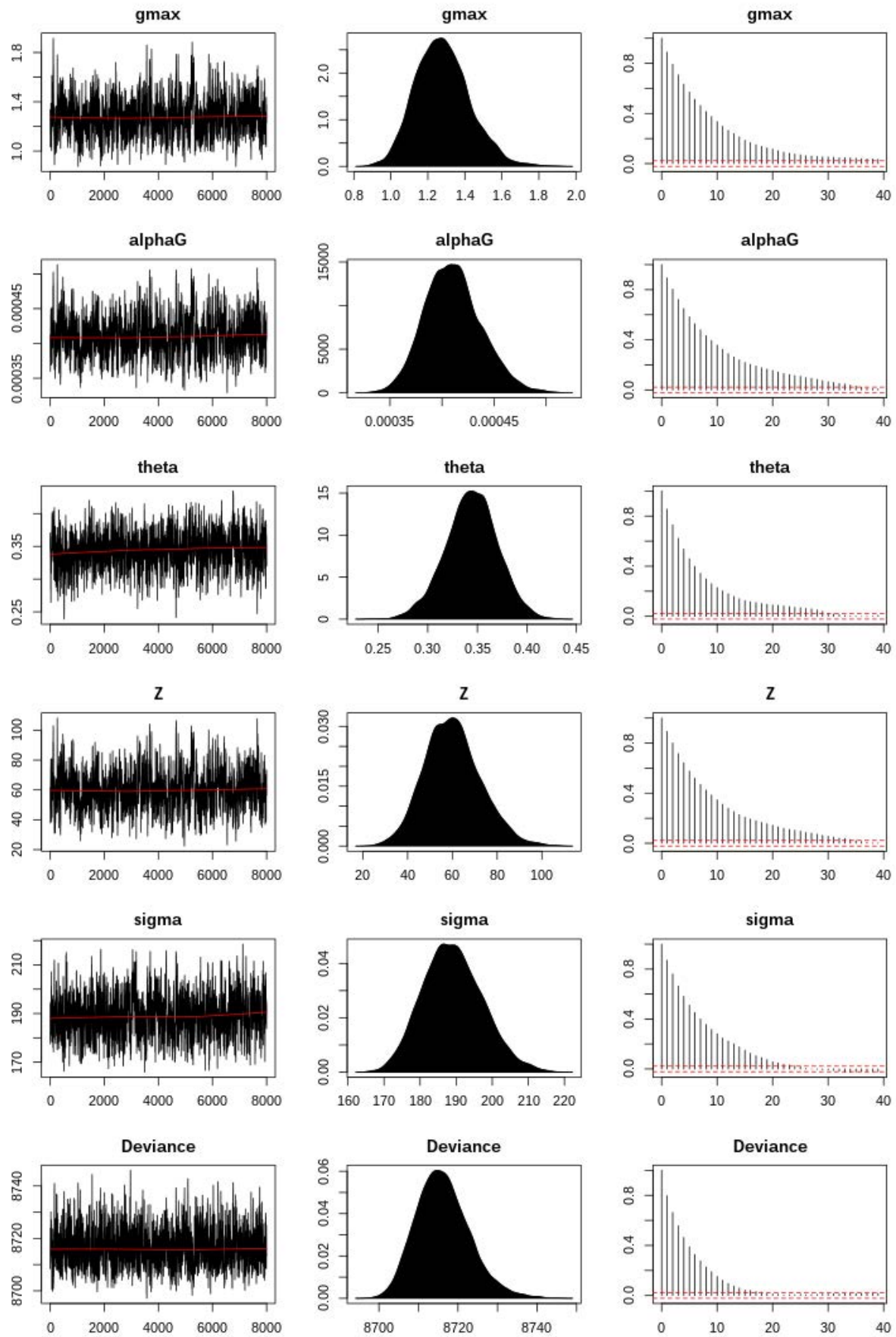


Figure 22bis: Ajustement des paramètres du modèle dynamique de conductance stomatique par inférence bayésienne (suite).

4. Paramètres estimés par l'inférence bayésienne

Les paramètres décrivant les temps de réponse de g_s montrent des constantes de temps asymétriques avec un temps de fermeture plus important que pour l'ouverture (400s au lieu de 340s). Ces constantes de temps sont légèrement inférieures à celles estimées par Ooba *et al.* (2003) et Vico *et al.* (2011), aussi bien pour l'ouverture que pour la fermeture. Pour les paramètres concernant la réponse de g_s à l'irradiance, les valeurs sont supérieures à celle obtenues lors des cinétiques journalières en conditions contrôlées (Violet-Chabrand *et al.*, 2013b) du fait de leur définition à $\Delta w=0$. Les valeurs obtenues sont donc dépendantes de la définition du modèle. Les valeurs de paramètres décrivant la réponse de g_s à l'humidité et à la température sont dans le même ordre de grandeur que celles obtenues par Mott *et al.* (2012) sur différentes espèces. Néanmoins, la formulation exponentielle décroissante (Fig. 20) n'est peut-être pas la plus adaptée chez le chêne, comme décrit précédemment dans la figure 11. Avec une courbe de forme différente, les valeurs de paramètres auraient été différentes. Pour résoudre ce problème, il est possible de tester la vraisemblance de différents modèles pour les départager.

Les deux derniers paramètres de la figure 22 « sigma » et « Deviance » décrivent la qualité d'ajustement du modèle. Sigma correspond à la variance prédite en chaque point estimé par le modèle. Sur la figure elle est représentée en $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et correspond à un écart type de $13,7 \text{ mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La déviance correspond à une mesure de la qualité des prédictions du modèle que l'on pourrait comparer à la somme des carrés des résidus. La déviance peut être utilisée pour comparer les prédictions de plusieurs modèles, une valeur faible étant le signe d'une plus grande justesse de prédiction.

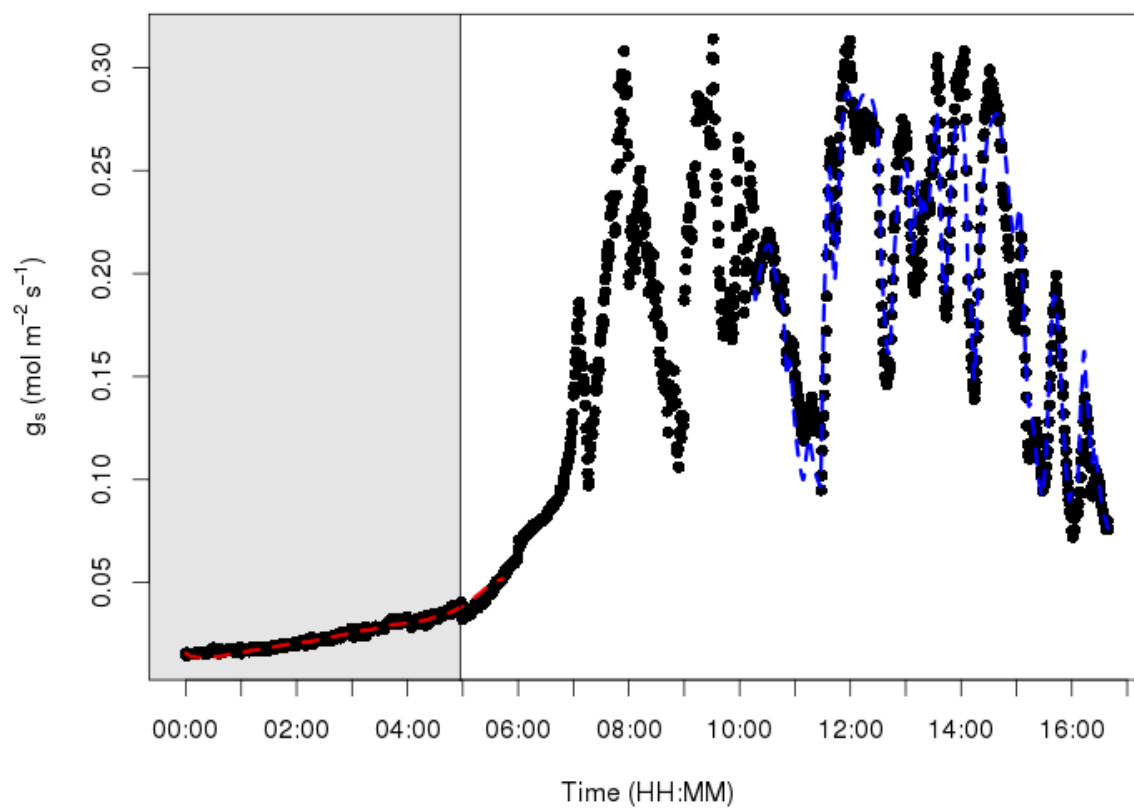


Figure 23: Conductance stomatique (g_s) observée (noir) vs modélisée (rouge et bleue) au cours d'une cinétique journalière. Les courbes rouge et bleue correspondent respectivement à la partie nocturne et éclairée modélisées à partir des moyennes des paramètres provenant de l'inférence bayésienne.

5. Performance du modèle dynamique au cours d'un cycle journalier

Ce nouveau modèle dynamique décrit avec justesse les variations de g_s au cours du temps avec un nombre limité de paramètres (Fig. 23). La conductance nocturne et ses variations sont reproduites avec précision ainsi que les variations journalières importantes de g_s . Toutefois, il reste une variabilité résiduelle non expliquée qui montre les limites d'un tel modèle. En effet, les observations réalisées lors de variations instantanées de l'environnement montrent une possible variation des constantes de temps k_{up} et k_{down} en fonction du spectre lumineux et de la pression partielle de CO_2 (Barillot *et al.*, 2010; Vialet-Chabrand *et al.*, 2013b). De plus, il n'existe pour le moment aucune mesure chez le chêne de la réponse de g_s au VPD_l sous différents niveaux d'irradiance qui pourrait permettre de valider le modèle de Mott *et al.* (2012).

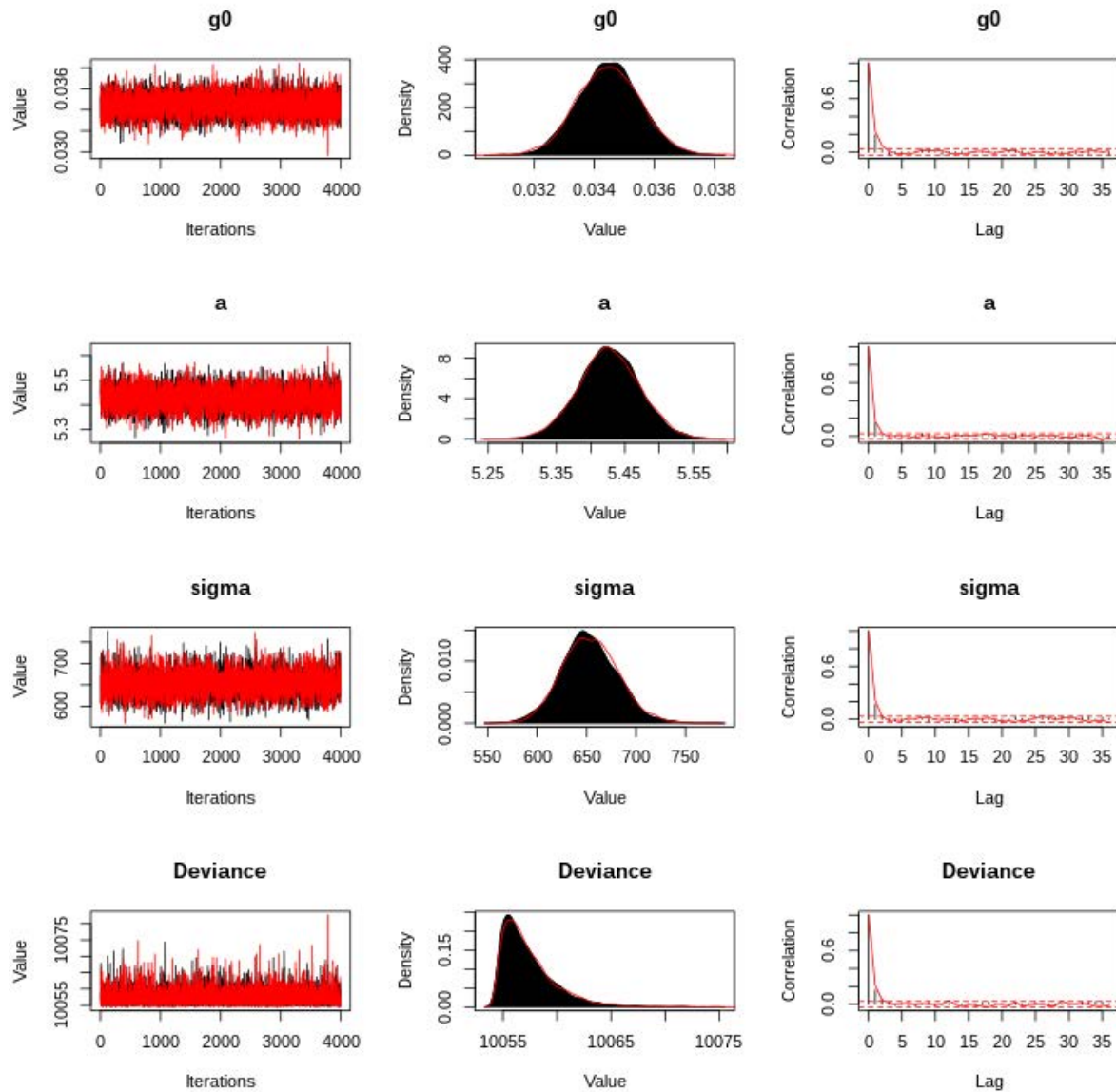


Figure 24: Ajustement des paramètres du modèle de Ball *et al.* (1987) par inférence bayésienne. La première colonne correspond aux valeurs des paramètres enregistrées à différentes itérations de la chaînes. Ces valeurs sont un échantillon représentatif de la distribution a posteriori du paramètre, visible dans la deuxième colonne qui représente la probabilité des valeurs de paramètres compte tenu des données et des connaissances a priori sur le paramètre. La troisième colonne correspond à l'autocorrélation de la chaîne qui caractérise sa vitesse de déplacement et donc sa capacité à explorer l'espace de paramètres. Une décroissance rapide vers 0 est le signe que la chaîne n'a pas de problème pour se déplacer dans l'espace des paramètres.

6. Comparaison du modèle dynamique avec le modèle de Ball et al (1987)

Le modèle de Ball *et al.* (1987) présenté précédemment est souvent utilisé même en modélisation inversée (Zhu *et al.*, 2011). Il est donc intéressant de comparer ses performances avec celles du modèle dynamique. Ici, j'ai utilisé les données enregistrées d'assimilation nette de CO₂ (A) pour simplifier l'ajustement. Cependant, dans le cas d'une prédiction à partir des données microclimatiques, il faudrait définir une boucle itérative incluant un modèle de photosynthèse. On se place donc dans un cas idéal où A est parfaitement prédite. En utilisant une démarche similaire à celle utilisée pour le modèle dynamique, le modèle de Ball est en comparaison plus facile et rapide à paramétrer (environ 5 minutes). Cependant, les paramètres du modèle de Ball sont très peu descriptifs et apportent peu d'information sur le fonctionnement des stomates (Fig. 24). De plus, la qualité de l'ajustement est inférieure à celle du modèle dynamique. L'écart-type représentant l'erreur en chaque point prédit par le modèle de Ball est de 25,5 mmol au lieu de 13,7 mmol m⁻² s⁻¹ pour le modèle dynamique (Fig. 24). La déviance du modèle de Ball est supérieur de 15.4% par rapport au modèle dynamique (Fig. 24).

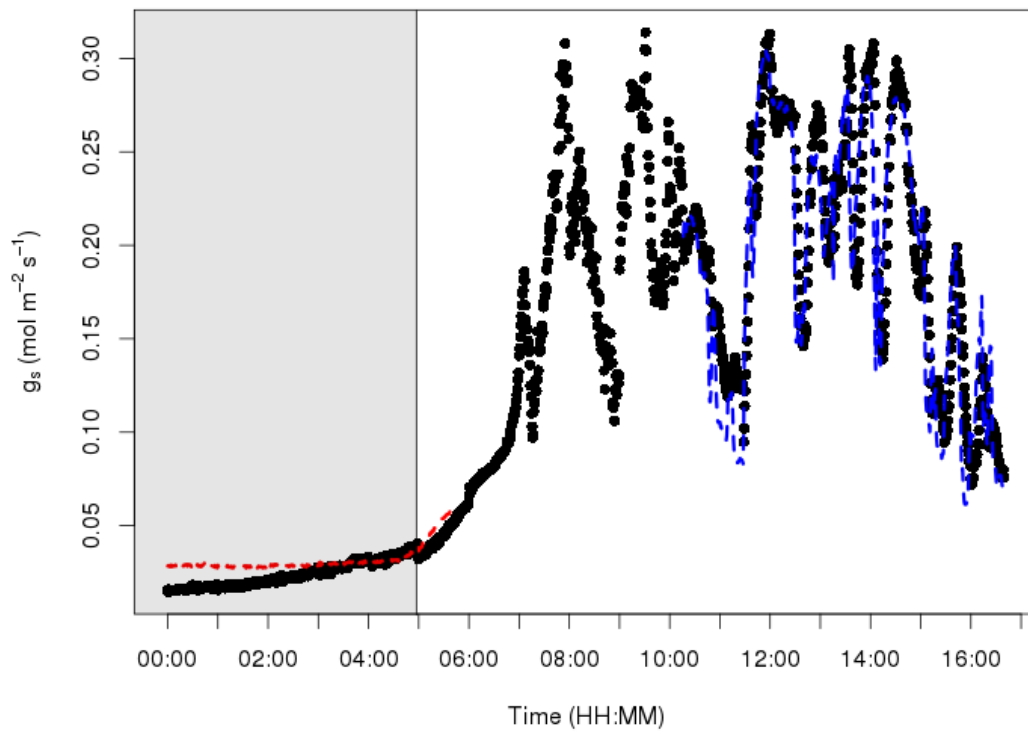


Figure 25: Conductance stomatique (g_s) observée (noir) vs modélisée (rouge et bleue) au cours d'une cinétique journalière. Les courbes rouge et bleue correspondent respectivement à la partie nocturne et éclairée modélisées avec le modèle de Ball *et al.* (1987) à partir des moyennes des paramètres provenant de l'inférence bayésienne.

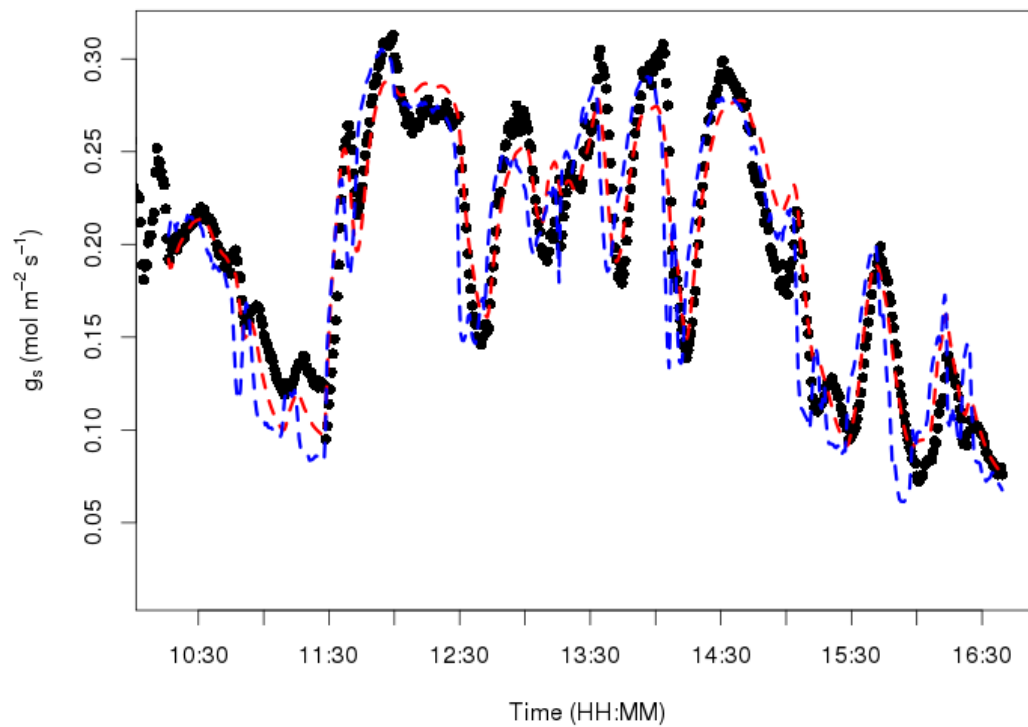


Figure 26: Conductance stomatique (g_s) observée (noir) vs modélisée (rouge: dynamique et bleue: Ball *et al.* (1987)) au cours d'une cinétique journalière. Les modèles sont paramétrés avec les moyennes provenant de l'inférence bayésienne.

Les moins bonnes performances du modèle de Ball sont visibles durant la partie nocturne de l'ajustement (Fig.25) et sur certaines transitions rapides de g_s (Fig. 26). Comme suggéré par Vialet-Chabrand *et al.* (2013b), le modèle de Ball reproduit en partie les réponses temporelles de g_s dans le cas d'une limitation de A par g_s . Dans les autres cas, les prédictions de g_s par le modèle de Ball ont tendance à varier trop vite ce qui aboutit à un décalage temporel par rapport aux observations (Fig. 26). Ces décalages temporels des prédictions du modèle de Ball étaient aussi visibles au cours de cinétiques journalières artificielles (Vialet-Chabrand *et al.*, 2013b). L'ajout de réponses temporelles de g_s (similaire à celle du modèle dynamique) au modèle de Ball n'est pas possible du fait d'hypothèses de base différentes. En effet, avec le modèle de Ball, on ne peut pas prédire la cible G_s en régime permanent nécessaire à la modélisation de la réponse temporelle de g_s . Pour la modélisation inversée, le choix d'un modèle dynamique est donc beaucoup plus informatif et plus précis qu'un modèle steady state.

La différence de performance entre les deux modèles pour décrire les variations temporelles de g_s a des conséquences importantes sur la modélisation des variations journalières de W_i (Fig. 27). En effet, le modèle de Ball utilise une relation linéaire entre A et g_s qui a tendance à moyenniser les variations de W_i sur la journée contrairement au modèle dynamique qui décrit avec justesse les variations fines de W_i . L'impact de la réponse temporelle de g_s sur les variations journalières de W_i est donc important à prendre en compte et va dépendre de l'intensité et de la fréquence des variations micro-climatiques.

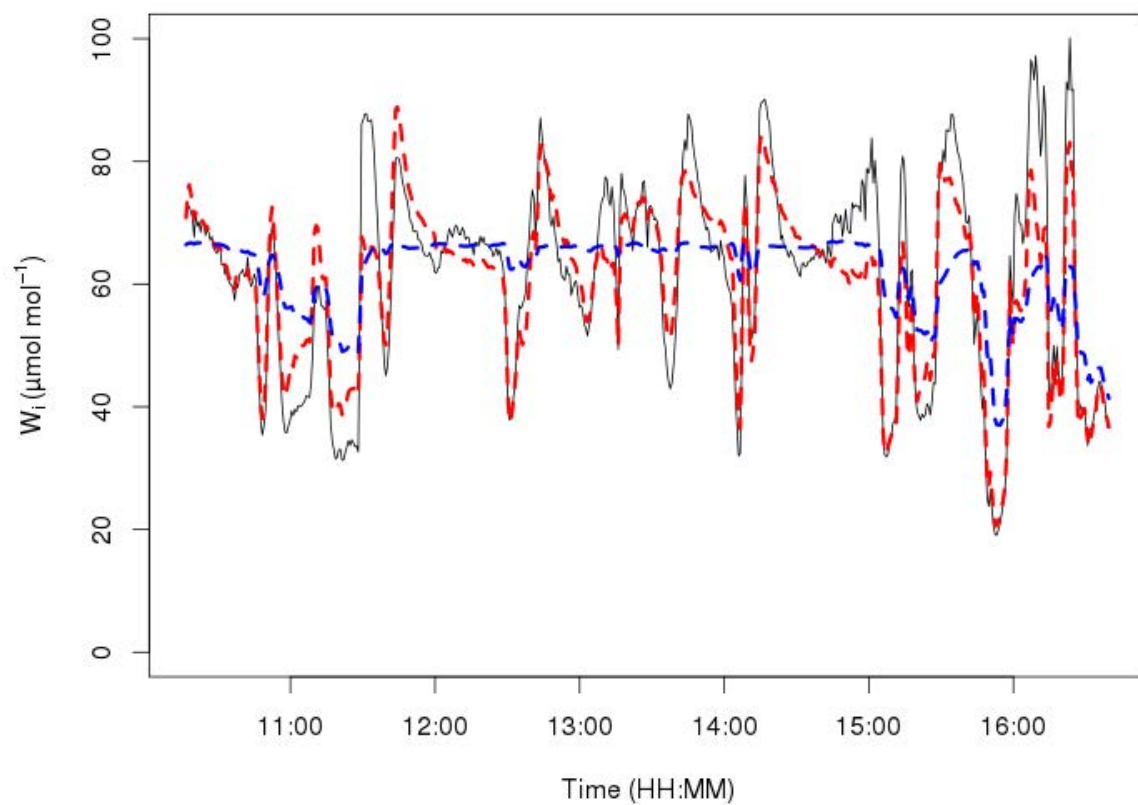


Figure 27: Efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau (W_i) observée (noir) vs modélisée (rouge: dynamique et bleue: Ball *et al.* (1987)) au cours d'une cinétique journalière. Les modèles de conductance stomatique sont paramétrés avec les moyennes provenant de l'inférence bayésienne. L'assimilation nette de CO_2 observée a été utilisée pour calculer W_i .

Conclusions

L'objectif de décrire et modéliser les variations journalières de l'efficience intrinsèque d'utilisation de l'eau (W_i) a été traité au cours de différentes expérimentations. Les résultats ainsi obtenus ont permis de progresser dans la compréhension des causes de la diversité observées de W_i intégrée dans le temps exposées en introduction.

La description des réponses temporelles de g_s suite à un changement brutal des conditions microclimatiques a révélé une plus forte réponse de g_s à la lumière bleue chez le chêne pédonculé que chez le chêne sessile entraînant une diminution plus forte de W_i chez le chêne pédonculé (Violet-Chabrand *et al.*, 2013c) (Annexe 1). Ces différences suggèrent une diversité interspécifique de la perception de la lumière bleue impliquant peut être les phototropines. Après une transition sous un faible CO_2 dans l'air, les chênes afares et liège présentaient une réponse plus forte de g_s que les chênes sessile et pédonculé. Il existerait donc une diversité de la perception du niveau de CO_2 dans la feuille chez ces espèces entraînant une réponse différente de g_s . Les constantes de temps k associées à ces réponses temporelles semblaient influencées par le spectre lumineux chez le chêne pédonculé et sessile. Comme suggéré par Kirschbaum *et al.* (1988), au cours d'une cinétique journalière, les réponses temporelles de g_s seraient dépendantes du spectre lumineux. La diversité des réponses de g_s observées sous différentes conditions microclimatiques suggère un impact de la diversité de la perception des variations microclimatiques sur les variations de W_i au cours d'un cycle journalier.

La diversité des réponses temporelles de g_s observée chez ces espèces peut être décrite soit par la pente maximale de la réponse (Sl_{max}) soit par une constante de temps (k). La différence majeure entre ces deux paramètres est que k est indépendante de la conductance stomatique atteinte en régime permanent (G_s). Comme observé par Drake *et al.* (2013), la densité stomatique, la taille des stomates et Sl_{max} étaient fortement liées (Violet-Chabrand *et al.*, 2013c). Cependant, la relation avec Sl_{max} n'était due qu'à sa dépendance à G_s car la densité stomatique et la taille des stomates ne présentaient aucune relation avec k . Ceci suggère que la rapidité des mouvements stomatiques n'est pas liée à leur taille. Toutefois, cette relation a été testée à un niveau intraspécifique chez des espèces présentant une morphologie foliaire proche. Il est donc possible qu'une relation existe chez des espèces présentant des caractéristiques stomatiques très différentes (Franks et Farquhar, 2007).

La diversité interspécifique des réponses de g_s à l'irradiance mise en évidence précédemment a pu être testée au cours de cinétiques journalières sous des variations continues de l'irradiance (Violet-Chabrand *et al.*, 2013b) (Annexe 2). Sous ces conditions, le modèle dynamique présentait des performances supérieures pour prédire g_s comparé à celles des modèles de Jarvis (1976) et de Ball *et al.* (1987). Ceci nous a permis de mettre en évidence l'importance du suivi en continu des variations du microclimat pour décrire les variations de g_s . L'ajustement des paramètres du modèle dynamique avec ces cinétiques journalières de g_s a mis en évidence des différences inter-spécifiques de la pente de réponse de g_s à l'irradiance (α_G).

De plus, les constantes de temps k , présentaient une importante variabilité inter-individuelle. Ceci semble confirmer les résultats obtenus précédemment concernant la diversité de la perception des variations microclimatiques, ici appliquée à l'irradiance. Pour compléter cette analyse, il serait nécessaire de tester les réponses temporelles de g_s sous différents spectres lumineux (proportion bleu/rouge par exemple) pour confirmer un effet du spectre sur les constantes de temps au cours du cycle journalier.

L'étude au niveau du plant entier des réponses temporelles de g_s durant des transitions lumière/obscurité et obscurité/lumière (Violet-Chabrand *et al.*, 2013a) (Annexe 3) a révélé de fortes similitudes avec les expérimentations réalisées au niveau foliaire. Ainsi, on a pu observer une réponse temporelle sigmoïdale de g_s durant les deux transitions testées, dont les paramètres étaient proches de ceux obtenus au niveau foliaire. Les constantes de temps k présentaient une diversité interspécifique lors du passage à la lumière et une diversité intraspécifique lors du passage à l'obscurité. La diversité des k observés durant la fermeture des stomates pourrait être liée à des différences de respiration foliaire qui entraîneraient une augmentation plus ou moins rapide du niveau de CO_2 dans la feuille et induirait des vitesses de fermeture des stomates différentes (Goh *et al.*, 2011; Fujita *et al.*, 2013). Les différences observées pour k durant l'ouverture stomatique pourraient être dues à des différences de perceptions de la lumière comme suggéré précédemment ou à des différences dans la régulation de l'activité des canaux ioniques au K^+ (Hosy *et al.*, 2003, Lebaudy *et al.*, 2008).

Durant l'obscurité, les mesures de conductance stomatique nocturne en régime permanent et à l'échelle du plant entier étaient significativement différentes de zéro chez toutes les espèces (Annexe 3). Elles ont révélé une forte diversité intra-spécifique de la conductance stomatique nocturne similaire à celle observée chez différentes espèces d'eucalyptus (Phillips *et al.*, 2010; Zeppel *et al.*, 2010). La transpiration nocturne résultante pouvait représenter jusqu'à 30% de celle observée durant la période éclairée montrant l'importance de cette transpiration nocturne dans le bilan hydrique de la plante. Comme suggéré par Dawson *et al.* (2007), les niveaux de conductance stomatique nocturne et leurs variations durant la nuit sont donc des éléments important à prendre en compte pour modéliser g_s durant un cycle journalier complet.

L'ensemble de ces résultats m'a permis de développer un modèle prenant en compte les réponses temporelles de g_s , les variations continues du microclimat et les variations de conductance nocturne. Comparé aux modèles steady-state, ce modèle dynamique permet de décrire avec plus de justesse les variations de g_s que ce soit en conditions contrôlées (Violet-Chabrand *et al.*, 2013b) (Annexe 2) ou naturelles (voir chapitre précédent). Cette plus grande justesse permet une estimation plus fiable des paramètres et donc de leur comparaison entre espèces/individus. De plus, les paramètres décrivant les différentes composantes de la réponse de g_s aux variations du microclimat permettent de détailler l'impact de g_s sur W_i observé au cours d'une journée. Ainsi, la pente de réponse de g_s à l'irradiance (α_G) associé aux constantes de temps pour l'augmentation et la diminution de g_s semblent impacter fortement W_i (Violet-Chabrand *et al.*, 2013b). Pour aller plus loin, il serait nécessaire de lier la diversité de α_G à la diversité de perception du CO_2 lors des variations de A par exemple. Ce modèle permet aussi de tester des réponses hypothétiques sous différentes conditions microclimatiques permettant ainsi de mieux comprendre l'impact de la diversité des réponses temporelles de g_s sur W_i . La seule limitation notable reste le temps nécessaire à l'ajustement des

paramètres lors de la modélisation inversée. Néanmoins, cette limitation est à nuancer car elle dépend des capacités de calcul des ordinateurs qui sont en constante augmentation.

D'un point de vue théorique, la réponse temporelle optimale de g_s est fortement liée à la relation entre l'assimilation nette de CO_2 (A) et la transpiration (E). En effet, au cours d'une augmentation de g_s suite par exemple à une augmentation de l'irradiance, la réponse temporelle optimale de g_s se situe entre une réponse instantanée de g_s pour maximiser le CO_2 disponible pour A et une réponse lente de g_s permettant de minimiser E . Nos observations ont montré une diversité inter et intra spécifique de ce compromis résultant des différentes vitesses d'augmentation de g_s . Durant une diminution de g_s suite à une diminution de l'irradiance par exemple, la réponse optimale pourrait être une diminution instantanée de g_s permettant de réduire E proportionnellement à la diminution de A . Toutefois, en conditions naturelles, on observe une lente réponse des stomates dont la vitesse peut être supérieure ou inférieure à celle observée durant l'augmentation de g_s . Cette asymétrie peut être un avantage dépendant des variations du microclimat. En effet, si la vitesse de diminution de g_s est inférieure à celle de l'ouverture, g_s aura tendance à conserver des valeurs plus élevées au cours du temps. Ces valeurs plus élevées permettraient alors une diminution de la limitation de A par g_s et donc d'augmenter A dans le cas de fluctuations rapides de l'irradiance par exemple. Inversement, si la vitesse de diminution de g_s est supérieure à celle de l'augmentation, g_s présentera des valeurs plus faibles au cours du temps, ce qui pourrait aboutir à une diminution d' E et probablement de A . Dans des conditions hydriques limitantes, une diminution d' E pourrait alors représenter un avantage.

Au cours de cette thèse, la réponse temporelle de g_s au VPD_i a été peu étudiée. Toutefois, l'étude de cette réponse en conditions expérimentales permettrait d'améliorer les performances des modèles dynamiques au cours des variations journalières. De plus, il serait intéressant de tester les réponses temporelles de g_s à différents moments de la journée pour détecter d'éventuels effets de l'accumulation des sucres dans les cellules de garde par exemple (Nikinmaa *et al.*, 2013). Pour cela, un couplage des modèles dynamiques de g_s avec le modèle de photosynthèse de (Farquhar *et al.*, 1980) permettrait une meilleure compréhension des limitations de A par g_s durant la journée.

L'idée suggérée par Cowan et Farquhar (1977), d'une consigne A/E en régime permanent est compatible avec l'idée d'une balance entre la perception du CO_2 à l'intérieur de la feuille (Mott *et al.*, 2008; Fujita *et al.*, 2013) et la perception d' E par les cellules de garde (Peak et Mott, 2011; Mott et Peak, 2012). En effet, une augmentation de l'irradiance s'accompagne généralement d'une augmentation de A , ce qui entraîne une baisse du CO_2 à l'intérieur de la feuille et provoque en réponse une augmentation de g_s . L'augmentation de g_s sera la résultante de l'interaction entre la réponse à la diminution du CO_2 dans la feuille et la réponse à l'augmentation E en fonction du VPD_i . L'augmentation d' E sera en dernière limite régulée pour maintenir un potentiel hydrique foliaire stable (Dzikiti *et al.*, 2007; Aasamaa et Söber, 2011). Le jeu des limitations conduirait implicitement à une valeur stable de A/E sur le long terme. La diversité des réponses de g_s observées aux différentes variables microclimatiques (Violet-Chabrand *et al.*, 2013c) expliquerait alors en partie la diversité de WUE .

En présence de lumière, ce compromis entre A et E permet d'expliquer les variations de g_s en fonction des conditions microclimatiques. Toutefois, de nombreuses études ont détecté une transpiration nocturne pouvant représenter jusqu'à 30% de celle en condition éclairée. Cette transpiration nocturne ne s'accompagne d'aucune photosynthèse et le compromis entre A et E ne peut plus expliquer cette transpiration. Le rôle de cette transpiration nocturne est encore sujet à débat et nécessiterait donc de plus vastes investigations.

La généralisation à une échelle plus large de la démarche utilisée au cours de ces travaux pose plusieurs problèmes: (i) la nécessité de suivre en continu les variations microclimatiques n'est pas compatible avec les mesures semi-horaires réalisées dans le cadre de projets de mesure de flux à large échelle comme FLUXNET (Baldocchi *et al.*, 2001), (ii) le surcoût en temps de calcul nécessaire pour traiter des données sur plusieurs années serait très important, (iii) les connaissances sur la diversité des réponses temporelles de g_s aux variations du microclimat ne sont pas encore suffisantes pour l'intégrer à l'échelle de la canopée. Une partie de ces problèmes sont d'ordre technique et pourraient être résolus dans le futur. Le suivi en continu des variables microclimatiques pourrait se limiter à l'irradiance par exemple, qui par calcul du bilan d'énergie au niveau foliaire permettrait d'approximer les variations d'autres variables climatiques. Les mesures des réponses temporelles de g_s à l'échelle du plant entier suggèrent que des constantes de temps définies à plus large échelle seraient suffisantes pour un modèle « big leaf » (Violet-Chabrand *et al.*, 2013a). La prise en compte de l'échelle temporelle des variations de g_s nécessite donc encore de nombreuses expérimentations.

Bibliographie

Aasamaa K, Söber A. 2011. Responses of stomatal conductance to simultaneous changes in two environmental factors. *Tree Physiology* **31**, 855–64.

Assmann SM. 1988. Enhancement of the stomatal response to blue light by red light, reduced intercellular concentrations of CO₂, and low vapor pressure differences. *Plant Physiology* **87**, 226–231.

Bacon MA. 2004. *Water use efficiency in plant biology* (O [GBR] : Blackwell, Ed.).

Baldocchi D, Falge E, Gu L, Olson R, Hollinger D, Running S, Anthoni P, Bernhofer C, Davis K, Evans R, et al. 2001. FLUXNET: A new tool to study the temporal and spatial variability of ecosystem-scale carbon dioxide, water vapor, and energy flux densities. *Bulletin of the American Meteorological Society* **82**, 2415–2434.

Ball J, Woodrow LE, Berry JA. 1987. A model predicting stomatal conductance and its contribution to the control of photosynthesis under different environmental conditions. In: Biggins J, ed. *Progress in Photosynthesis research*. Nijhoff, Dordrecht, 221–224.

Barbour MM, Buckley TN. 2007. The stomatal response to evaporative demand persists at night in *Ricinus communis* plants with high nocturnal conductance. *Plant, Cell & Environment* **30**, 711–21.

Barillot R, Frak E, Combes D, Durand J, Escobar-Gutiérrez AJ. 2010. What determines the complex kinetics of stomatal conductance under blueless PAR in *Festuca arundinacea*? Subsequent effects on leaf transpiration. *Journal of Experimental Botany* **61**, 2795–806.

Bélisle CJP. 1992. Convergence theorems for a class of simulated annealing algorithms on R^d. *Journal of Applied Probability* **29**, 885–895.

Bonal D, Sabatier D, Montpied P, Tremeaux D, Guehl JM. 2000. Interspecific variability of $\delta^{13}\text{C}$ among trees in rainforests of French Guiana: functional groups and canopy integration. *Oecologia* **124**, 454–468.

Brendel O, Handley L, Griffiths H. 2002. Differences in ^{13}C and diameter growth among remnant Scots pine populations in Scotland. *Tree Physiology* **22**, 983–992.

Brendel O, Thiec D, Scotti-Saintagne C, Bodénès C, Kremer A, Guehl J-M. 2007. Quantitative trait loci controlling water use efficiency and related traits in *Quercus robur* L. *Tree Genetics & Genomes* **4**, 263–278.

Briggs WR, Christie JM. 2002. Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends in Plant Science* **7**, 204–210.

Buckley TN, Mott KA, Farquhar GD. 2003. A hydromechanical and biochemical model of stomatal conductance. *Plant, Cell & Environment* **26**, 1767–1785.

Caird MA, Richards JH, Hsiao TC. 2007. Significant transpirational water loss occurs throughout the night in field-grown tomato. *Functional Plant Biology* **34**, 172.

Chen SH, Jakeman AJ, Norton JP. 2008. Artificial Intelligence techniques: An introduction to their use for modelling environmental systems. *Mathematics and Computers in Simulation* **78**, 379–400.

Condon A, Richards R, Farquhar G. 1993. Relationships between carbon isotope discrimination, water use efficiency and transpiration efficiency for dryland wheat. *Australian Journal of Agricultural Research* **44**, 1693.

Condon AG, Richards RA, Rebetzke GJ, Farquhar GD. 2002. Improving intrinsic water-use efficiency and crop yield. *Crop Science* **42**, 122–131.

Condon AG, Richards RA, Rebetzke GJ, Farquhar GD. 2004. Breeding for high water-use efficiency. *Journal of Experimental Botany* **55**, 2447–60.

Cowan IR, Farquhar GD. 1977. Stomatal function in relation to leaf metabolism and environment. *Symposia of the Society for Experimental Biology* **31**, 471–505.

Damour G, Simonneau T, Cochard H, Urban L. 2010. An overview of models of stomatal conductance at the leaf level. *Plant, Cell & Environment* **33**, 1419–38.

Dawson TE, Burgess SSO, Tu KP, Oliveira RS, Santiago LS, Fisher JB, Simonin KA, Ambrose AR. 2007. Nighttime transpiration in woody plants from contrasting ecosystems. *Tree Physiology* **27**, 561–575.

Dewar RC. 2002. The Ball-Berry-Leuning and Tardieu-Davies stomatal models: synthesis and extension within a spatially aggregated picture of guard cell function. *Plant, Cell & Environment* **25**, 1383–1398.

Dietze MC, Lebauer DS, Kooper R. 2012. On improving the communication between models and data. *Plant, Cell & Environment*.

Douthe C, Dreyer E, Brendel O, Warren CR. 2012. Is mesophyll conductance to CO₂ in leaves of three Eucalyptus species sensitive to short-term changes of irradiance under ambient as well as low O₂? *Functional Plant Biology* **39**, 435.

Drake PL, Froend RH, Franks PJ. 2013. Smaller, faster stomata: scaling of stomatal size, rate of response, and stomatal conductance. *Journal of Experimental Botany* **64**, 495–505.

Dvorak WS. 2012. Water use in plantations of eucalypts and pines: a discussion paper from a tree breeding perspective. *International Forestry Review* **14**, 110–119.

Dzikiti S, Steppe K, Lemeur R, Milford JR. 2007. Whole-tree level water balance and its implications on stomatal oscillations in orange trees [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] under natural climatic conditions. *Journal of Experimental Botany* **58**, 1893–901.

- Farquhar GD, Caemmerer S, Berry JA.** 1980. A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta* **149**, 78–90.
- Farquhar G, Richards R.** 1984. Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Australian Journal of Plant Physiology* **11**, 539.
- Flexas J, Barbour MM, Brendel O, Cabrera HM, Carriquí M, Díaz-Espejo A, Douthe C, Dreyer E, Ferrio JP, Gago J, et al.** 2012. Mesophyll diffusion conductance to CO₂: an unappreciated central player in photosynthesis. *Plant Science* **193-194**, 70–84.
- Flood PJ, Harbinson J, Aarts MGM.** 2011. Natural genetic variation in plant photosynthesis. *Trends in Plant Science* **16**, 327–35.
- Franks PJ.** 2004. Stomatal control and hydraulic conductance, with special reference to tall trees. *Tree Physiology* **24**, 865–878.
- Franks PJ, Farquhar GD.** 2007. The mechanical diversity of stomata and its significance in gas-exchange control. *Plant Physiology* **143**, 78–87.
- Fredeen AL, Sage RF.** 1999. Temperature and humidity effects on branchlet gas-exchange in white spruce: an explanation for the increase in transpiration with branchlet temperature. *Trees* **14**, 0161.
- Fujita T, Noguchi K, Terashima I.** 2013. Apoplastic mesophyll signals induce rapid stomatal responses to CO₂ in *Commelina communis*. *New Phytologist* **2** doi: **10.1111/nph.12261**, 1-12.
- Gaastra P.** 1959. Photosynthesis of crop plants as influenced by light, carbon dioxide, temperature, and stomatal diffusion resistance. Thesis, Wageningen University.
- Goh C-H, Ko S-M, Park Y-I, Kim C-S, Song K-J.** 2011. Regulation of dark-induced stomatal closure in *Arabidopsis* dynamin-like protein 1E (adl1e) mutant leaves. *Journal of Plant Biology* **54**, 112–118.
- Grantz DA, Moore PH, Zeiger E.** 1987. Stomatal responses to light and humidity in sugarcane: prediction of daily time courses and identification of potential selection criteria. *Plant, Cell & Environment* **10**, 197–204.
- Guehl J-M, Fort C, Ferhi A.** 1995. Differential response of leaf conductance, carbon isotope discrimination and water-use efficiency to nitrogen deficiency in maritime pine and pedunculate oak plants. *New Phytologist* **131**, 149–157.
- Haario H, Saksman E, Tamminen J.** 2001. An Adaptive Metropolis Algorithm. *Bernoulli* **7**, 223–242.
- Hari P, Makela A, Korpilahti E, Holmberg M.** 1986. Optimal control of gas exchange. *Tree Physiology* **2**, 169–175.

Hedrich R, Marten I. 1993. Malate-induced feedback regulation of plasma membrane anion channels could provide a CO₂ sensor to guard cells. *The EMBO Journal* **12**, 897.

Hetherington AM, Woodward FI. 2003. The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature* **424**, 901–8.

Hosy E, Vavasseur A, Mouline K, Dreyer I, Gaymard F, Porée F, Boucherez J, Lebaudy A, Bouchez D, Very A-A, et al. 2003. The Arabidopsis outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 5549–54.

Hu H, Boisson-Dernier A, Israelsson-Nordström M, Böhmer M, Xue S, Ries A, Godoski J, Kuhn JM, Schroeder JI. 2010. Carbonic anhydrases are upstream regulators of CO₂-controlled stomatal movements in guard cells. *Nature Cell Biology* **12**, 87–93; sup pp 1–18.

Iino M, Ogawa T, Zeiger E. 1985. Kinetic properties of the blue-light response of stomata. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **82**, 8019–8023.

Jarvis PG. 1976. The interpretation of the variations in leaf water potential and stomatal conductance found in canopies in the field. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **273**, 593–610.

Jarvis P, McNaughton K. 1986. Stomatal control of transpiration: scaling up from leaf to region. *Advances in Ecological Research* **15**, 1–49.

Jones H. 1992. *Plants and microclimate: a quantitative approach to environmental plant physiology*. Cambridge University Press.

Kaiser H. 2000. In situ observation of stomatal movements and gas exchange of *Aegopodium podagraria* L. in the understorey. *Journal of Experimental Botany* **51**, 1741–1749.

Kim T-H, Böhmer M, Hu H, Nishimura N, Schroeder JI. 2010. Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 561–91.

Kinoshita T, Doi M, Suetsugu N, Kagawa T, Wada M, Shimazaki K. 2001. Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* **414**, 656–60.

Kirschbaum MUF, Gross LJ, Pearcy RW. 1988. Observed and modelled stomatal responses to dynamic light environments in the shade plant *Alocasia macrorrhiza*. *Plant, Cell & Environment* **11**, 111–121.

Košvancová-Zitová M, Urban O, Navrátil M, Špunda V, Robson TM, Marek M V. 2009. Blue radiation stimulates photosynthetic induction in *Fagus sylvatica* L. *Photosynthetica* **47**, 388–398.

Lange OL, Lösch R, Schulze E-D, Kappen L. 1971. Responses of stomata to changes in humidity. *Planta* **100**, 76–86.

Lauteri M, Pliura A, Monteverdi MC, Brugnoli E, Villani F, Eriksson G. 2004. Genetic variation in carbon isotope discrimination in six European populations of *Castanea sativa* Mill. originating from contrasting localities. *Journal of Evolutionary Biology* **17**, 1286–96.

Lawson T. 2009. Guard cell photosynthesis and stomatal function. *The New Phytologist* **181**, 13–34.

Lebaudy A, Vavasseur A, Hosy E, Dreyer I, Leonhardt N, Thibaud J-B, Very A-A, Simonneau T, Sentenac H. 2008. Plant adaptation to fluctuating environment and biomass production are strongly dependent on guard cell potassium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 5271–5276.

Lee M, Choi Y, Burla B, Kim Y-Y, Jeon B, Maeshima M, Yoo J-Y, Martinoia E, Lee Y. 2008. The ABC transporter AtABCB14 is a malate importer and modulates stomatal response to CO₂. *Nature Cell Biology* **10**, 1217–23.

Leuning R. 1995. A critical appraisal of a combined stomatal-photosynthesis model for C₃ plants. *Plant, Cell & Environment* **18**, 339–355.

Loriaux SD, Avenson TJ, Welles JM, McDermitt DK, Eckles RD, Riensche B, Genty B. 2013. Closing in on maximum yield of chlorophyll fluorescence using a single multiphase flash of sub-saturating intensity. *Plant, Cell & Environment*.

Maier-Maercker U. 1983. The role of peristomatal transpiration in the mechanism of stomatal movement. *Plant, Cell & Environment* **6**, 369–380.

Marjoram P, Molitor J, Plagnol V, Tavaré S. 2003. Markov chain Monte Carlo without likelihoods. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 15324–8.

Medlyn BE, Duursma RA, Eamus D, Ellsworth DS, Prentice IC, Barton CVM, Crous KY, De Angelis P, Freeman M, Wingate L. 2011. Reconciling the optimal and empirical approaches to modelling stomatal conductance. *Global Change Biology* **17**, 2134–2144.

Misson L, Panek J a, Goldstein AH. 2004. A comparison of three approaches to modeling leaf gas exchange in annually drought-stressed ponderosa pine forests. *Tree Physiology* **24**, 529–541.

Mott K a, Peak D. 2012. Testing a vapour-phase model of stomatal responses to humidity. *Plant, Cell & Environment*, 936–944.

Mott K a, Sibbersen ED, Shope JC. 2008. The role of the mesophyll in stomatal responses to light and CO₂. *Plant, Cell & Environment* **31**, 1299–306.

- Musselman RC, Minnick TJ.** 2000. Nocturnal stomatal conductance and ambient air quality standards for ozone. *Atmospheric Environment* **34**, 719–733.
- Nelder JA, Mead R.** 1965. A simplex method for function minimization. *The Computer Journal* **7**, 308–313.
- Ng PAP, Jarvis PG.** 1980. Hysteresis in the response of stomatal conductance in *Pinus sylvestris* L. needles to light: observations and a hypothesis. *Plant, Cell & Environment* **3**, 207–216.
- Nikinmaa E, Hölttä T, Hari P, Kolari P, Mäkelä A, Sevanto S, Vesala T.** 2013. Assimilate transport in phloem sets conditions for leaf gas exchange. *Plant, Cell & Environment* **36**, 655–69.
- Van Oijen M, Rougier J, Smith R.** 2005. Bayesian calibration of process-based forest models: bridging the gap between models and data. *Tree Physiology* **25**, 915–927.
- Ooba M, Takahashi H.** 2003. Effect of asymmetric stomatal response on gas-exchange dynamics. *Ecological Modelling* **164**, 65–82.
- Oren R, Sperry JS, Katul GG, Pataki DE, Ewers BE, Phillips N, Schäfer KVR.** 1999. Survey and synthesis of intra- and interspecific variation in stomatal sensitivity to vapour pressure deficit. *Plant, Cell & Environment* **22**, 1515–1526.
- Outlaw WH, Lowry OH.** 1977. Organic acid and potassium accumulation in guard cells during stomatal opening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 4434–8.
- Outlaw W, Manchester J.** 1979. Guard cell starch concentration quantitatively related to stomatal aperture. *Plant Physiology* **64**, 79–82.
- Patrick LD, Ogle K, Tissue DT.** 2009. A hierarchical Bayesian approach for estimation of photosynthetic parameters of C₃ plants. *Plant, Cell & Environment* **32**, 1695–709.
- Peak D, Mott K a.** 2011. A new, vapour-phase mechanism for stomatal responses to humidity and temperature. *Plant, Cell & Environment* **34**, 162–78.
- Phillips NG, Lewis JD, Logan BA, Tissue DT.** 2010. Inter- and intra-specific variation in nocturnal water transport in *Eucalyptus*. *Tree Physiology* **30**, 586–96.
- Radin JW, Hartung W, Kimball BA, Mauney JR.** 1988. Correlation of stomatal conductance with photosynthetic capacity of cotton only in a CO₂-enriched atmosphere: mediation by abscisic acid?. *Plant Physiology* **88**, 1058–1062.
- Ritchie SW, Nguyen HT, Holaday AS.** 1987. Genetic diversity in photosynthesis and water-use efficiency of wheat and wheat relatives. *Journal of Cellular Biochemistry* **35**, 43.

Roelfsema MRG, Hanstein S, Felle HH, Hedrich R. 2002. CO₂ provides an intermediate link in the red light response of guard cells. *The Plant Journal* **32**, 65–75.

Roelfsema MRG, Konrad KR, Marten H, Psaras GK, Hartung W, Hedrich R. 2006. Guard cells in albino leaf patches do not respond to photosynthetically active radiation, but are sensitive to blue light, CO₂ and abscisic acid. *Plant, Cell & Environment* **29**, 1595–1605.

Roussel M, Thiec D, Montpied P, Ningre N, Guehl J-M, Brendel O. 2009. Diversity of water use efficiency among *Quercus robur* genotypes: contribution of related leaf traits. *Annals of Forest Science* **66**, 408–408.

Schulze E-D, Lange OL, Buschbom U, Kappen L, Evenari M. 1972. Stomatal responses to changes in humidity in plants growing in the desert. *Planta* **108**, 259–270.

Schulze E-D, Lange OL, Kappen L, Buschbom U, Evenari M. 1973. Stomatal responses to changes in temperature at increasing water stress. *Planta* **110**, 29–42.

Shimazaki K, Doi M, Assmann SM, Kinoshita T. 2007. Light regulation of stomatal movement. *Annual review of plant biology* **58**, 219–47.

Snyder KA. 2003. Night-time conductance in C₃ and C₄ species: do plants lose water at night? *Journal of Experimental Botany* **54**, 861–865.

Su Y, Zhu G, Miao Z, Feng Q, Chang Z. 2009. Estimation of parameters of a biochemically based model of photosynthesis using a genetic algorithm. *Plant, Cell & Environment* **32**, 1710–23.

Taiz L, Zeiger E. 2006. *Plant Physiology*. Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc.

Talbott L, Shmayevich I. 2003. Blue light and phytochrome-mediated stomatal opening in the npq1 and phot1 phot2 mutants of Arabidopsis. *Plant Physiology* **133**, 1522–1529.

Talbott L, Zeiger E. 1996. Central roles for potassium and sucrose in guard-cell osmoregulation. *Plant Physiology* **111**, 1051–1057.

Talbott LD, Zeiger E. 1998. The role of sucrose in guard cell osmoregulation. *Journal of Experimental Botany* **49**, 329–337.

Tholen D, Boom C, Zhu X. 2012. Opinion: prospects for improving photosynthesis by altering leaf anatomy. *Plant Science* **197**, 92–101.

Toni T, Welch D, Strelkowa N, Ipsen A, Stumpf MP. 2009. Approximate Bayesian Computation scheme for parameter inference and model selection in dynamical systems. *Journal of The Royal Society Interface* **6**, 187–202.

Violet-Chabrand S, Dreyer E, Brendel O. 2013a. Assessing and modelling the dynamic variations of whole plant transpiration during light-dark transitions in different oak species. (A soumettre à *Journal of Experimental Botany*)

Vialet-Chabrand S, Dreyer E, Brendel O. 2013b. Performance of a new dynamic model for predicting diurnal time courses of stomatal conductance at the leaf level. *Plant, Cell & Environment*. doi: 10.1111/pce.12086

Vialet-Chabrand S, Dreyer E, Le Thiec D, Brendel O. 2013c. Dynamics of stomatal responses to red light, blue light and CO₂ are not linked with stomatal size in oaks. (A soumettre à *Plant, Cell & Environment*)

Vico G, Manzoni S, Palmroth S, Katul G. 2011. Effects of stomatal delays on the economics of leaf gas exchange under intermittent light regimes. *The New Phytologist* **192**, 640–52.

Wang Q. 1997. Using genetic algorithms to optimise model parameters. *Environmental Modelling & Software* **12**, 27–34.

Will RE, Teskey RO. 1999. Influence of rate of change in stomatal conductance to fluctuating irradiance on estimates of daily water use by *Pinus taeda* leaves. *Tree Physiology* **19**, 761–765.

Wullschlegel SD, Meinzer FC, Vertessy RA. 1998. A review of whole-plant water use studies in tree. *Tree Physiology* **18**, 499–512.

Yang T, Liang Z, Xue J, Kang S. 2005. Diversity of water use efficiency in various maize varieties. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering* **21**, 21–25.

Yoo CY, Pence HE, Hasegawa PM, Mickelbart M V. 2009. Regulation of transpiration to improve crop water use. *Critical Reviews in Plant Sciences* **28**, 410–431.

Zeiger E, Field C. 1982. Photocontrol of the functional coupling between photosynthesis and stomatal conductance in the intact leaf: blue light and PAR-dependent photosystems in guard cells. *Plant Physiology* **70**, 370–5.

Zeiger E, Zhu J. 1998. Role of zeaxanthin in blue light photoreception and the modulation of light-CO₂ interactions in guard cells. *Journal of Experimental Botany* **49**, 433–442.

Zeppel M, Tissue D, Taylor D, Macinnis-Ng C, Eamus D. 2010. Rates of nocturnal transpiration in two evergreen temperate woodland species with differing water-use strategies. *Tree Physiology* **30**, 988–1000.

Zhu G-F, Li X, Su Y-H, Lu L, Huang C-L. 2011. Seasonal fluctuations and temperature dependence in photosynthetic parameters and stomatal conductance at the leaf scale of *Populus euphratica* Oliv. *Tree Physiology* **31**, 178–95.

Annexe 1

Assessing and modelling the dynamic variations of whole plant transpiration
after light-dark transitions in different oak species.

Short title: Whole plant transpiration after light-dark transitions

Authors: Silvère Vialet-Chabrand^{1,2}, Erwin Dreyer^{1,2}, Oliver Brendel^{1,2,3}

Addresses:

¹ INRA, UMR1137 "Ecologie et Ecophysiologie Forestières", F-542802 CHAMPENOUX

² Université de Lorraine, UMR1137 "Ecologie et Ecophysiologie Forestières", Faculté des Sciences, F-
54500 VANDOEUVRE

³ Corresponding author

Emails:

svialet@nancy.inra.fr, dreyer@nancy.inra.fr, brendel@nancy.inra.fr

Additional keywords:

Stomatal conductance, transpiration, temporal response, night-time

Abstract:

Under fluctuating microclimate, slow temporal responses of stomatal conductance (g_s) may have an important impact on whole plant transpiration. We assessed and modelled the temporal response of g_s and transpiration at whole plant scale after light-to-dark and dark-to-light transitions. Our dynamic model of g_s accurately reproduced the time course of water loss recorded by weighing potted plants of two temperate and two mediterranean oak species. This allowed estimating time constants and time lags of the temporal responses of g_s for the whole plant. Large intraspecific differences were detected for night-time g_s under steady state conditions and for the time constants of g_s after light-to-dark transitions. Moreover, large time lags were detected in all individuals. Large interspecific differences were detected for day-time g_s , time constants and time lags after dark-to-light transitions suggesting a different control between light-to-dark and dark-to-light transitions. The diversity of the temporal responses of g_s impacted significantly whole plant water loss, which highlights their importance for the water budget of plants. Under natural conditions, such a diversity of temporal responses of g_s may be an important trait for the control of water use by plants.

Introduction

Stahl (1894) already observed, in contradiction to the opinion of some of his contemporaries, that most of the plant species that he investigated did not completely close their stomata during night. Since this observation, a large diversity was observed in the magnitude of night-time transpiration (E_{night}) among different species (Rosado *et al.*, 2012; Barbeta *et al.*, 2012). The rate of E_{night} depends on the vapour pressure deficit between leaf and air (VPD) and is modulated by two conductances in series: the boundary layer conductance (g_b) and the night-time stomatal conductance to water vapour (g_{night}) (Caird *et al.*, 2007a; Phillips *et al.*, 2010). Wind speed and leaf anatomy determine g_b that partly controls the vapour pressure gradient between leaf to air. There is experimental evidence that g_{night} can be decreased for example in response to drought or abscisic acid (ABA). This suggests that g_{night} is not only the result of an incomplete closure due to wax and/or shape of stomata (Caird *et al.*, 2007a). Transpiration can also occur through the cuticle via cuticular conductance (g_c), in parallel to transpiration through stomata. However, estimations of cuticular conductance in different species showed that it represents only a small fraction of g_{night} (Caird *et al.*, 2007a; Howard and Donovan, 2007; Zeppel *et al.*, 2010).

A large diversity of g_{night} and of night/day ratio of g_s was displayed among species (Musselman and Minnick, 2000; Snyder, 2003) and among genotypes within species (Christman *et al.*, 2008, 2009b; Howard and Donovan, 2010). Variations of g_{night} have been reported in the literature to be independent from the environmental conditions of the previous day (Cavender-Bares *et al.*, 2007; Barbour and Buckley, 2007; Christman *et al.*, 2009a) with some exceptions (Blom-Zandstra *et al.*, 1995; Christman *et al.*, 2008; Easlon and Richards, 2009). Moreover, responses of g_{night} have been shown for VPD , wind speed, CO_2 and drought (Caird *et al.*, 2007a). However, the advantage to maintain stomata open during the night in the absence of photosynthesis remain unclear (Caird *et al.*, 2007a; Cavender-Bares *et al.*, 2007; Barbour and Buckley, 2007; Easlon and Richards, 2009; Zeppel *et al.*, 2012). Maintaining a significant E_{night} might enhance nutrient acquisition (Scholz *et al.*, 2007; Kupper *et al.*, 2012) and a significant g_{night} might prevent a build up of CO_2 within the leaves (Marks and Lechowicz, 2007; Bouma *et al.*, 1995), or a faster increase of net photosynthesis during early morning (Daley and Phillips, 2006; Dawson *et al.*, 2007; Urban *et al.*, 2007).

During the day, the temporal response of g_s can be described by two time constants for increasing or decreasing g_s (Ooba *et al.*, 2003; Vico *et al.*, 2011). This results in an asymmetric response of g_s that impacts intrinsic water use efficiency, the ratio of net CO_2 assimilation (A) to g_s (Vico *et al.*, 2011; Vialet-Chabrand *et al.*, 2013). After a light-to-dark transition, the temporal response of g_s leads to higher g_{night} compared to a theoretical instant response, which results in a

higher water loss (Hosy *et al.*, 2003; Lebaudy *et al.*, 2008). Conversely, after a dark-to-light transition, the slow temporal response of g_s should not only lead to a reduced water loss but also to a limitation of A. The water budget of a plant during a diurnal cycle could therefore depend partly on the asymmetry of time constants between the increase and decrease of g_s . Nevertheless, the impact of the asymmetric temporal response of g_s on whole plant water loss after light-dark transitions as well as its diversity among species has to our knowledge not yet been addressed in the literature. To assess such temporal responses, a dynamic model of g_s is required in order to describe the observed variations of water loss after the transitions as well as to those occurring during steady state g_{night} and g_{day} .

In the literature, different methods have been used to measure g_{night} at various scales and precisions. During the night, leaf gas exchange is recorded with a low precision due to small transpiration rates and with a low accuracy due to the increased relative importance of leaks (Barbour *et al.*, 2005). Moreover, gas exchange records are often restricted to the leaf or branch scale (Daley and Phillips, 2006; Caird *et al.*, 2007b; Cavender-Bares *et al.*, 2007). In contrast, water loss from potted plants or lysimeters records whole plant transpiration and results in a higher accuracy (Hosy *et al.*, 2003; Cavender-Bares *et al.*, 2007; Cirelli *et al.*, 2012). Sap flow recorded in the trunk can also be used to infer whole plant transpiration, however with some artefacts like tissue refilling (Benyon, 1999; Caird *et al.*, 2007b; Zeppel *et al.*, 2012). Eddy covariance records E_{night} only when sufficient turbulence occurs during the night (Fisher *et al.*, 2007; Novick *et al.*, 2009). Records of water loss from potted plants are therefore the most suitable indirect assessment of g_{night} at whole plant scale. In order to derive stomatal conductance from records of whole plant transpiration, estimates of leaf temperature are required to calculate the vapour pressure gradient from leaf to air. However, leaf temperature is often approximated to air temperature (Benyon, 1999; Cavender-Bares *et al.*, 2007). This assumption may lead to an underestimation of g_{night} because night-time leaf temperature is usually lower than air temperature (Jones, 1992).

A common assumption in plant hydraulic considerations, including predawn leaf water potential and models of stomatal conductance, is that g_{night} is equal to zero or to a low value, which leads to potentially large errors when the resulting E_{night} is high. For example, g_{night} is frequently considered to be negligible in order to derive soil water potential from the pre-dawn leaf water potential. By correcting for g_{night} , the estimations of pre-dawn leaf water potential were significantly higher when $VPD > 0.12$ kPa (Hubbart *et al.*, 2007; Kavanagh *et al.*, 2007). From this observation, simple models were developed to more accurately predict soil water potential (Bucci *et al.*, 2005; Zeppel *et al.*, 2010). Moreover, variations of g_{night} are often ignored or not properly handled by all stomatal conductance models (Barbour and Buckley, 2007). Dawson *et al.* (2007) stressed the importance for

plant and site water budgets of including night-time leaf temperature, or g_{night} , or both, in transpiration models.

We propose to estimate the diversity of g_{night} and of the asymmetric temporal response of g_s that impacts water loss after light-dark transitions. Taking into account such temporal effects could enhance the accuracy of transpiration models in predicting water losses. A dynamic model of g_s was used to predict water loss of the whole plant and was adjusted on data of water loss recorded with scales. For assessing the diversity in such responses, four oak species were chosen with two mediterranean (*Quercus suber* L. and *Q. afares* Pomel) and two temperate oak species (*Q. robur* L. and *Q. petraea* Matt. Liebl.). These species display different stomatal responses to changes in irradiance (Violet-Chabrand *et al.*, 2013). Our specific objectives were to:

- quantify and compare the night and day transpiration and stomatal conductance for whole plants under controlled conditions;
- describe the diversity of temporal response of g_s and of transpiration after light-to-dark or dark-to-light transitions;
- quantify the water loss after light-to-dark or dark-to-light transitions induced by the temporal responses of stomatal conductance.

In a first step, we used a descriptive transpiration model to compute g_s during the end of day, the night and the beginning of a new day. In a second step, we developed a predictive model of transpiration that included dynamic responses of g_s and variations of leaf temperature. This model was adjusted to time series of water loss recorded on potted plants to estimate model parameters describing the observed increases and decreases of g_s . The variability of these parameters among individuals and species was assessed. Finally, these parameters were used to estimate the impact of temporal responses of g_s on water loss after a light-to-dark or a dark-to-light transition.

Material and methods

To derive transpiration (E) and stomatal conductance (g_s) from the time course of the weight of potted plants, we used two models assuming the whole plant works like a big leaf.

Descriptive model

Steady state transpiration was estimated by linear regression of water loss as a function of time divided by the leaf area of the whole plant. Total plant conductance (g_t ; $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) was calculated as a function of the molar loss of water per second (E) (Ball, 1987):

$$g_t = E \cdot \frac{1000 - \frac{w_s + w_a}{2}}{w_s - w_a} \quad (1)$$

where w_s is the mole fraction of water vapour within the leaf (mol H₂O mol air⁻¹) derived from leaf temperature with an energy balance (see annex A) and w_a is the mole fraction of water vapour in the air. Stomatal conductance for the whole plant was calculated taking into account the boundary layer conductance (g_b):

$$g_s = \frac{1}{\frac{1}{g_t} - \frac{1}{g_b}} \quad (2)$$

Boundary layer conductance (g_b) was estimated using an aluminium leaf model (see below and annex B).

Predictive model

Water loss was modelled using an analytical dynamic model for stomatal conductance (g_s) (Violet-Chabrand *et al.*, 2013):

$$g_s = \begin{cases} g_1, & t < t_s \\ (g_2 - g_1) \cdot \exp\left(-\exp\left(\frac{1}{k} \cdot (\lambda - t_2) + 1\right)\right) + g_1, & t \geq t_s \end{cases} \quad (3)$$

$$t_2 = t - t_s$$

with g_1 and g_2 the steady state targets of g_s respectively before and after an instant change of irradiance, k the time constant (s), λ the time lag (s) and t_s the time when the change of irradiance occurs (s). Parameters k and λ have the suffix _{up} or _{down} depending whether g_s increases or decreases.

Total conductance (g_t) was calculated by taking into account the boundary layer conductance (g_b , see annex B):

$$g_t = \frac{1}{\frac{1}{g_s} + \frac{1}{g_b}} \quad (4)$$

Transpiration (E) was computed using an equation derived from Eq. 1 from Ball (1987):

$$E = g_t \cdot \frac{w_s - w_a}{1000 - \frac{w_s + w_a}{2}} \quad (5)$$

To estimate w_a and w_s , measured air temperature and relative humidity were estimated at the same pace than the weight records, using spline functions to follow the variations during transition periods.

The rate of weight loss by the whole plant (R ; g H₂O s⁻¹) was estimated as (Pearcy *et al.*, 1989):

$$R = 18 \cdot E \cdot S \quad (6)$$

with S the total leaf area of the plant and 18 the molar mass of water.

The cumulated weight loss (W ; g H₂O) was integrated by linear interpolation between actual measurement intervals:

$$W = \frac{R_{t_2} \cdot (t_2 - t_1) + R_{t_1} \cdot (t_2 - t_1)}{2} \quad (7)$$

with R_{t_1} and R_{t_2} the rates of weight loss at time t_1 and t_2 .

We made the assumption that 3 steady state regimes occurred for g_s : during the end of day 1, in the middle of the night and during the beginning of day 2. This assumption was relevant given that the environment was kept constant during day and during night, with rapid transitions to darkness and to light.

Consequences of the slow temporal response of g_s

After a change in irradiance, the temporal response of g_s was described by defining T_{down} and T_{up} as the time needed to reach 99% of the temporal variation for decreasing and increasing g_s , respectively. Using the adjusted parameters from the Bayesian inference (see below) and replacing them by $k=1s$ and $\lambda=1s$, we compared the impact on water loss of the slow temporal response of g_s and of a theoretical instant response of g_s . Thus, W_{down} and W_{up} were defined as the absolute difference between the predicted weight when g_s reached 99% of the temporal variation and the one predicted if g_s had responded instantaneously. The ratio W_{down} / W_{up} describes the impact of the asymmetry of temporal responses on water loss. A ratio below 1 means water saving due to the asymmetry in the temporal response of g_s .

Bayesian inference

Bayesian inference is able to describe the parameters and their related uncertainty even for

complex models (Van Oijen *et al.*, 2005; Patrick *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2011). To adjust the predictive model on water loss curves with Bayesian inference, we used the R package LaplacesDemon. The LaplacesDemon.hpc function was used with Inter-chain adaptation (INCA, Craiu *et al.*, 2009; Solonen *et al.*, 2012) with global and componentwise adaptive scaling (Andrieu and Thoms, 2008). The adaptive period was 100 iterations and the periodicity was 5 iterations. Three chains with 50000 iterations and a thinning equal to 25 were used to estimate the covariance matrix of parameters. Initial parameter values were chosen randomly in a predefined range (Parameters for decrease/increase: Initial weight of potted plant ± 0.1 g, $g_1/g_2=0.1\pm 0.01$ mol m⁻² s⁻¹, $g_2/g_1=0.02\pm 0.005$ mol m⁻² s⁻¹, $k=1000\pm 200$ s, $\lambda=400\pm 60$, $\sigma=0.3\pm 0.05$). The final algorithm was the random walk metropolis (RWM) algorithm with the covariance matrix estimated previously as parameter. Two chains with 400000 iterations were thinned to keep 2000 representative values of the posterior distribution. Each chain was tested for convergence with the Consort function.

Statistical analysis

Statistical analyses used linear mixed-effects models with the package nlme from the R software. To test for interspecific differences of E and g_s , species were treated as a fixed effect and individuals as a random effect. Normality was tested based on the analysis of the residuals. Differences among species were tested for significance with a Tukeys post-hoc. All statistical results were considered significant when p-value < 0.05.

Model cross-validation

The accuracy of model predictions was tested with a 10-fold cross-validation (see Vialet-Chabrand *et al.*, 2013). During the procedure, a large and variable integration step of transpiration could bias the estimation of water loss. Thus, a spline function was used to estimate the missing values of environmental variables to keep a time step of 30s. The variability of the model accuracy was expressed using the root mean squared error (RMSE):

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (Obs. - Sim.)^2}{N}} \quad (8)$$

Plant material

Four oak species were chosen and qualified as mediterranean (*Quercus suber* L. and *Q. afares* Pomel) or temperate (*Q. robur* L. and *Q. petraea* Matt. Liebl.). Ten litre pots were filled with a 1/1 v/v peat/sand mixture. Plants were grown in climate chambers fitted with a rotating plate to homogenize the mean irradiance received by each individual (Rotoplant, Strader, Angers) and were maintained in well watered conditions. Microclimate in the chambers was: day/night, 16/8 h; air temperature, 25/25 °C; relative humidity, 50/50%; photosynthetic photon flux density (PPFD) at the top of the plants, 700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Independent measurements of irradiance using a quantum sensor (LI-190, Li-Cor, Lincoln, NE; data not shown) were used to verify that there was no systematic difference of irradiance among species.

Whole plant water loss

Whole-plant water loss was recorded by placing each potted plant on a scale and recording the pot weight (± 0.1 g) every 30 seconds for approximately 17h. To prevent water loss through soil evaporation, the entire pot was placed inside a black plastic bag sealed around the stem with adhesive tape. The substrate was irrigated to field capacity the day before measurements. Three plants were measured in parallel with three inter-calibrated scales (Mettler Toledo, KA15s, Germany; two Sartorius-AG, QC65EDE-D, Germany). Total leaf area was measured for each plant with a leaf area meter (ΔT Area Meter MK2, Delta T-Devices, UK) after the experiment. Only data from the Mettler scale were used for adjusting the predictive model after light/dark transitions, given the higher repeatability of this scale under experimental conditions compared to the Sartorius scales.

Cuticular conductance

We defined the cuticular conductance (g_c) as the inverse of the resistance to the diffusion of water through the cuticle with stomata at maximal closure. It was estimated by weighting excised leaves pre-treated with ABA (Rawson and Clarke, 1988). The petiole of an excised leaf was immediately plunged into an ABA solution and the leaf blade sprayed with the same solution (100 μM , Bradford, 1983). After 15 minutes, the petiole was sealed with wax and the weight loss was recorded in the dark at ambient temperature with a precision scale (Sartorius-AG, RC210D, Germany) covered with black plastic. Air temperature and relative humidity were recorded every 30s (DL-120TH, Conrad Electronics GmbH, Germany). Cuticular conductance was derived from the slope of the weight loss (Eq. 1 and 2) between 60% and 20% of the total variation. This minimized on the one hand the risk to include the stomatal component in the water loss and on the other hand mechanical effects for strong desiccation. Measurements included the water loss in parallel through the cuticle

for both faces and through stomata at maximum closure for one face. Thus, we multiplied by a factor 2 the projected leaf surface. As g_b could not be estimated during the measurement of cuticular water loss, two realistic values (0.1 and $0.4 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) were used to test its impact on the estimations of g_c .

Boundary layer conductance

Boundary layer conductance (g_b) was estimated using three aluminium oak leaf replicas with different shapes and sizes. These estimates of g_b were used for the two big leaf models. The leaf replica was cooled on dry ice and the time course of leaf and air temperatures were recorded every 0.5s . The slope of the logarithm of the difference between leaf and air temperature as function of time was used to estimate g_b as described in the annexes (Fig. A1). A thermocouple was placed at the middle of the lower side of the leaf using heat sink grease silicon (ITW Chemtronics, CT40-5, US). The leaf replica was placed close to real leaves under the same environmental conditions in the climate chambers as previously described.

Results

During the dark period, the four oak species displayed a significant transpiration rate per unit leaf area (E_{night} , Fig. 1). The intraspecific variability of E_{night} was large while no interspecific difference was detected (similar results were found for g_s). Large interspecific differences were detected in E_{day} and the ratio E_{night}/E_{day} varied between 0.04 and 0.33 (Fig. 2). E_{night} and E_{day} were not correlated and the mediterranean species with significantly higher E_{day} displayed the minimal and maximal values of E_{night} for *Q. suber* and *Q. afares* respectively (Fig. 1). After an increase and a steady state period, E_{day} decreased continuously (data not shown) during the day in all species despite the constant environment ($T=25\pm0.3^\circ\text{C}$, $RH=50.9\pm1.4\%$, Fig. S1). This induced quite large differences in E_{day} between beginning and end of day (Fig. 1).

Boundary layer conductance (g_b) ranged from 0.374 to $0.472 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ in the three leaf replicas. We decided to set g_b at $0.45 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ for all adjustments. Night-time stomatal conductance g_{night} was significantly different from 0 in all species (Fig. 1). Cuticular conductance g_c only represented 7 to 18% of overall g_{night} (Table 1). These estimates of g_c derived from water loss of severed leaves were not responsive to the value of g_b used (Table 1).

Lower values of g_{day} were recorded during the end of the day than during the beginning, similarly to what was observed for E_{day} (Fig. 1). Mediterranean species always displayed higher g_{day} than temperate species. This difference was not maintained during night, which results in the absence of correlation between g_{night} and g_{day} . Indeed, *Q. afares* displayed the highest g_{night} and *Q. suber* displayed the lowest g_{night} . A large intraspecific variability was recorded for g_{night} (g_2 in Fig. 4 and g_1 in Fig. 5) without any significant interspecific difference (Fig. 1). All species displayed a tendency to decrease g_{night} between the beginning and the end of the night with the largest decrease for *Q. afares* that reduced g_{night} by $0.013 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Fig. 4, g_2 ; Fig. 5, g_1).

The predictive model was able to describe the weight loss after dark-to-light and light-to-dark transitions with an accuracy close to the measurement precision of the scales (Fig. 3a-b; mean RMSE for all species: 0.31 g). The sensitivity of these adjustments to micro-climate data were tested with a 10-fold cross validation of the model and did not reveal any significant deviation of RMSE (mean $\pm$ SD = 0.35 ± 0.086 g). The temporal responses of g_s after a transition (Fig. 3c-d) were used separately to estimate the parameters from the predictive model (Fig. 4 and 6). The precision of parameter estimation was different among individuals but did not reveal any problem of over-parameterization. The lower precision obtained after the light-to-dark transition was due to a tight correlation in the model between the time constant for the decrease of g_s (k_{down}) and the time lag (λ_{down}), in all individuals and species ($p < 0.001$, data not shown). The results displayed interspecific differences for k_{up} with higher values for mediterranean compared to temperate species (Fig. 5). For k_{down} , the large intraspecific variability prevented the detection of interspecific differences (Fig. 4). The time lag λ_{down} was higher than λ_{up} , which induced, after a light-to-dark transition, only a small change of the slope of the predicted rate of weight loss (Fig. 3c). Similarly to k_{down} , λ_{down} displayed only intraspecific variation (Fig. 4), whereas λ_{up} displayed significant interspecific differences (Fig. 5) with a higher λ_{up} for *Q. petraea* compared to the other species.

After a change in irradiance, the slow temporal response of g_s led to water loss or to water saving with respect to a theoretical instant response. The time needed to reach 99% of steady state g_s (T_{down} and T_{up} , Fig. 6) displayed large variations among individuals and species without any significant correlation between T_{down} and T_{up} (Table 2). Nevertheless, asymmetry of the temporal response of g_s resulted in most cases in larger T_{down} than T_{up} except for two individuals of *Q. afares*. The ratio of W_{down} and W_{up} covered a range from 0.46 to 1.42, which represents respectively the water gain and loss due to the temporal response of g_s . The three individuals tested of *Q. suber* displayed the highest ratios (≥ 1.41).

Discussion

Night-time E and g_s

A significant stomatal conductance has been detected during night in numerous species (Caird *et al.*, 2007a; Howard and Donovan, 2007; Zeppel *et al.*, 2010). The seedlings from the four different oak species studied here similarly displayed a significant night-time transpiration (E_{night}), due to the maintenance of a significant stomatal conductance during the night (g_{night}). The cuticular conductance (g_c) estimated with severed and ABA-treated leaves was 5 to 15 times lower than g_{night} . This confirms that E_{night} was not only due to water loss through the cuticle, but mainly to the maintenance of open stomata during the night. Under controlled microclimate, a large intraspecific variability was recorded in g_{night} without any significant interspecific difference, as was previously reported in a natural stand with different eucalypt species (Phillips *et al.*, 2010; Zeppel *et al.*, 2010). Even if the cause of this intraspecific diversity was not identified, it should be taken into account for the prediction of nocturnal water flux in oaks. Snyder *et al.* (2003) suggested that across species and habitats, plants displaying a large day-time stomatal conductance (g_{day}) tend also to display a large g_{night} . This was not the case for the oak seedlings tested here: no consistent relationship was detected between g_{night} and g_{day} among species. However, some authors observed that mature trees displayed lower g_{night} than young trees (Grulke *et al.*, 2004; Phillips *et al.*, 2010), which indicates that the day/night relationship could change with the age of the tree.

Day-time transpiration (E_{day}) was lower at the end compared to the beginning of day, even though environmental conditions were kept constant. Such a diurnal decline of E_{day} (and g_{day}) had been already observed in some species (Lascève *et al.*, 1997; Klein *et al.*, 2003; Lebaudy *et al.*, 2008). Night-time transpiration (E_{night}) was quite substantial and ranged from 4 to 33% of day-time values. Such values are not negligible for the plant water budget and are close to those observed by Dawson *et al.* (2007, various tree species) and Cavender-Bares *et al.* (2007, oaks seedlings). Contrary to *Arabidopsis thaliana* (Lascève *et al.*, 1997), we did not observe a slow increase of E_{night} before transition to light. This reaction, which Lascève *et al.* (1997) linked to the starch metabolism in *A. thaliana*, does not seem present in oaks under the environmental conditions tested here.

The two models used to derive g_s from E were based on the assumption that the whole plant behaves like a big leaf. This is a useful simplification, that nevertheless might induce some minor artefacts due to (i) the mixture of leaves of different ages displaying different g_s in the seedlings and (ii) self-shading among individual leaves inducing also a variability of g_s . Young leaves were shown to have lower E_{day} than mature leaves (Constable and Rawson, 1980; Shirke, 2001). Thus, the proportion

of immature leaves could impact our estimates of E_{day} for the whole plant. However, no systematic leaf age effect on g_{night} was found in the literature: young leaves displayed higher or lower g_{night} than mature leaves depending on species (Musselman and Minnick, 2000; Phillips *et al.*, 2010), or did not differ at all (Howard *et al.*, 2007). Due to self-shading, local irradiance differs among leaves, which could lead to local differences in energy balance and g_{day} . However, this self-shading effect was probably minor for our young plants with a small number of leaves. Moreover, self-shading plays no role during the night and did not affect our estimates of g_{night} .

Temporal response of g_s after light-dark transitions

Cirelli *et al.* (2012) used linear regressions at a pace of several minutes to derive the time course of transpiration from weight losses during a diurnal cycle. This approach only captures large variations of transpiration and overlooks the dynamic of weight loss due to the slow temporal response of g_s . The predictive model used in our study, based on the one described by Vialet-Chabrand *et al.* (2013) provides a more accurate approach, which allows the estimation of steady state as well as of temporal response of g_s .

Blom-Zandstra *et al.* (1995) described the temporal response of g_s after transitions to light and to dark at leaf level. They showed that higher irradiance during the day or extending light period into the normal night resulted in faster g_s decrease after a light-to-dark transition. However, the apparent change in the decreasing rate of g_s was not independent of the simultaneous change of the steady states g_s reached before and after the transition, which makes it difficult to interpret. As our predictive model estimates the time constants of g_s independently of the steady-state levels, we were able to compare them among individuals and species.

Similarly to the results shown here, a large interspecific diversity of the temporal responses of g_s after an instant change of irradiance has already been observed at leaf level (Ooba *et al.*, 2003; Vico *et al.*, 2011). Using our predictive model, we were able to estimate time constants and time lags of g_s at whole plant level, thereby integrating the diversity of temporal responses of the different leaves. The estimated time constants were of the same order of magnitude than the ones estimated for the same species at leaf level for continuous variations of irradiance during the day (Vialet-Chabrand *et al.*, 2013). After a light-to-dark transition, leaf dark respiration rate and therefore CO_2 concentration in the leaf increases, which is a signal for stomatal closure (Kim *et al.*, 2010). Moreover, the rapidity of stomatal closure has been linked to mitochondrial activity in guard cells and thus cytosolic ATP concentration (Goh *et al.*, 2011). The diversity of k_{down} could be partly due to a diversity of guard cells

dark respiration rates among individuals and should be monitored in future studies. Lebaudy *et al.* (2008) suggested that guard cell K_{in} channel activity controls the time constant of stomatal opening, which could explain the interspecific differences observed for k_{up} in this study. These time constants for whole plants and their diversity are important for scaling dynamic models to higher level (e.g. canopy).

Published results at leaf level showed that the slower variations of g_s compared to net CO_2 assimilation (A) impact the water use efficiency (Vico *et al.* 2011; Vialet-Chabrand *et al.*, 2013). As g_s does not reach a steady state value in a fluctuating environment, this results in continuous variations of water use efficiency during the day around a hypothetical optimal value (Vialet-Chabrand *et al.*, 2013). Our results at a whole plant level showed a slow temporal response of g_s similar to those found at leaf level and thus the resulting variations of water use efficiency should be similar. Therefore the diversity of k_{up} , k_{down} , λ_{up} and λ_{down} impacted water loss during our experiment and might also impact the diversity of water use efficiency.

Additionally to the impact of the slow temporal response of g_s on water loss, as also observed by Hosy *et al.* (2003) and Lebaudy *et al.* (2008), our model allowed describing the impact of the time lag on water loss after a light transition. Indeed, after a light-to-dark transition, g_s decreased slowly at first, which resulted in a large time lag λ_{down} in all oak seedlings. This results in an increased water loss compared to a theoretical situation with small or zero λ_{down} . Further, the results revealed a smaller λ_{up} and a higher k_{up} in mediterranean than in temperate species. A small λ_{up} may enable plants to display higher photosynthesis earlier in the morning when the conditions are favourable under mediterranean climate (Otieno *et al.*, 2007). Moreover, a large k_{up} would prevent a rapid increase of g_s and could compensate the larger g_s observed under steady state in mediterranean species compared to the temperate species. Indeed, a low k_{up} would lead to higher water loss in rapidly fluctuating environments with higher values of g_s when environmental conditions become unfavorable.

The temporal responses of g_s observed after transitions to dark or to light led to water loss or water saving compared to theoretical instant responses. Thus, *Q. suber* seemed to be the least water saving because water loss after light-to-dark transition was larger than water saved after dark-to-light transition. Under natural conditions with rapid variations of environment, this could lead to increased water losses but probably also higher photosynthesis. The time to reach 99% of the temporal response of g_s was ranging from 1500 to 5000s suggesting that under natural conditions gradual stomatal closure is still proceeding during early night (Blom-Zandstra *et al.* 1995). The

timescale during which the temporal responses of g_s impacts water loss was largely variable among individuals and illustrates their importance in the water budget of plants.

Conclusion

The steady state value and the slow temporal response of g_s impact the plant water budget in oaks. The rate of nocturnal transpiration represented 5 to 33% of the daily values of species studied here, which represents a significant fraction of the water budget. An optimal temporal response of g_s should be a fast decrease of g_s after a light-to-dark transition in order to limit water loss when no photosynthesis occurs and a fast increase after a dark-to-light transition to maximize net CO_2 assimilation, without any time lag. However, in reality, a large diversity of temporal responses of g_s at whole plant scale was detected among individuals. Such temporal responses might also affect water use efficiency over a diurnal cycle. Their diversity could be used to select individuals with optimized water budget and could be a useful criterion for breeding for enhanced water use-efficiency.

407 **Acknowledgements**

408 Silvère Vialet-Chabrand was supported by a doctoral grant from Université de Lorraine (France). We
409 thank Pierre Montpied (Inra, Champenoux, France) and Hanah Ghouil (Université de Bizerte, Bizerte,
410 Tunisie) for their help during gas exchange measurements, and Christophe Bailly (UEFL, Inra,
411 Champenoux, France) for the access to the experimental climate chambers. The research unit UMR
412 1137 “Ecologie et Ecophysiologie Forestières” contributes to the Labex “ARBRE” ANR-11-LABX-0002-
413 01.

414

References

- Andrieu C, Thoms J.** 2008. A tutorial on adaptive MCMC. *Statistics and Computing* **18**, 343–373.
- Ball J.** 1987. A model predicting stomatal conductance and its contribution to the control of photosynthesis under different environmental conditions. *Progress in Photosynthesis Research* **221–224**.
- Barbeta A, Ogaya R, Peñuelas J.** 2012. Comparative study of diurnal and nocturnal sap flow of *Quercus ilex* and *Phillyrea latifolia* in a Mediterranean holm oak forest in Prades (Catalonia, NE Spain). *Trees* **26**, 1651–1659.
- Barbour MM, Buckley TN.** 2007. The stomatal response to evaporative demand persists at night in *Ricinus communis* plants with high nocturnal conductance. *Plant, Cell & Environment* **30**, 711–721.
- Barbour MM, Cernusak LA, Whitehead D, Griffin KL, Turnbull MH, Tissue DT, Farquhar GD.** 2005. Nocturnal stomatal conductance and implications for modelling $\delta^{18}\text{O}$ of leaf-respired CO_2 in temperate tree species. *Functional Plant Biology* **32**, 1107–1121.
- Benyon RG.** 1999. Nighttime water use in an irrigated *Eucalyptus grandis* plantation. *Tree Physiology* **19**, 853–859.
- Blom-Zandstra M, Pot CS, Maas FM, Schapendonk AHCM.** 1995. Effects of different light treatments on the nocturnal transpiration and dynamics of stomatal closure of two Rose cultivars. *Scientia Horticulturae* **61**, 251–262.
- Bouma TJ, De Visser R, Van Leeuwen PH, De Kock MJ, Lambers H.** 1995. The respiratory energy requirements involved in nocturnal carbohydrate export from starch-storing mature source leaves and their contribution to leaf dark respiration. *Journal of Experimental Botany* **46**, 1185–1194.
- Bradford K.** 1983. Involvement of plant growth substances in the alteration of leaf gas exchange of flooded tomato plants. *Plant Physiology* **73**, 480–483.
- Bucci, SJ, Goldstein, G, Meinzer, FC, Franco, AC, Campanello, P, & Scholz, FG.** 2004. Mechanisms contributing to seasonal homeostasis of minimum leaf water potential and predawn disequilibrium between soil and plant water potential in Neotropical savanna trees. *Trees*, **19**, 296–304.
- Caird MA, Richards JH, Donovan LA.** 2007a. Nighttime stomatal conductance and transpiration in C_3 and C_4 plants. *Plant Physiology* **143**, 4–10.
- Caird MA, Richards JH, Hsiao TC.** 2007b. Significant transpirational water loss occurs throughout the night in field-grown tomato. *Functional Plant Biology* **34**, 172–177.
- Cavender-Bares J, Sack L, Savage J.** 2007. Atmospheric and soil drought reduce nocturnal conductance in live oaks. *Tree Physiology* **27**, 611–620.
- Christman MA, Donovan LA, Richards JH.** 2009a. Magnitude of nighttime transpiration does not affect plant growth or nutrition in well-watered Arabidopsis. *Physiologia Plantarum* **136**, 264–273.

- Christman MA, James JJ, Drenovsky RE, Richards JH.** 2009b. Environmental stress and genetics influence night-time leaf conductance in the C₄ grass *Distichlis spicata*. *Functional Plant Biology* **36**, 50–55.
- Christman MA, Richards JH, McKay JK, Stahl EA, Juenger TE, Donovan LA.** 2008. Genetic variation in *Arabidopsis thaliana* for night-time leaf conductance. *Plant, Cell & Environment* **31**, 1170–1178.
- Cirelli D, Lieffers VJ, Tyree MT.** 2012. Measuring whole-plant transpiration gravimetrically: a scalable automated system built from components. *Trees* **26**, 1669–1676.
- Constable G, Rawson H.** 1980. Effect of leaf position, expansion and age on photosynthesis, transpiration and water use efficiency of cotton. *Australian Journal of Plant Physiology* **7**, 89–100.
- Craiu R V., Rosenthal J, Yang C.** 2009. Learn from thy neighbor: parallel-chain and regional adaptive MCMC. *Journal of the American Statistical Association* **104**, 1454–1466.
- Daley MJ, Phillips NG.** 2006. Interspecific variation in nighttime transpiration and stomatal conductance in a mixed New England deciduous forest. *Tree Physiology* **26**, 411–419.
- Dawson TE, Burgess SSO, Tu KP, Oliveira RS, Santiago LS, Fisher JB, Simonin K a, Ambrose AR.** 2007. Nighttime transpiration in woody plants from contrasting ecosystems. *Tree Physiology* **27**, 561–575.
- Easlon HM, Richards JH.** 2009. Photosynthesis affects following night leaf conductance in *Vicia faba*. *Plant, Cell & Environment* **32**, 58–63.
- Fisher JB, Baldocchi DD, Misson L, Dawson TE, Goldstein AH.** 2007. What the towers don't see at night: nocturnal sap flow in trees and shrubs at two AmeriFlux sites in California. *Tree Physiology* **27**, 597–610.
- Goh C-H, Ko S-M, Park Y-I, Kim C-S, Song K-J.** 2011. Regulation of dark-induced stomatal closure in *Arabidopsis* dynamin-like protein 1E (adl1e) mutant leaves. *Journal of Plant Biology* **54**, 112–118.
- Gulke NE, Alonso R, Nguyen T, Cascio C, Dobrowolski W.** 2004. Stomata open at night in pole-sized and mature ponderosa pine: implications for O₃ exposure metrics. *Tree Physiology* **24**, 1001–1010.
- Hosy E, Vavasseur A, Mouline K, Dreyer I, Gaymard F, Porée F, Boucherez J, Lebaudy A, Bouchez D, Very A-A, et al.** 2003. The *Arabidopsis* outward K⁺ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 5549–5554.
- Howard AR, Donovan LA.** 2007. *Helianthus* nighttime conductance and transpiration respond to soil water but not nutrient availability. *Plant Physiology* **143**, 145–155.
- Howard AR, Donovan LA.** 2010. Soil nitrogen limitation does not impact nighttime water loss in *Populus*. *Tree Physiology* **30**, 23–31.
- Hubbart JA, Kavanagh KL, Pangle R, Link T, Schotzko A.** 2007. Cold air drainage and modeled nocturnal leaf water potential in complex forested terrain. *Tree Physiology* **27**, 631–639.
- Jones H.** 1992. *Plants and microclimate: a quantitative approach to environmental Plant Physiology*. Cambridge University Press.

Kavanagh KL, Pangle R, Schotzko AD. 2007. Nocturnal transpiration causing disequilibrium between soil and stem predawn water potential in mixed conifer forests of Idaho. *Tree Physiology* **27**, 621–629.

Kim T-H, Böhmer M, Hu H, Nishimura N, Schroeder JI. 2010. Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 561–591.

Klein M, Perfus-Barbeoch L, Frelet A, Gaedeke N, Reinhardt D, Mueller-Roeber B, Martinoia E, Forestier C. 2003. The plant multidrug resistance ABC transporter AtMRP5 is involved in guard cell hormonal signalling and water use. *The Plant Journal* **33**, 119–129.

Kupper P, Rohula G, Saksing L, Sellin A, Löhmus K, Ostonen I, Helmisaari H-S, Söber A. 2012. Does soil nutrient availability influence night-time water flux of aspen saplings? *Environmental and Experimental Botany* **82**, 37–42.

Lasceve G, Leymarie J, Vavasseur A. 1997. Alterations in light-induced stomatal opening in a starch-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana* L. deficient in chloroplast phosphoglucomutase activity. *Plant, Cell & Environment* **20**, 350–358.

Lebaudy A, Vavasseur A, Hosy E, Dreyer I, Leonhardt N, Thibaud J-B, Very A-A, Simonneau T, Sentenac H. 2008. Plant adaptation to fluctuating environment and biomass production are strongly dependent on guard cell potassium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 5271–5276.

Marks CO, Lechowicz MJ. 2007. The ecological and functional correlates of nocturnal transpiration. *Tree Physiology* **27**, 577–584.

Musselman RC, Minnick TJ. 2000. Nocturnal stomatal conductance and ambient air quality standards for ozone. *Atmospheric Environment* **34**, 719–733.

Novick KA, Oren R, Stoy PC, Siqueira MBS, Katul GG. 2009. Nocturnal evapotranspiration in eddy-covariance records from three co-located ecosystems in the Southeastern U.S.: Implications for annual fluxes. *Agricultural and Forest Meteorology* **149**, 1491–1504.

Van Oijen M, Rougier J, Smith R. 2005. Bayesian calibration of process-based forest models: bridging the gap between models and data. *Tree Physiology* **25**, 915–927.

Ooba M, Takahashi H. 2003. Effect of asymmetric stomatal response on gas-exchange dynamics. *Ecological Modelling* **164**, 65–82.

Otieno DO, Schmidt MWT, Kurz-Besson C, Do Vale RL, Pereira JS, Tenhunen JD. 2007. Regulation of transpirational water loss in *Quercus suber* trees in a Mediterranean-type ecosystem. *Tree Physiology* **27**, 1179–1187.

Patrick LD, Ogle K, Tissue DT. 2009. A hierarchical Bayesian approach for estimation of photosynthetic parameters of C₃ plants. *Plant, Cell & Environment* **32**, 1695–709.

Pearcy RW, Ehleringer JR, Mooney HA, Rundel PW. 1989. *Plant physiological ecology: field methods and instrumentation*. Chapman and Hall Ltd.

- Phillips NG, Lewis JD, Logan BA, Tissue DT.** 2010. Inter- and intra-specific variation in nocturnal water transport in *Eucalyptus*. *Tree Physiology* **30**, 586–596.
- Rawson H, Clarke J.** 1988. Nocturnal Transpiration in Wheat. *Australian Journal of Plant Physiology* **15**, 397–406.
- Rosado BHP, Oliveira RS, Joly CA, Aida MPM, Burgess SSO.** 2012. Diversity in nighttime transpiration behavior of woody species of the Atlantic Rain Forest, Brazil. *Agricultural and Forest Meteorology* **158-159**, 13–20.
- Scholz FG, Bucci SJ, Goldstein G, Meinzer FC, Franco AC, Miralles-Wilhelm F.** 2007. Removal of nutrient limitations by long-term fertilization decreases nocturnal water loss in savanna trees. *Tree Physiology* **27**, 551–559.
- Shirke P.** 2001. Leaf photosynthesis, dark respiration and fluorescence as influenced by leaf age in an evergreen tree, *Prosopis juliflora*. *Photosynthetica* **39**, 305–311.
- Snyder KA.** 2003. Night-time conductance in C_3 and C_4 species: do plants lose water at night? *Journal of Experimental Botany* **54**, 861–865.
- Solonen A, Ollinaho P, Laine M, Haario H, Tamminen J, Järvinen H.** 2012. Efficient MCMC for climate model parameter estimation: parallel adaptive chains and early rejection. *Bayesian Analysis* **7**, 715–736.
- Stahl C.** 1894. Einige Versuche über Transpiration und Assimilation. *Botanische Zeitung* **52**, 117–145.
- Urban O, Kosvancova M, Marek M V, Lichtenthaler HK.** 2007. Induction of photosynthesis and importance of limitations during the induction phase in sun and shade leaves of five ecologically contrasting tree species from the temperate zone. *Tree Physiology* **27**, 1207–1215.
- Vialet-Chabrand S, Dreyer E, Brendel O.** 2013. Performance of a new dynamic model for predicting diurnal time courses of stomatal conductance at the leaf level. *Plant, Cell & Environment* **36**, 1529–1546.
- Vico G, Manzoni S, Palmroth S, Katul G.** 2011. Effects of stomatal delays on the economics of leaf gas exchange under intermittent light regimes. *The New Phytologist* **192**, 640–652.
- Zeppel MJB, Lewis JD, Chaszar B, Smith RA, Medlyn BE, Huxman TE, Tissue DT.** 2012. Nocturnal stomatal conductance responses to rising $[CO_2]$, temperature and drought. *The New Phytologist* **193**, 929–938.
- Zeppel M, Tissue D, Taylor D, Macinnis-Ng C, Eamus D.** 2010. Rates of nocturnal transpiration in two evergreen temperate woodland species with differing water-use strategies. *Tree Physiology* **30**, 988–1000.
- Zhu G-F, Li X, Su Y-H, Lu L, Huang C-L.** 2011. Seasonal fluctuations and temperature dependence in photosynthetic parameters and stomatal conductance at the leaf scale of *Populus euphratica* Oliv. *Tree Physiology* **31**, 178–195.

Tables

	<i>Q. robur</i>	<i>Q. petraea</i>	<i>Q. afares</i>	<i>Q. suber</i>
g_c with $g_b = 100 \text{ mmol m}^2 \text{ s}^{-1}$	0.86	1.2	2.45	1.1
g_c with $g_b = 400 \text{ mmol m}^2 \text{ s}^{-1}$	0.85	1.2	2.35	1
$g_{night} \text{ (mmol m}^2 \text{ s}^{-1})$	9.9	17.4	20.2	5.8
$g_c / g_{night} (\%)$	8.6	6.9	11.9	18.1

Table 1: Cuticular conductance (g_c , $\text{mol m}^2 \text{ s}^{-1}$) estimated from the weight loss of excised leaves that were pre-treated with abscisic acid (ABA). Two hypothetical values of boundary layer conductance (g_b) were used to estimate g_c . The mean steady state stomatal conductance during night (g_{night}) was compared to g_c .

Species	T_{down} (s)	T_{up} (s)	T_{down} / T_{up}	W_{down} (g)	W_{up} (g)	S (m ²)	W_{down} / W_{up}
<i>Q. afares</i>	1496	3540	0,42	1,16	1,29	0.045141	0,90
<i>Q. afares</i>	1624	3043	0,53	0,38	0,84	0.047282	0,46
<i>Q. afares</i>	4620	4097	1,13	1,84	2,31	0.065867	0,79
<i>Q. petraea</i>	3852	2295	1,68	2,47	3,22	0.221520	0,77
<i>Q. petraea</i>	4783	2008	2,38	2,06	1,66	0.151017	1,24
<i>Q. petraea</i>	3529	1831	1,93	0,36	0,78	0.091720	0,46
<i>Q. robur</i>	4002	2428	1,65	5,60	7,48	0.274805	0,75
<i>Q. robur</i>	3449	1896	1,82	3,69	3,57	0.347125	1,03
<i>Q. robur</i>	3371	2422	1,39	3,71	5,71	0.355668	0,65
<i>Q. suber</i>	4972	2898	1,72	5,91	4,16	0.205988	1,42
<i>Q. suber</i>	4544	3178	1,43	7,86	5,59	0.249408	1,41
<i>Q. suber</i>	3579	3297	1,09	5,93	4,19	0.147442	1,41

Table 2: Parameters describing the temporal response of weight loss induced by the slow temporal responses of g_s . T_{down} and T_{up} : Time to reach 99% of the temporal variation; W_{down} and W_{up} : absolute difference of water loss between an instant and the slow temporal response; S : whole plant leaf area. Down refers to light-to-dark and up to dark-to-light transitions.

Figures

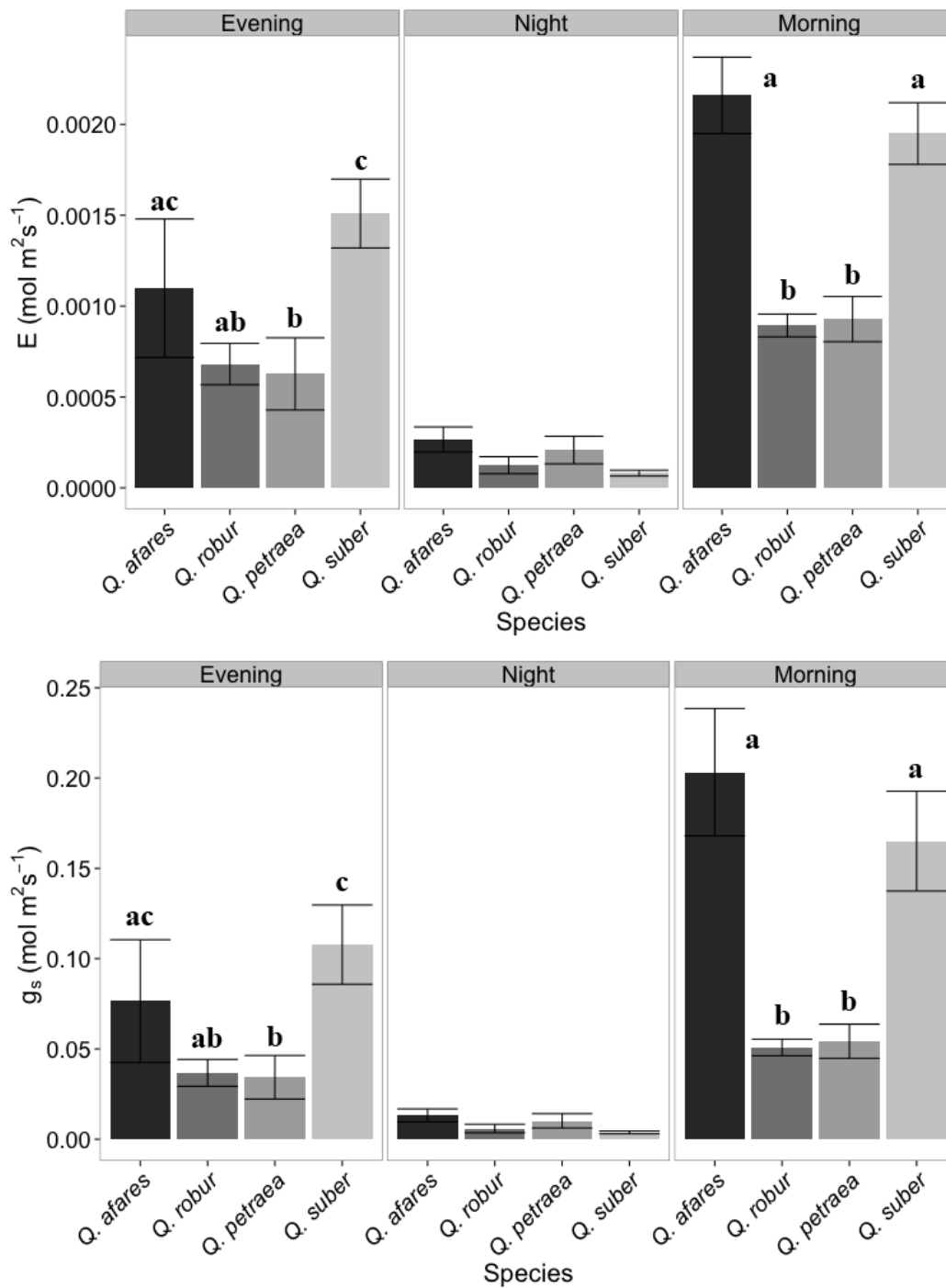


Figure 1: Whole plant transpiration per unit leaf area and stomatal conductance computed from the weight loss during the evening of day 1, the night and the morning of day 2 (3 plants, 3 repetitions and 4 species). Error bars represent confidence intervals at 95%. Evening, Night and Morning represent respectively the 3 time periods when g_s was linearly estimated. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between means.

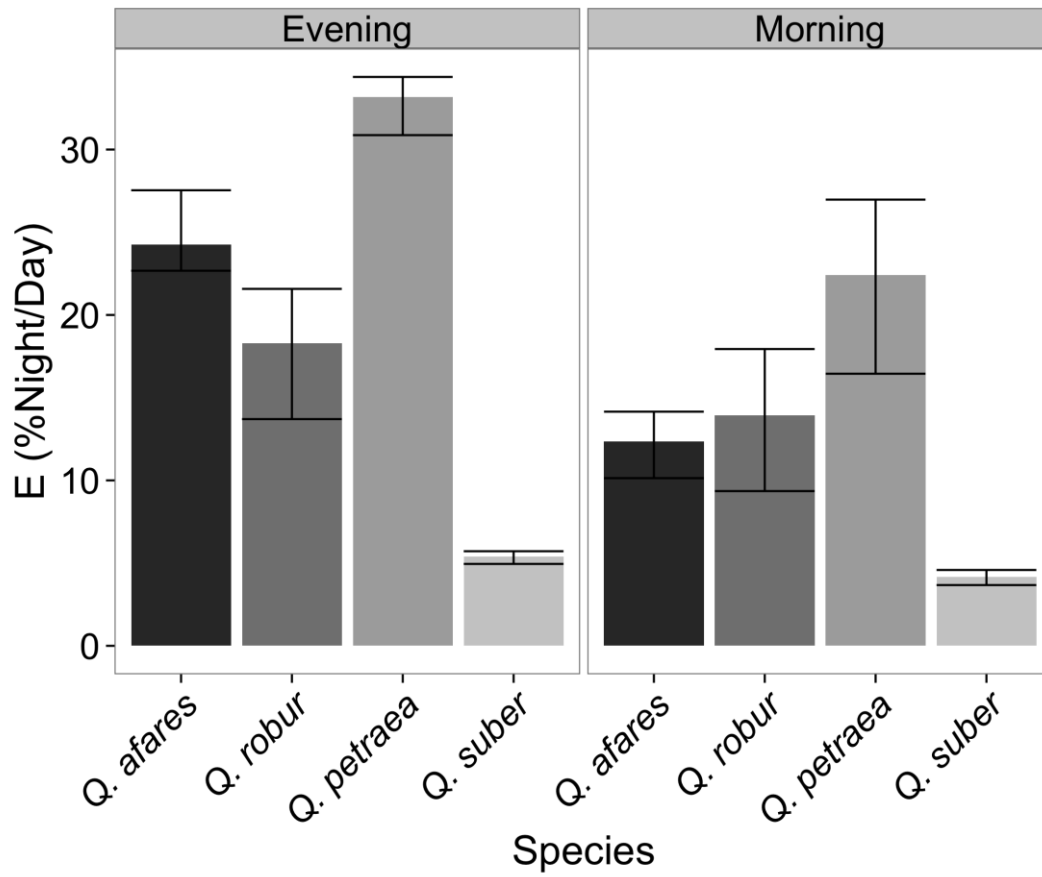


Figure 2: Ratio (%) of night-time vs. day-time transpiration (E) (evening of day 1 and morning of day 2) calculated from the weight loss of whole plants (3 plants, 3 repetitions and 4 species). Error bars represent confidence intervals at 95%.

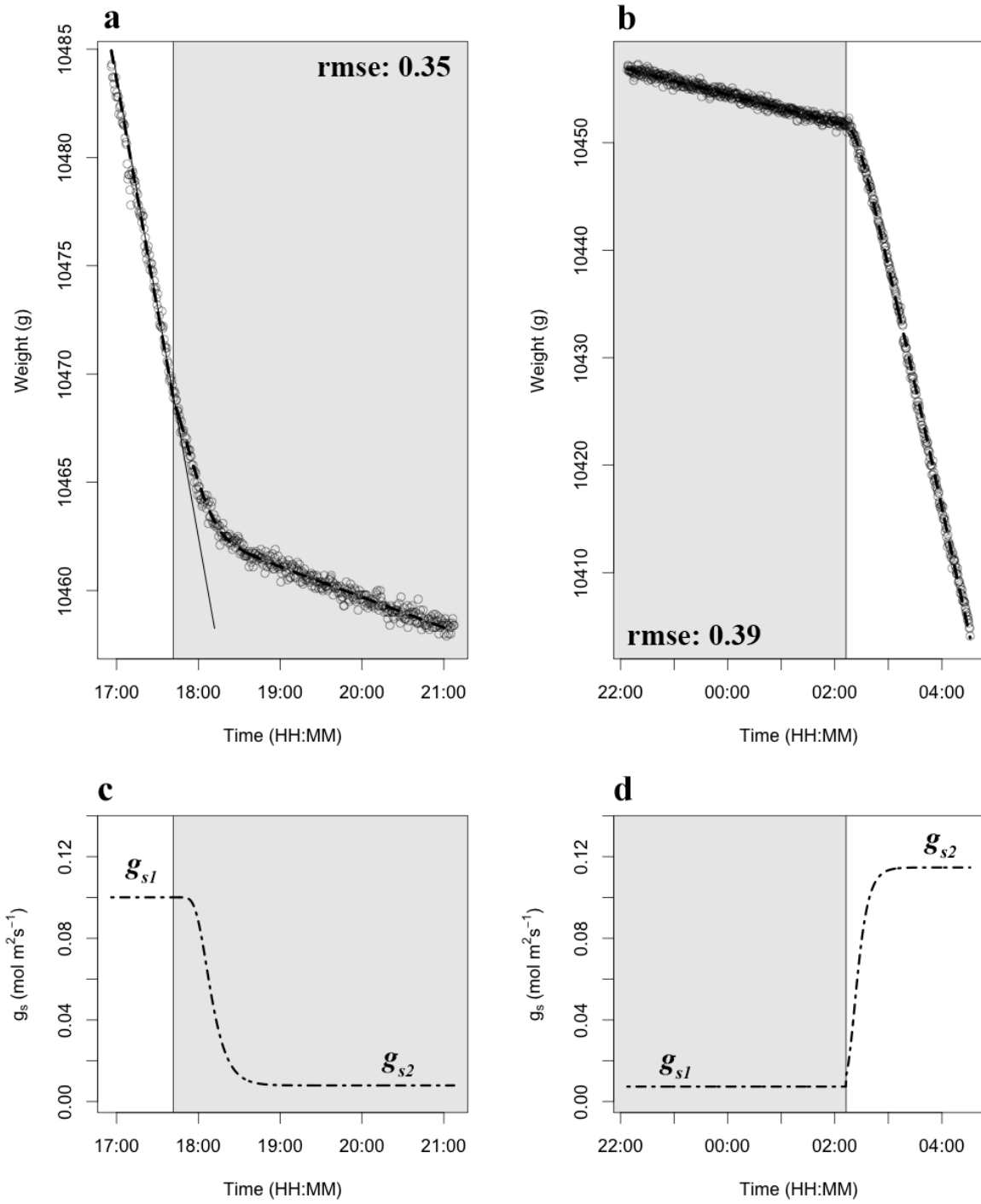


Figure 3: Example of measured (points) and modelled (lines) water loss for a whole plant of *Q. suber* and the derived variation of g_s (from the steady state value g_{s1} to g_{s2}) after a day-to-night (a, c) and a night-to-day transition (b, d).

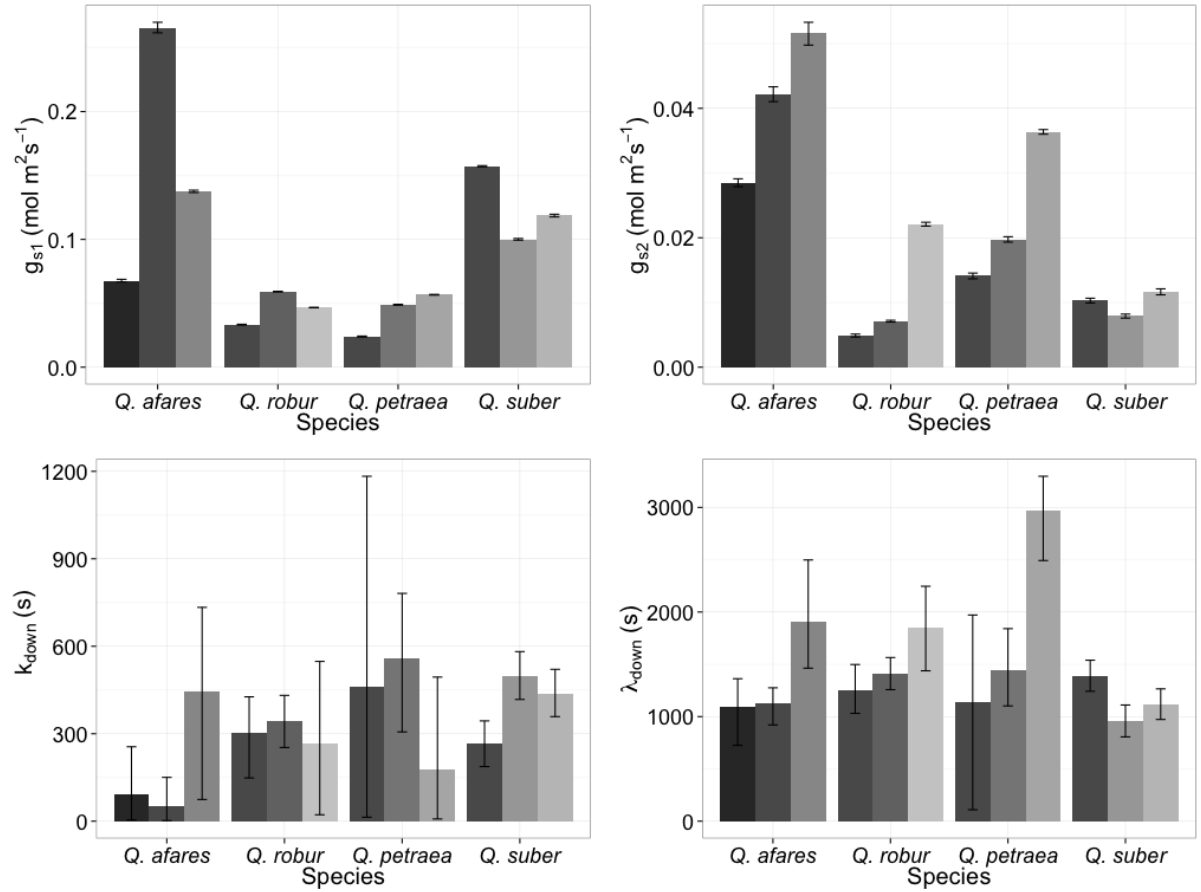


Figure 4: Estimates of the parameters of the predictive model for stomatal conductance after light-to-dark transitions. g_{s1} and g_{s2} steady state values of stomatal conductance before and after the transition; k_{down} : time constant and λ_{down} : time-lag for the decrease of g_s after the transition. Each bar represents an individual parameter value. Error bars represent the confidence interval at 95% of the posterior distribution.

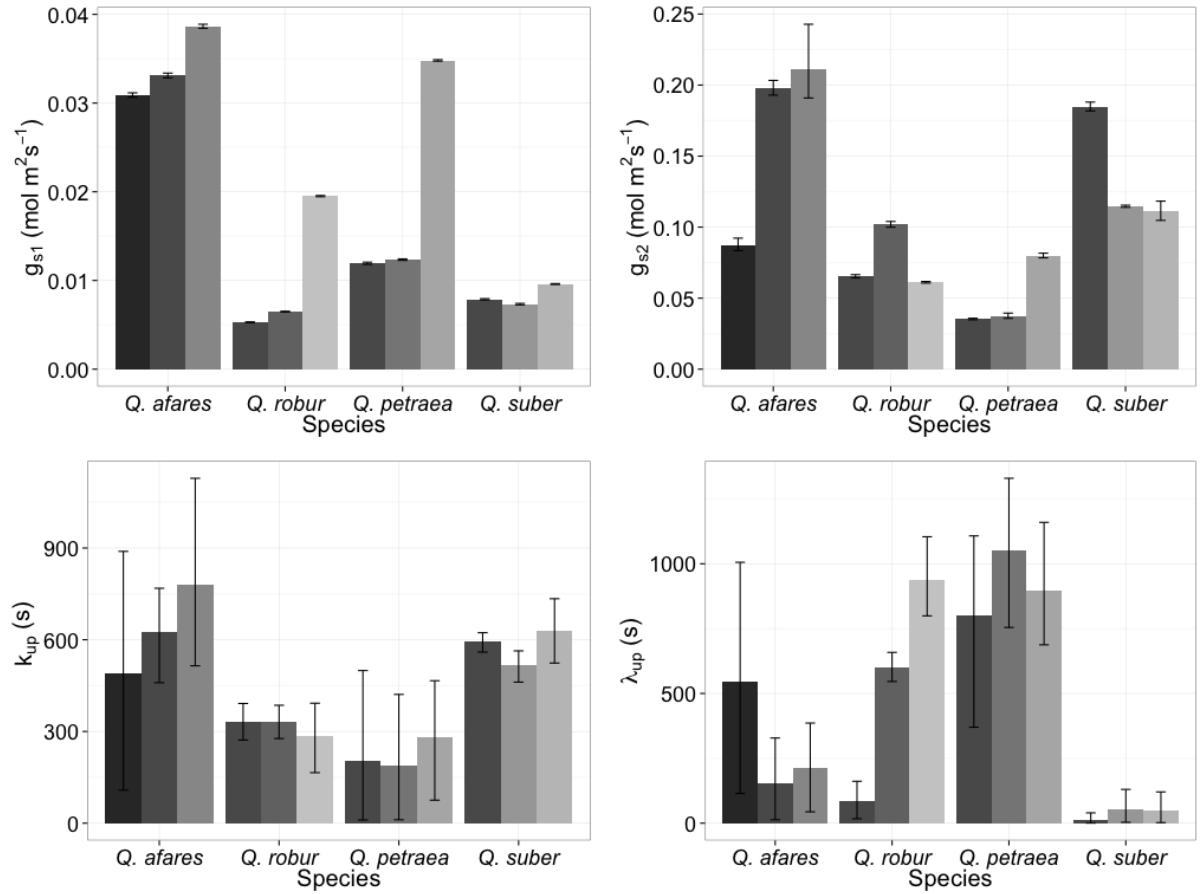


Figure 5: Estimates of the parameters of the predictive model for stomatal conductance after dark-to-light transitions. g_{s1} and g_{s2} steady-state values of stomatal conductance before and after the transition; k_{up} : time constant and λ_{up} : time-lag for the increase of g_s after the transition. Each bar represents an individual. Error bars represent the confidence interval at 95% of the posterior distribution.

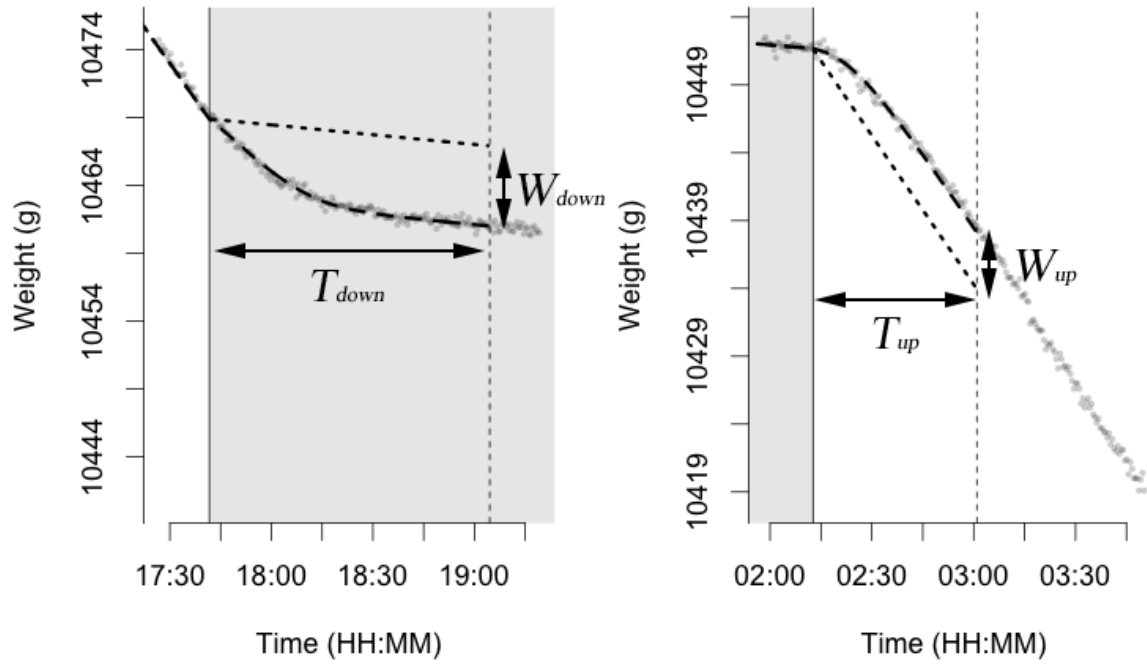


Figure 6: Impact on water loss of a potted *Quercus suber* plant of instant vs. slow temporal response of g_s after a light-to-dark transition (left) and a dark-to-light transition (right). Two simulations were made: (i) one based on a slow temporal response of g_s (bold dashed line) simulating closely the observed time course of weight, and (ii) one based on an instant response of g_s (bold dotted line). T_{down} and T_{up} : time to reach 99% of the variation of stomatal conductance between the two steady states; W_{down} and W_{up} : difference of water loss between an instant and a slow temporal response of g_s . Underscripts down and up refer to light-dark and dark-light transitions, respectively.

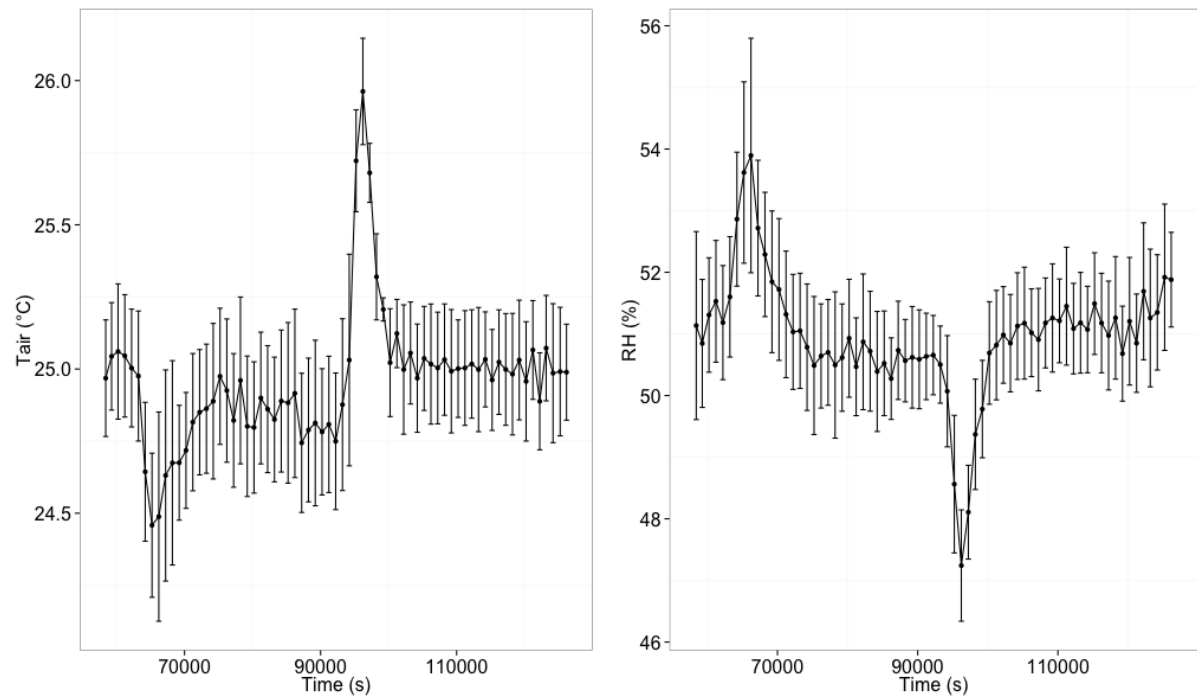


Figure S1: Mean air temperature and relative humidity in the climate chambers during the whole set of light-dark transitions. Error bars represent standard deviation.

Annexes

A/ Leaf energy balance

Leaf-air temperature difference was estimated using an energy balance equation with stomatal conductance estimated from the model (see Jones 1992; equation 9.6):

$$T_{leaf} - T_{air} = \frac{r_{HR} \cdot (r_{aW} + r_{lW}) \cdot \gamma \cdot \Phi_{ni}}{\rho_a \cdot C_p \cdot [\gamma \cdot (r_{aW} + r_{lW}) + s \cdot r_{HR}]} - \frac{r_{HR} \cdot \delta e}{\gamma \cdot (r_{aW} + r_{lW}) + s \cdot r_{HR}} \quad (1)$$

where $T_{leaf} - T_{air}$ is the leaf-to-air temperature difference [$^{\circ}\text{C}$], Φ_{ni} is the net isothermal radiation [W m^{-2}] (the net radiation that would be received by an equivalent surface at air temperature), δe is the air water vapour pressure deficit [Pa], r_{HR} is the sum of the parallel resistances to heat (r_{aH}) and radiative transfer [s m^{-1}] ($r_R = 4\epsilon\sigma T_{air}/\rho C_p$), ϵ is the emissivity of the surface of the leaf, σ is the Stefan-Boltzmann constant [$5.6703 \cdot 10^{-8} \text{ W m}^{-2} \text{ K}^{-4}$], γ is the psychrometer constant [Pa K^{-1}], ρ_a is the density of air [kg m^{-3}], C_p is the specific heat capacity of air [$\text{J kg}^{-1} \text{ K}^{-1}$] and s is the slope of the curve relating saturation vapour pressure to temperature [Pa K^{-1}].

When the transpiration (E , $\text{kg m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) was directly estimated, the simplified equation is (see Jones 1992; equation 9.2):

$$T_{leaf} - T_{air} = - \frac{r_{HR} \cdot (\lambda \cdot E - \Phi_{ni})}{\rho_a \cdot C_p} \quad (2)$$

where λ is the latent heat of vaporisation of water [J kg^{-1}].

The net isothermal radiation (Φ_{ni}) was estimated considering the different long-wave emissivity for the white plastic walls (ϵ_w) and the black plastic soil (ϵ_s) of the climate chamber:

$$\Phi_{ni} = \alpha k R_q + \epsilon_w \sigma T_w^4 + \epsilon_s \sigma T_s^4 - 2\epsilon \sigma T_{air}^4 \quad (3)$$

where α is the absorption coefficient for irradiance, k is the radiation conversion factor [$\frac{\text{W m}^{-2}}{\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}}$], R_q is the irradiance [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$], T_w and T_s are the temperatures [K] of the walls and the soil and was approximated as equal to T_{air} .

The conversion equation of stomatal conductance from $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ to m s^{-1} is (see Pearcy *et al.* 1989; equation 8.12):

$$g_s(\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}) = g_s(\text{m s}^{-1}) \cdot 44.6 \cdot \left[\frac{273}{T_{\text{air}} + 273} \right] \cdot \left[\frac{P}{101.3} \right] \quad (4)$$

where P is the atmospheric pressure [kPa].

B/ Boundary layer conductance

The boundary layer conductance was estimated using an aluminium leaf model in the dark reproducing the shape of an oak leaf (see Jones, 1992, appendix 8). Under these conditions, the sensible heat transfer (convection and conduction) is the only significant mode of energy exchange with the environment and the variation of the surface temperature is proportional to the leaf-air temperature difference (ΔT). The slope of the relation between $\ln(\Delta T)$ and time depends on the boundary layer conductance to heat transfer (g_{bH} , m s^{-1}):

$$\text{slope} = \frac{-g_{bH}\rho C_p}{\rho^* c^* l^*} \quad (5)$$

where ρ is the density of air [kg m^{-3}], C_p is the specific heat capacity of air [$\text{J kg}^{-1} \text{K}^{-1}$], $\rho^* c^* l^*$ are, respectively, the density [kg m^{-3}], specific heat [$\text{J kg}^{-1} \text{K}^{-1}$] and thickness [m] of the aluminium leaf model.

The boundary layer conductance to water vapour (g_b , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) was calculated from g_{bH} using the usual 2/3 power ratio of the diffusion coefficients for heat and water vapour in the laminar boundary layer (0.92; Jones, 1992):

$$g_b = \frac{g_{bH}}{2 \cdot 0.92} \quad (6)$$

where g_{bH} is converted from mass units (e.g. m s^{-1}) to molar units (e.g. $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) using the previous equation from Pearcy *et al.* (1989) and divided by a factor 2 because transpiration was only from the lower surface for hypostomatous leaves.

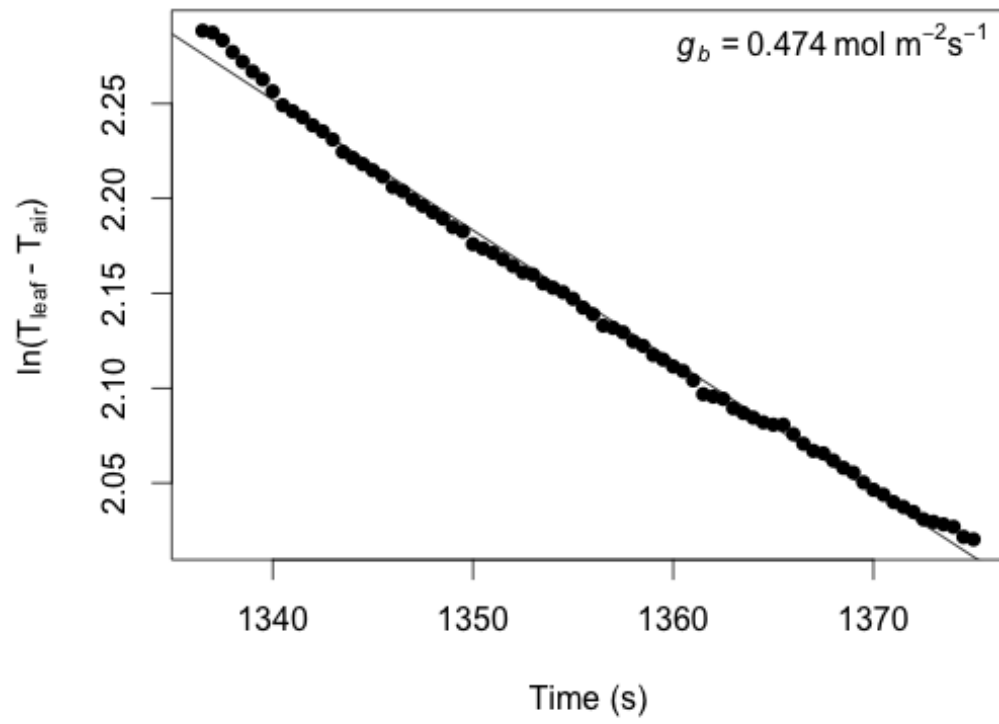


Figure A1: Example of a cooling curve recorded with an aluminium leaf model (surface: 0.004808 m^2) used to estimate the boundary layer conductance (g_b) of real leaves.

Annexe 2

Performance of a new dynamic model for predicting diurnal time courses of stomatal conductance at the leaf level

SILVÈRE VIALET-CHABRAND^{1,2}, ERWIN DREYER^{1,2} & OLIVER BRENDEL^{1,2}

¹INRA, UMR1137 'Ecologie et Ecophysiologie Forestières', F-54280 Champenoux, France and ²Université de Lorraine, UMR1137 'Ecologie et Ecophysiologie Forestières', Faculté des Sciences, F-54500 Vandoeuvre, France

ABSTRACT

Under natural conditions, plants are subjected to continuous changes of irradiance that drive variations of stomatal conductance to water vapour (g_s). We propose a dynamic model to predict the temporal response of g_s at the leaf level using an asymmetric sigmoid function with a unique parameter describing time constants for increasing and decreasing g_s . The model parameters were adjusted to observed data using Approximate Bayesian Computation. We tested the model performance for (1) instant changes of irradiance; or (2) continuous and controlled variations of irradiance simulating diurnal time courses. Compared with the two mostly used steady-state models, our dynamic model described daily time courses of g_s with a higher accuracy. In particular, it was able to describe the hysteresis of g_s responses to increasing/decreasing irradiance and the resulting rapid variations of intrinsic water-use efficiency. Compared to the mechanistic model of temporal responses of g_s by Kirschbaum, Gross & Pearcy, for which time constants were estimated with a large variance, our model estimated time constants with a higher precision. It is expected to improve predictions of water loss and water-use efficiency in higher scale models by using a small number of parameters.

Key-words: Approximate Bayesian Computation, diurnal cycle, dynamic modelling, hysteresis.

INTRODUCTION

Modelling stomatal conductance to water vapour (g_s) is a key element for predicting water exchange between the leaf and the atmosphere at different scales. At the leaf level, two main models are currently used to predict g_s from environmental data, the models developed by Jarvis (1976) and Ball *et al.* (1987). Leaf scale modelling of g_s at short intervals is necessary to link changes in conductance with physiological processes (Jarvis 1995) and estimate parameters with a biological meaning. Moreover, these models have been scaled-up from leaf to canopy level (Baldocchi & Harley 1995; Sprintsin *et al.* 2012) and used to predict tree growth and water-use at stand scale (Van Wijk *et al.* 2000). Dynamic global vegetation models use this scaling approach with time steps of minutes to hours to predict water vapour exchange between land and atmosphere (Cramer *et al.* 2001).

During a daily time course, under non-limiting growth conditions, g_s depends mainly on irradiance and vapour pressure deficit from leaf tissues to air (VPD_i) (Grossnickle & Fan 1998). The sensitivity of g_s to these two environmental variables can be described by equations fitted to data from steady-state response curves acquired under controlled conditions (Whitehead 1998). These equations are used in 'steady-state' models (Damour *et al.* 2010) that predict g_s under stationary regimes, under the assumption that g_s changes instantaneously with variations of environmental conditions. Such models are used to predict daily time courses of gas exchange at leaf (Tuzet, Perrier & Leuning 2003) or canopy level to estimate carbon and water exchange of forests (Harley & Baldocchi 1995; Leuning *et al.* 1995; Sala & Tenhunen 1996).

The steady-state model introduced by Jarvis (1976) predicts the diurnal variation of g_s with a product of functions that describe the response of g_s to each environmental variable separately. Thus, the model is able to predict g_s for every combination of environmental variables. However, it does not take into consideration the possible dependence of g_s on net CO_2 assimilation rate (Schwartz & Zeiger 1984; Zeiger *et al.* 2002). Therefore, Ball *et al.* (1987) proposed a coupled steady-state model, where g_s depends directly on net CO_2 assimilation rate. The 'Ball' model was modified by Leuning (1990) to include the CO_2 compensation point (Γ). However, the two models only partially reproduce the observed variability of g_s at leaf level during daily time courses (Kaufmann 1982; Misson, Panek & Goldstein 2004). They lead to an over- or underestimation of g_s because they fail to reproduce the temporal responses of g_s associated to each variation of environment (Stegemann, Timm & Koppers 1999). The temporal response of g_s to irradiance results in a hysteresis (Ng & Jarvis 1980), that disappears when g_s is stabilized for long periods (2.5 h) thereby achieving steady-state conditions. Ng & Jarvis (1980) further observed that g_s recorded under a given level of irradiance was different under increasing versus decreasing irradiance, suggesting that the time constants for increasing and decreasing of g_s differ (Ooba & Takahashi 2003).

The temporal response of g_s could have an impact on the instant water-use efficiency (WUE), which is the trade-off between carbon and water fluxes at leaf level. Cowan & Farquhar (1977) proposed that plants optimize this trade-off to maximize net CO_2 assimilation rate (A) with respect to transpiration. However, Kaiser & Kappen (2000) suggested that it is important for plant performance to maximize the

long-term integrated CO_2 with respect to water loss and that WUE could therefore deviate from the optimal trade-off. Intrinsic water-use efficiency (W_i) is the ratio between A and g_s . Diurnal variations of W_i are strongly dependent on the temporal response of g_s to variations of irradiance, in particular on the asymmetry in the temporal responses between increasing and decreasing g_s (Ooba & Takahashi 2003). During daily time courses, g_s responds slowly to rapidly changing environmental conditions and reaches rarely a steady-state (Rayment, Loustau & Jarvis 2000). The resulting transient state of g_s causes rapid variations in W_i (Kaiser & Kappen 2000) and impacts the daily integrated W_i defined as the daily integrated A versus daily integrated g_s . A well-known and widely used proxy for W_i is the isotopic discrimination of carbon ($\Delta^{13}\text{C}$) between atmospheric CO_2 and plant organic material (Farquhar & Richards 1984). Depending on the organic material used for ^{13}C analysis (soluble sugars, bulk leaf matter, wood), $\Delta^{13}\text{C}$ integrates the variations of W_i weighted by the amount of carbon assimilated over different time scales (from some days to years). As the temporal variations of g_s impact the daily integrated W_i , stomatal dynamics need to be taken into account when assessing genetic and environmental effects on $\Delta^{13}\text{C}$ at daily and supra-daily time scales.

Temporal responses of g_s need to be predicted by dynamic models which describe g_s during a succession of transient regimes. Some models used mechanistic formulations to describe the temporal response of g_s . Ng & Jarvis (1980) hypothesized that the response of g_s to irradiance was mediated by the amount or the activation of a transportable chemical intermediate. They proposed a theoretical framework based on a two compartments model with ATP as the primary photochemical product, and a sugar phosphate as the secondary product. The temporal response of g_s was in this case due to production, transport and use of the different products. This model was the first theoretical formulation of a dynamic response of g_s that introduced an exponential temporal response to irradiance. Subsequently, Kirschbaum, Gross & Pearcy (1988) proposed a model with three compartments in series, and with different time constants governing the rate of change between compartments. They suggested that the first biological process is (1) a biochemical signal responding directly to irradiance with a small time constant (τ_i). This signal induces (2) an osmotic change within the guard cells (τ_r), which results in (3) water movement into the guard cells (τ_w), with the latter two processes displaying higher time constants. The overall response to a change of irradiance described by these three processes results in a sigmoidal curve for g_s . Pearcy *et al.* (1997) coupled the Farquhar & Sharkey (1982) model for net CO_2 assimilation with the dynamic model of Kirschbaum *et al.* (1988). Unfortunately, neither the Pearcy *et al.* (1997) nor the Kirschbaum *et al.* (1988) models were ever adjusted statistically to measured data, probably due to the large number of inter-correlated parameters. However, to compare the temporal response of g_s among species or individuals, it is important to use statistical adjustments to assess the precision of the estimation of each parameter. Therefore, to reduce the number

of parameters used in such mechanistic models, Noe & Giersch (2004) proposed a simplified version of the Kirschbaum model using an exponential model with a unique time constant. However, it was not consistent with the differences in the time constants between increases and decreases of g_s , as observed by Whitehead & Teskey (1995) and Vico *et al.* (2011). Different time constants were already used by Rayment *et al.* (2000) in their exponential response model which was used to compare steady-state and dynamic versions of the Ball and the Jarvis models. Their measurements were obtained from branch bags with an integration period of 4 min at 20 min intervals. Such conditions prevented the detection of rapid variations of g_s and the authors made the assumption that environmental conditions remained stable over each interval. Nonetheless, the dynamic versions using different time constants for increasing or decreasing g_s clearly outperformed the steady-state but still reproduced only partially the diurnal variations of g_s . To improve the trade-off between the number of parameters and the accuracy of predictions of g_s , we propose to use a sigmoid function to describe the temporal response of g_s to a change of irradiance. We used specifically an asymmetric sigmoid function, which comprises a unique parameter describing the temporal response for increasing or decreasing g_s . The smaller number of parameters should facilitate adjusting the model to observed data with more precision and thereby improving the predictive power of the model.

The asymmetric sigmoid function was formulated as a differential equation to describe the temporal responses of g_s using as a target value the steady-state g_s (G) for a given level of irradiance. This approach assumes that stomata track a target G during the day (Kirschbaum *et al.* 1988; Noe & Giersch 2004). A Jarvis model was used to predict G as a function of irradiance. During daily time courses, continuous variations of irradiance were taken into consideration by our model to avoid the stepwise variations of irradiance employed in the exponential model. Adjustment of our differential equation to observed daily time courses of g_s provides the steady-state target values and the time constants.

The aim of the current work was to model the temporal responses of g_s to changes of irradiance on a time scale ranging from instant changes to daily time courses and test their impact on W_i . Our objectives were:

- 1 to test whether an asymmetric sigmoid response model (called 'dynamic model') is able to describe the increase of g_s in response to an instant increase from darkness to a given level of irradiance until steady-state is reached;
- 2 to test whether the dynamic model is able to describe the increase or decrease of g_s , when instant changes of irradiance take place before a steady-state G has been reached;
- 3 to compare the predictions of the dynamic model with those of two widely used steady-state models (Ball *et al.* 1987 as revised by Leuning 1990 and Jarvis 1976) for daily time courses of g_s in terms of variations of g_s , hysteresis to irradiance, as well as daily variation of W_i ;
- 4 to validate the parameter values estimated with the dynamic model from daily time courses with independent

estimates from steady-state irradiance response curves, and

- 5 to compare the performance and the parameter estimates of the Kirschbaum *et al.* (1988) model to our dynamic model.

Data recorded from the five temperate and mediterranean oak species were used to parameterize the different models and to test their predictions. To minimize variation of environmental parameters other than irradiance, such as VPD_i , CO_2 concentration and temperature, measurements were done under controlled and stable conditions.

The performance of our dynamic model was tested for a temporal response of g_s to an instant given increase in irradiance until steady-state was reached (first objective). Repeated cycles of instant increase and decrease in irradiance, similar to natural sunflecks, were used to test the dynamic model when g_s does not reach any steady-state (second objective). Artificial daily time courses of irradiance were used to compare the predictions of steady-state and dynamic models of g_s (third objective). Independent g_s response curves to irradiance were used to validate parameters estimated from daily time courses (fourth objective). Finally, artificial daily time courses of irradiance were used to compare the performance of our dynamic model with the Kirschbaum *et al.* (1988) model (fifth objective).

MODEL DESCRIPTION

The dynamic model

The dynamic model was formulated to describe the temporal response of g_s to a change of irradiance. A change of irradiance induces a sigmoidal response of g_s with an initial time lag followed by an exponential phase and a stabilization at steady-state (Naumburg & Ellsworth 2000). Our model uses one function to describe the dynamic change of g_s and a different one to describe the steady-state target (G) for a given set of environmental conditions. The dynamic part of

the model is the derivative of a Gompertz type asymmetric sigmoid function (Winsor 1932). We reformulated the standard Gompertz function by introducing the r_0 parameter to change the initial value of the temporal response of g_s :

$$\frac{dg_s}{dt} = k \cdot \left(\ln \left(\frac{G - r_0}{g_s - r_0} \right) \right) \cdot (g_s - r_0) \quad (1)$$

with g_s the stomatal conductance at time t , k the time constant (s^{-1}) and G the steady-state target under a given irradiance. Units are reported in Table 1.

Equation 1 does not include explicitly a parameter for the time lag (λ , Fig. 1). However, it depends on the starting value of g_s (g_0) and on parameters k and G . This time lag corresponds to the time between $t = 0$ and the value the maximal slope of g_s at $g_s = 0$. The parameter r_0 is the starting value of the asymmetric sigmoid defined in Eqn 1, in consequence, it modifies the starting value of the time lag visible at g_0 (see Appendix, Fig. A1). Higher values of r_0 correspond to a larger apparent time lag with the limit that $r_0 < g_0$ under all circumstances. The asymmetry of the temporal response of g_s depends on the value of g_s relative to the steady-state target (G), when the switch between increase and decrease occurs. For example, the asymmetry of the response is higher when the switch occurs at a higher value of g_s (Fig. 1). Values of g_s reached relative to the target G during a temporal variation depend on k , thus the asymmetry of the response is also influence by k .

The model was implemented using the R statistical programming language and the differential equation was solved with the lsoda function from deSolve R package (Soetaert, Petzoldt & Setzer 2010). The lsoda function performs automatically an error control, which was central to avoid extra noise during the adjustments. Predictions of g_s were made using the same time step and initial value of g_s than the observations.

Equation 2 calculates the maximal slope observed during a variation of g_s (Sl_{max}) which is computed according to Winsor (1932) as:

Table 1. Abbreviations for the parameters used for the dynamic and for the Kirschbaum *et al.* (1988) models of stomatal conductance (g_s). For each parameter, the uniform prior used during approximate Bayesian computation (ABC) is given as a range of possible values

Parameters	Min	Max
Dynamic model		
k (s^{-1})	time constant	0.000001
r_0 ($mol\ m^{-2}\ s^{-1}$)	Parameter that modify the initial time lag	0.0001
g_{min} ($mol\ m^{-2}\ s^{-1}$)	minimal stomatal conductance	0.001
g_{max} ($mol\ m^{-2}\ s^{-1}$)	maximal stomatal conductance	0.01
α_G ($mol\ \mu mol^{-1}$)	slope of relation between irradiance and steady-state g_s (G)	0.00001
Kirschbaum <i>et al.</i> (1988) model		
S_{min}	Minimum value of the biochemical signal (S)	0.001
α_S	slope of the relation between irradiance and S	0.00001
τ_i (s)	time constant for an increase of S	0
τ_d (s)	time constant for a decrease of S	0
τ_π (s)	Time constant for a change in osmotic potential in guard cells	0
τ_w (s)	Time constant for water movements in guard cells	0
g_{max} ($mol\ m^{-2}\ s^{-1}$)	maximal stomatal conductance	0.01

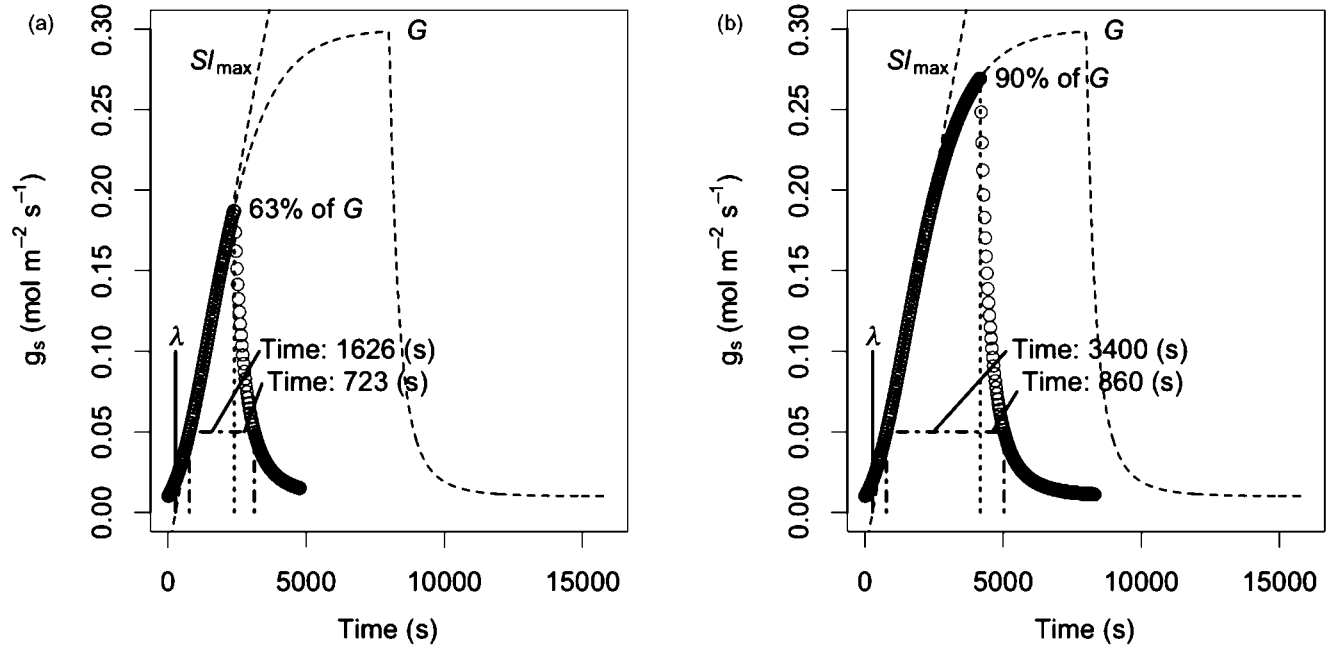


Figure 1. Modelled temporal response of stomatal conductance (g_s) between $0.05 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and a given g_s . The switch to decrease g_s was imposed when g_s had reached 63 (a) or 90% (b) of the steady-state target ($G = 0.3 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Model parameters: time constant (k) = 0.00083 s^{-1} , initial g_s (g_0) = $0.01 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, maximal slope ($Sl_{\max}$) = $9.2 \cdot 10^{-5} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-2}$ and time lag (λ) = 269 s. The time needed for the increase and for the decrease of g_s is indicated. The asymmetry of increase/decrease is larger when g_s reaches levels closer to G . The dotted line indicates the temporal response under the assumption that enough time is available to reach a value close to G .

$$Sl_{\max} = \frac{k \cdot (G - r_0)}{e} \quad (2)$$

The steady-state target value G is described as a function of irradiance using a non-rectangular hyperbola function:

$$G = g_{\min} + \frac{\alpha_G \cdot PPFD \cdot (g_{\max} - g_{\min})}{\sqrt{(g_{\max} - g_{\min})^2 + (\alpha_G \cdot PPFD)^2}} \quad (3)$$

with $PPFD$ the irradiance (photosynthetic photon flux density), $g_{\min}$ the minimal stomatal conductance when $PPFD = 0$, $g_{\max}$ the maximal stomatal conductance and α_G the slope of the relationship. To follow the observed continuous variation of irradiance, a spline function (splinefun function from R with default arguments) estimates the irradiance at each time step used to solve the differential equation and results in a continuous variation of G . Using a spline function allows recording environmental data with different time steps than gas exchange.

Steady-state models

The first steady-state model used in this work was a modified version of Ball *et al.* (1987) provided by Leuning (1990):

$$g_s = g_0 + a_1 \cdot A \cdot \frac{RH}{(C_a - \Gamma)} \quad (4)$$

with the g_0 the residual stomatal conductance, a_1 a coefficient, A the net CO_2 assimilation rate, RH the relative humidity at

the leaf surface, C_a the atmospheric CO_2 concentration and Γ the CO_2 compensation point.

The second steady-state model was a Jarvis model limited to the irradiance function (Eqn 3) as all other environmental variables were kept constant.

Adjustment procedure

We used a recently published procedure called Approximated Bayesian Computation (*ABC*), which replaces the likelihood estimation by a distance function (Marjoram *et al.* 2003; Toni *et al.* 2009; Hartig *et al.* 2011). To accelerate the exploration of the parameter space and to avoid local minima, we first estimated the best parameter values using a genetic algorithm and used these as starting values for the *ABC* which then yields the confidence interval for each parameter.

The genetic algorithm minimizes a fitness function, which describes the distance between observed and modelled data, by successive optimization of a population of parameter values (Wang 1997; Chen, Jakeman & Norton 2008). The fitness function for N observations used here was the mean squared error (*MSE*):

$$MSE = \frac{\sum (Obs. - Sim.)^2}{N} \quad (5)$$

MSE is a proxy for the likelihood estimation (Bates & Watts 2008). This procedure produces a set of parameter values close to the maximum likelihood. Exploration of parameter space by the genetic algorithm was constrained by a range of

possible values chosen to be as large as possible to explore a maximum of parameter space (Table 1). The genetic algorithm started with a population of 100 sets of parameter values which were optimized during 200 generations by crossing the best sets of parameter values. The starting values were chosen randomly within the range defined in Table 1.

The precision of parameter estimations was assessed using an *ABC-MCMC* (Markov Chain Monte Carlo) algorithm (Marjoram *et al.* 2003) with an adaptive jumping kernel (Haario, Saksman & Tamminen 2001; Andrieu & Thoms 2008). The *ABC-MCMC* algorithm replaces the likelihood function by a distance function which was the same as used by the genetic algorithm (Eqn 5). The *ABC* algorithm requires an estimation of the residual variance between modelled and observed data as a tolerance limit to accept a set of parameter values (Toni *et al.* 2009). This residual variance needs to be applied as an error to each observed data point to estimate a tolerance of acceptance during the *ABC-MCMC* procedure. As a basis for the estimation of the residual variance, we used the measurement precision of the observed gas exchange under steady-state conditions during experiments [standard deviation (SD) $\pm 0.0015 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $N = 50$]. The residual variance was applied to each data point using random sampling within this normal distribution to produce 100 000 variants of the observed daily time course. These were used to calculate *MSE*'s relative to the modelled daily time course using the best parameter values from output of the genetic algorithm. The maximum estimated *MSE* from the 100 000 variants was then used as the minimum threshold of acceptance of a set of parameter values with an output sufficiently close to the observed data. During the *ABC-MCMC* procedure, the tolerance was updated each time a set of parameter values with a lower *MSE* than the current maximum *MSE* was detected. Two *MCMC* chains were used with different starting parameter values chosen randomly from the 10 best parameter sets of the final population of the genetic algorithm adjustment. The range of values used for parameters of the genetic algorithm was also used to define the uniform priors of the *ABC-MCMC* algorithm (Table 1). The chains obtained with *ABC-MCMC* were analysed with the coda R package (Plummer *et al.* 2006), a set of tools for *MCMC* plots and diagnostics. The convergence was monitored with the Gelman & Rubin (1992) method after 40 000 iterations and a burn in period of 5000 iterations for each chain. The results were expressed in terms of quantiles: 2.5 and 97.5% of the posterior distribution (Bayesian confidence interval). Parameter values were considered significantly different if their Bayesian confidence intervals did not overlap.

Quality of adjustments

To compare the performance of the different models, we used the root mean square error (*RMSE*) to estimate the error between observed and simulated data for N observations using measurement units:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (Obs. - Sim.)^2}{N}} \quad (6)$$

The displayed modelled curves were obtained with the mean of the posterior distribution from the *ABC* procedure for each parameter.

MATERIAL AND METHODS

Five oak species were selected to maximize the diversity in W_i : *Quercus robur* L., *Q. afares* Pomel, *Q. suber* L and *Q. canariensis* Willd. or *Q. petraea* Matt. Liebl. All experiments were done with 1-year-old seedlings grown in 10 L pots, with a 1:1 v/v peat-sand mixture, well irrigated and well fertilized (35 g Nutricote, Fertil, Type T100, 13.13.13.2 + Olig.). Plants were grown in a greenhouse and transferred into the laboratory for gas exchange measurements. All plants were maintained in darkness for 10 h before measurements. Whole plants were illuminated with two white LED panels (Photon Systems Instruments, Brno, Czech Republic). Leaf gas exchange was recorded with a LI-COR 6400 photosynthesis chamber (Li-Cor, Lincoln, NE, US) under controlled conditions. Light in the chamber was provided by a red-blue light source. Vapour pressure deficit from leaf tissues to air (VPD_i) was controlled with a dew point generator ($0.97 \pm 0.016 \text{ kPa}$), leaf temperature was regulated to 25°C ($SD \pm 0.09^\circ\text{C}$) and the CO_2 reference concentration was set at $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$.

Instant increase in irradiance

Temporal responses of g_s were recorded after an instant given increase in irradiance. Plants were acclimated to darkness and the measured leaf was submitted to $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ of irradiance until g_s reached the steady-state. Data were recorded every 20 s after stabilization of conditions in the leaf chamber. The white LED panels were simultaneously switched on to illuminate the whole plant. This procedure was repeated on a single leaf of one individual from four species (*Q. robur*, *Q. petraea*, *Q. afares* and *Q. suber*).

Repeated cycle of instant increase and decrease in irradiance

A *Q. robur* individual was used to test the response of g_s to a repeated cycle of instant increase and decrease in irradiance. Before starting, the plant was exposed to $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ of irradiance until it reached a steady-state g_s . After 20 min, irradiance was increased to $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ for 30 min before being returned to $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ for a further 20 min. This step change of irradiance was repeated three times. The white light illuminating the whole plant was kept constant throughout the experiment.

Daily time courses

Daily time courses of irradiance were imposed in the gas exchanges chamber by a script written using the LiCor Programming Language (LPL). The matching procedure of reference and sample infrared gas analysers was performed automatically every 30 min. Irradiance was continuously

adjusted using a Gauss equation over a 7.5-h illumination period with a maximal irradiance of $825 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Gas exchange was recorded every 30 s throughout the irradiance time course. The same environmental conditions were used for each measured leaf. One leaf was measured on each individual plant and three individuals in each of the four oak species. Data used as an input for the three models of g_s were taken at 5000 s after closing the gas exchange chamber to be sure that g_s was in equilibrium with the chamber environment. We therefore assume that only irradiance varied during the experiments.

Validation of parameter values

Daily time courses were recorded for three *Q. robur* individuals as described above. The same leaf was used during the following day to record the relationship between steady-state g_s (G) and irradiance (Supporting Information Fig. S1). Measurements were recorded every 30 s starting from low irradiance and with five successive irradiance levels from 100 to $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Each irradiance level lasted at most 2 h and 30 min to reach steady-state (Ng & Jarvis 1980). As the g_s response to each variation of irradiance was recorded with a high temporal resolution, the collected data was used to adjust steady-state parameters (g_{max} , g_{min} and α_G) as well as dynamic model parameters (k and r_0).

To compare the estimations of steady-state parameters from daily time courses with those from the steady-state irradiance response curve, we first calculated G using Eqn 3 for each of the five irradiance levels from the parameter values (g_{max} , g_{min} and α_G) estimated from the daily time courses. To assess the precision of G estimates, we conducted a Monte Carlo analysis (10 000 computations of G) at each level of irradiance using the precision of parameters estimated from daily time courses (g_{max} , g_{min} and α_G). The results are presented graphically (Fig. 8) as an area describing the confidence interval at 95%. Secondly, for each leaf, we used the G recorded during the steady-state response curve to irradiance made the following day to fit Eqn 3 using the genetic algorithm. If the observed fitted curves were inside the corresponding confidence interval area, we concluded that the two curves estimated were not significantly different.

The time constant (k) of the temporal response of g_s was estimated from the same data set using the values recorded after switching from one level of irradiance to the next one. The asymmetric sigmoid function (Eqn 1) was adjusted to each temporal response of g_s using the genetic algorithm. The value of g_s at $t = 0$ was set to G under the previous irradiance level and the target G was set to the maximum value reached. We made the assumption of a constant k with variations of irradiance and a confidence interval was calculated for k from the repetition of each level of irradiance with the same leaf. The values of k were compared to those estimated from our dynamic model during daily time courses.

Model cross-validation

To validate the dynamic model, daily time courses were used to perform a 10-fold cross-validation (Kohavi 1995). Each

data set (12 individuals) was split into 10 equal length folds by random sampling gas exchange data without replacement. Nine folds were combined and used for fitting the model with the genetic algorithm and the remaining one was used to estimate the accuracy of the prediction by calculating *RMSE*. The whole procedure was repeated 10 times, so that each fold was used once for testing. At the end, the statistics were averaged over the 10 runs as a measurement of accuracy of model predictions.

Comparison with the Kirschbaum *et al.* (1988) model

To adjust the Kirschbaum *et al.* (1988) model, the same procedure as used for our dynamic model was applied to the same daily time courses in order to compare the performance of both models. All differential equations were expressed on a relative scale between 0 and 1 to be independent from units. The biochemical signal was described as a function of photon flux density (*PPFD*) by a non-rectangular hyperbola:

$$S_{\text{eq}} = S_{\text{min}} + \frac{\alpha_s \cdot \text{PPFD} \cdot (1 - S_{\text{min}})}{\sqrt{(1 - S_{\text{min}})^2 + (\alpha_s \cdot \text{PPFD})^2}} \quad (7)$$

with S_{eq} the value of the biochemical signal for a given irradiance, S_{min} the minimal value of the biochemical signal when *PPFD* = 0 and α_s the slope of the relationship. Under this form, S_{eq} asymptotically approaches a maximum of 1. The present version does not include curvature in order to use an irradiance function similar to Eqn 3.

The temporal response of the biochemical signal was assumed to move towards its steady-state value with different time constants for an increasing or decreasing signal:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{(S_{\text{eq}} - S)}{\tau_i}, \text{ if } S_{\text{eq}} > S \quad (8)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{(S_{\text{eq}} - S)}{\tau_d}, \text{ if } S_{\text{eq}} < S \quad (9)$$

with S the current value of the biochemical signal, τ_i the time constant for an increase and τ_d the time constant for a decrease.

The value of the biochemical signal drives the change of the osmotic potential in guard cells as:

$$\frac{d\pi}{dt} = \frac{(S - \pi)}{\tau_\pi} \quad (10)$$

with π the osmotic potential in the guard cells and τ_π the time constant.

Water moves into the guard cells as a function of the osmotic potential as:

$$\frac{dw}{dt} = \frac{(\pi - w)}{\tau_w} \quad (11)$$

with w the water content of guard cell and τ_w the time constant.

The resulting stomatal conductance is then the product of w and the maximal stomatal conductance ($g_{\max}$) under saturating irradiance:

$$g_s = w \cdot g_{\max} \quad (12)$$

These equations were adjusted to the same daily time courses of g_s described previously for the four oak species (three individuals per species) with the genetic algorithm and the ABC procedure. The precision of each parameter was estimated and compared to the dynamic and to the steady-state part of our dynamic model. The overall quality of the model was tested by comparing observed and modelled g_s with RMSE. As the Kirschbaum *et al.* (1988) model does not explicitly contain a parameter for minimal stomatal conductance ($g_{\min}$), a $g_{\min}$ was calculated from $S_{\min}$ (Eqn 7) and $g_{\max}$ as:

$$g_{\min} = S_{\min} \cdot g_{\max} \quad (13)$$

The performance of our dynamic model to describe temporal responses of g_s was compared to the Kirschbaum *et al.* (1988) model with their published parameters. To link the time constant (k) from our dynamic model and the parameters of the Kirschbaum *et al.* (1988) model, we generated asymmetric sigmoid curves of g_s using the three derivative functions described by Kirschbaum *et al.* (1988) and their respective parameters. The curves were generated by varying the parameters randomly within a uniform distribution of $\pm 10\%$ around the values published by Kirschbaum *et al.* (1988). We reproduced this procedure 200 times and adjusted our dynamic model on each resulting curve using the genetic algorithm. The resulting k of each simulated curve was then compared to the corresponding parameters of the Kirschbaum *et al.* (1988) model using a multiple regression analysis.

RESULTS

Temporal response to an instant increase in irradiance

The dynamic model reproduced the temporal response of g_s to an instant given increase in irradiance from darkness until steady-state was reached. The initial time lag and the asymmetry of the curve were accurately predicted by the model (Fig. 2). The model fit was close to the observed data in the four species ($R^2 = 0.99$, each). Values of k and r_0 displayed a significant diversity among individuals describing the different temporal responses to reach steady-state g_s (Table 2). The parameter r_0 was significantly different from 0 in *Q. petraea* and *Q. robur* individuals but not in *Q. afares* and *Q. suber*. The four individuals reached different steady-state G and displayed different maximum slopes ($Sl_{\max}$, Eqn 2).

Temporal response to a repeated cycle of instant increase and decrease in irradiance

The dynamic model was also able to describe the temporal response of g_s when changes of irradiance occurred before a steady-state level was reached. The model followed closely

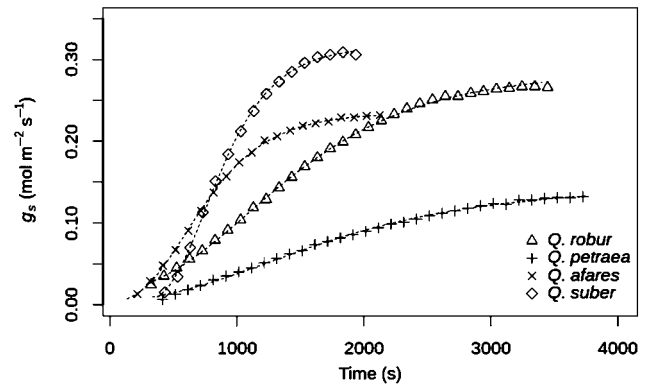


Figure 2. Temporal response of stomatal conductance (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) submitted to an instant given increase in irradiance from 0 to $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of irradiance. Each curve stems from a single leaf of four different oak species. Plants were kept under darkness till $t = 0$. Data were recorded with a time-step of 20 s and were represented with a time-step of 100 s. Symbols represent the measured data and dashed lines the adjustment made with the dynamic model ($R^2 = 0.99$ all, highest RMSE = 0.0024).

the temporal changes of g_s during alternating high and low irradiances (Fig 3a, $RMSE = 0.006$). Values of k and r_0 were different from 0 and close to those obtained with the *Q. robur* individual during an instant given increase in irradiance (Table 1). After an increase in irradiance, net CO_2 assimilation rate (A) increased faster than g_s . This resulted in a rapid increase of W_i followed by a slower decrease towards the initial steady-state value at $t = 0$ (Fig 3b). After a decrease of irradiance, W_i displayed an inverse temporal response.

Daily time courses

The two chains used for the ABC-MCMC procedure successfully reached convergence for our dynamic model and for the steady-state-models in all 12 cases (three individuals of four species, Supporting Information Fig. S2). The two chains explored the parameter space with an efficient mixing as confirmed by the low level of autocorrelations (Supporting Information Fig. S3).

The dynamic model resulted in three times less deviation from the observed data ($RMSE: 0.0049$) than the two steady-state models ($RMSE: 0.015$) over the whole set of daily time courses (Fig. 4a–c). For the three models, the overall relationship between modelled and observed data was close to the 1:1 line. However, the Ball model displayed a tendency to overestimate g_s over the whole range of values, whereas the Jarvis model over (under increasing irradiance) and underestimated (under decreasing irradiance) g_s . The observed maximal g_s was never synchronous with maximal irradiance (Fig. 4d–f). This is due to the slow temporal response of stomata and results in a hysteresis in the relationship between g_s and irradiance with higher values of g_s in the afternoon than in the morning under similar irradiance (Fig. 5). The Jarvis model was unable to predict any hysteresis whereas the dependency of g_s on A in the Ball model resulted

Table 2. Parameters of the dynamic model for stomatal conductance as estimated from an instant given increase in irradiance from 0 to $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for one individual of each oak species (Fig. 2). Parameter abbreviations are listed in Table 1, except for G which is the steady-state target ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and Sl_{max} the maximal slope of the temporal response of g_s ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$). Results from ABC adjustments are presented as quantiles at 2.5, 50 and 97.5% of the posterior distribution

Species	G ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)			k (s^{-1})			r_0 ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)			Sl_{max} ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$)		
	2.5	50	97.5	2.5	50	97.5	2.5	50	97.5	2.5	50	97.5
<i>Quercus robur</i>	0.280	0.284	0.287	0.00128	0.00134	0.00141	0.0027	0.0106	0.0177	$1.31 \cdot 10^4$	$1.35 \cdot 10^4$	$1.40 \cdot 10^4$
<i>Q. petraea</i>	0.140	0.141	0.143	0.00106	0.00109	0.00112	0.0000	0.0002	0.0008	$0.55 \cdot 10^4$	$0.57 \cdot 10^4$	$0.59 \cdot 10^4$
<i>Q. suber</i>	0.315	0.316	0.318	0.00331	0.00338	0.00344	0.0000	0.0006	0.0021	$3.83 \cdot 10^4$	$3.92 \cdot 10^4$	$4.00 \cdot 10^4$
<i>Q. afares</i>	0.234	0.235	0.237	0.00275	0.00282	0.00289	0.0001	0.0012	0.0037	$2.36 \cdot 10^4$	$243 \cdot 10^4$	$2.48 \cdot 10^4$

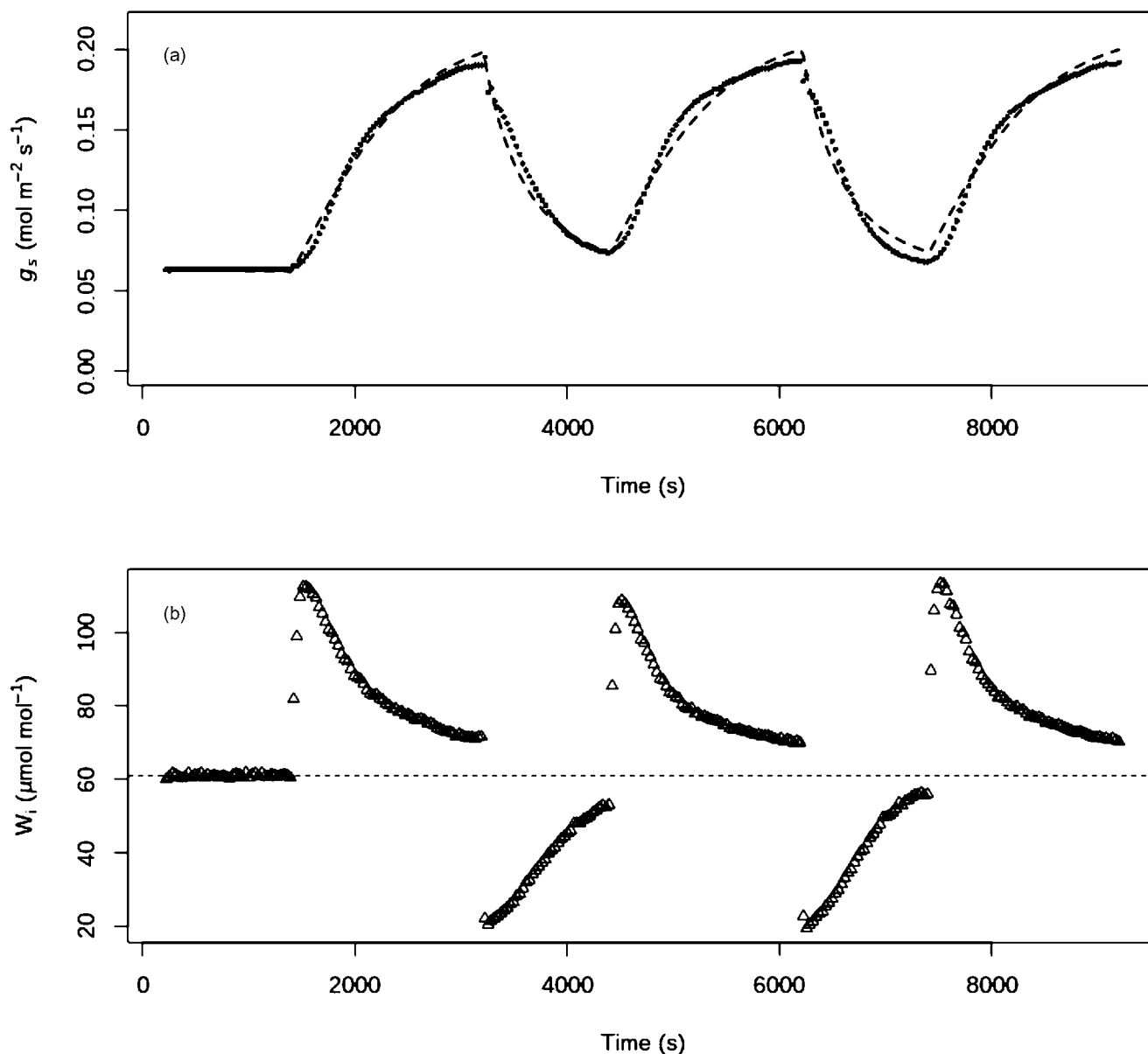


Figure 3. Temporal response of (a) the stomatal conductance (g_s) and (b) the intrinsic water-use efficiency (W_i) of a *Quercus robur* leaf submitted to repeated cycle of 30 min under $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ followed by 20 min under $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. At $t = 0$ the plant had been submitted to $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of irradiance during 20 min. Circles represent the measured data and dashed lines the values adjusted with the dynamic model (Mean and Confidence interval, $k = 0.0016 \text{ s}^{-1}$ [0.0013–0.0019], $r_0 = 0.013 \text{ mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ [0.0014–0.038], $R^2 = 0.98$, RMSE = 0.0060).

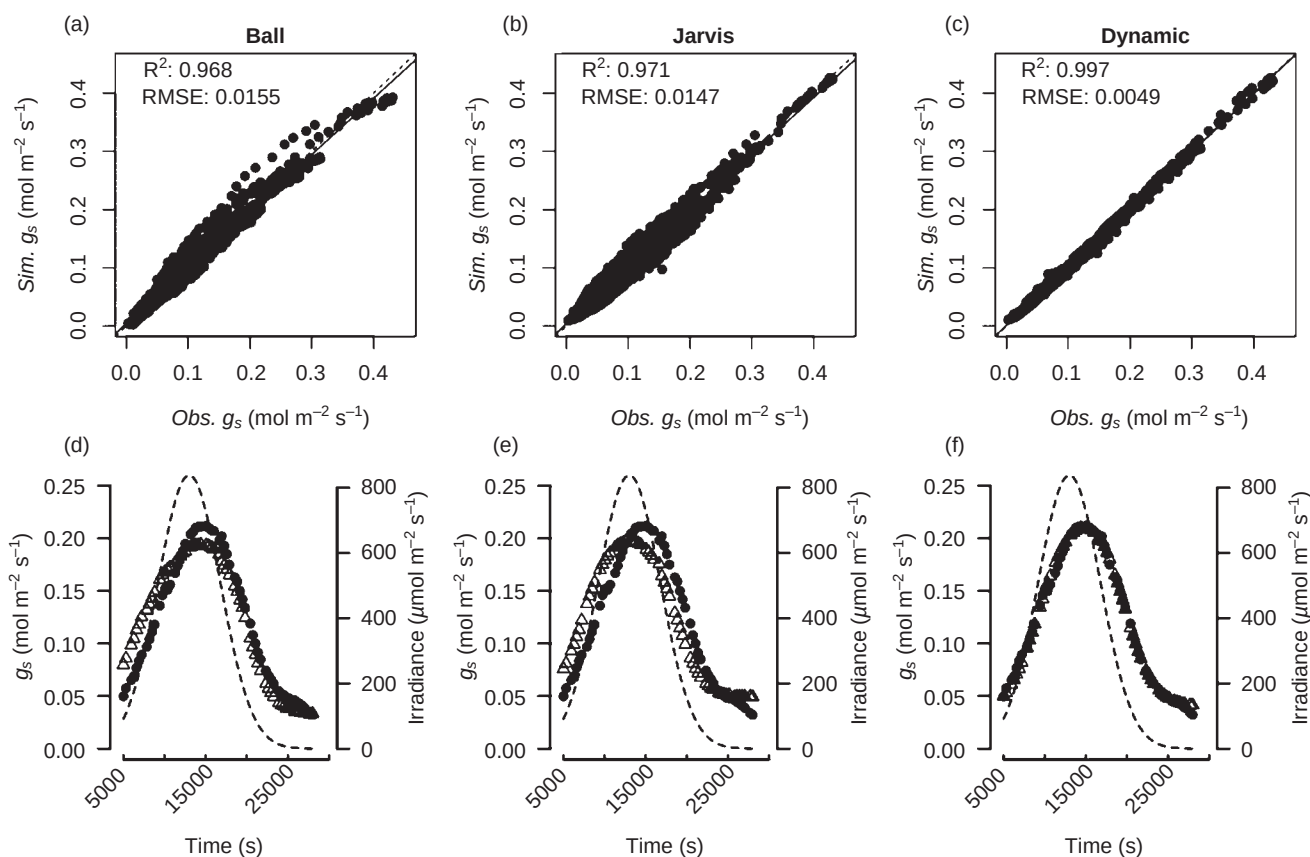


Figure 4. Comparison of simulated and observed time courses of stomatal conductance (g_s) as obtained with four species and 12 daily time courses with (a) the Ball model, (b) the Jarvis model, (c) the dynamic model. Black line: regression; dotted line: 1:1 line. An example of adjustment made on a *Quercus suber* leaf is presented for each model: (d) Ball, (e) Jarvis, (f) dynamic model. Dashed lines: irradiance; closed dots: observed g_s and open triangles: simulated g_s .

in a slight hysteresis. The dynamic model was able to precisely reproduce the off-set between maximum irradiance and maximum g_s .

The four species displayed a large diversity of W_i integrated over the day ranging from 37.6 to 106.3 μ mol mol⁻¹.

This diversity was exploited to compare modelled and observed W_i across the three models (Fig. 6a). The dynamic model showed three times less deviation from the observed W_i ($RMSE: 5.46$) compared to the Ball ($RMSE: 15.4$) or the Jarvis ($RMSE: 15.2$) models (Fig. 6b–d). The Ball model

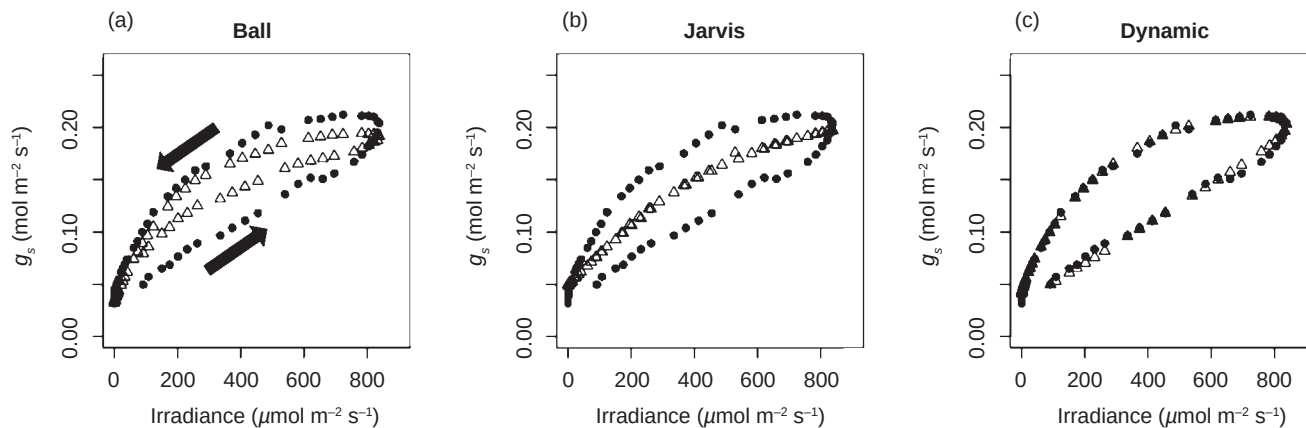


Figure 5. Observed (closed circles) and modelled (open triangles) hysteresis of stomatal conductance (g_s) in response to irradiance for a *Quercus suber* leaf: (a) Ball model, (b) Jarvis model, (c) dynamic model. Arrows show the increasing and decreasing parts of the daily time course.

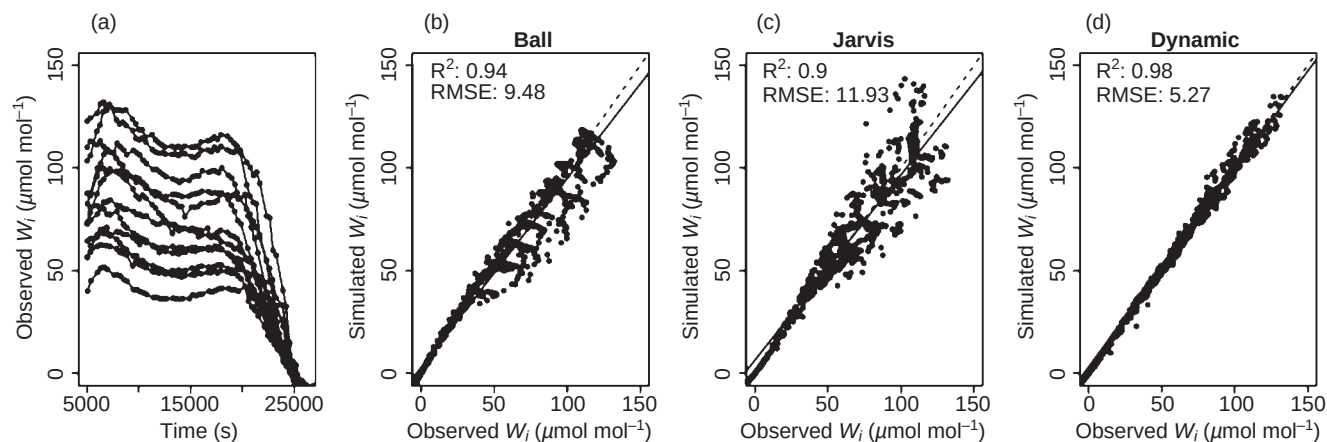


Figure 6. Intrinsic water-use efficiency ($W_i = A/g_s$) recorded during all daily time courses (a) and comparison of W_i observed versus modelled with four oak species (12 individuals): (b) Ball model, (c) Jarvis model, (d) dynamic model.

mostly underestimated W_i by up to 30%, whereas the Jarvis model over or underestimated W_i by up to $\pm 50\%$. The dynamic model followed closely the 1:1 line and the error was always smaller than that in the other models.

Figure 7 shows the values of the parameters of the dynamic model estimated from daily time courses for individuals in different oak species. The Bayesian confidence intervals revealed significant differences among individuals for all

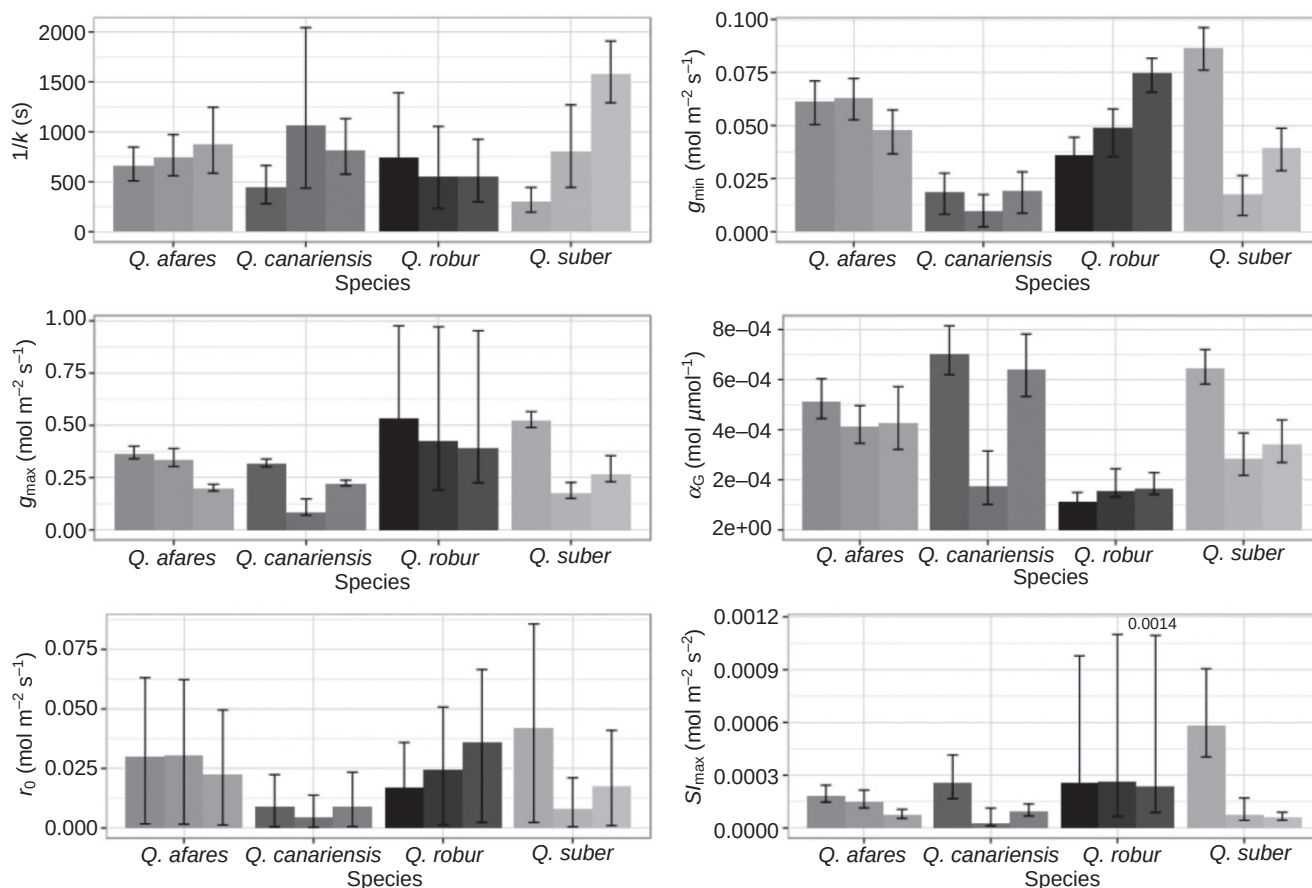


Figure 7. Parameters estimated by ABC-MCMC using the dynamic model of stomatal conductance: k the time constant, $g_{\min}$ the minimal stomatal conductance to water vapour in darkness, $g_{\max}$ the maximal stomatal conductance to water vapour, α_G the sensitivity of steady-state stomatal conductance to irradiance, r_0 the time lag modifier and $S_{l_{\max}}$ the maximum slope. Error bars represent 2.5 and 97.5% quantiles of posterior distribution. For $S_{l_{\max}}$ an error bar was truncated and the higher value was written above.

parameters. Values of k were not correlated with steady-state parameters ($g_{\max}$, $g_{\min}$ and α_G , data not shown). Small differences were evidenced among species for k with maximal and minimal values detected in *Q. suber* (Fig 7a). Minimal stomatal conductance ($g_{\min}$) displayed a large inter-individual variability. Maximal stomatal conductance ($g_{\max}$) displayed large differences within three species and a large range of possible values in *Q. robur*. The sensitivity of g_s to irradiance (α_G) was significantly different among individuals and species and *Q. robur* displayed the lowest values. The initial value of the temporal response of g_s (r_0) was poorly estimated from daily time courses and the maximal slope of g_s ($Sl_{\max}$) displayed large differences among individuals.

Validation of parameter values

The measured response curves between G and irradiance were located within the Bayesian confidence interval area of the response curves predicted from the daily time courses for the three tested individuals (Fig. 8). The steady-state parameters ($g_{\max}$, $g_{\min}$, α_G) estimated by the model from daily time courses accurately predicted G . The confidence interval of k estimated from the temporal response of g_s to an instant given increase in irradiance overlapped with the possible values of k estimated from daily time curves (Fig. 9) and can therefore be considered as not different.

Model cross-validation

The model cross-validation resulted in very small *RMSE* with only slight differences among the tested species (mean $\pm$ SD): *Q. afares*, 0.00513 ± 0.00076 ; *Q. robur*, 0.00263 ± 0.0005 ; *Q. suber*, 0.00552 ± 0.00382 ; *Q. canariensis*, 0.00404 ± 0.001 .

Comparison with the Kirschbaum *et al.* (1988) model

The two chains used for the *ABC-MCMC* procedure successfully reached the convergence for the Kirschbaum *et al.* (1988) model in all cases (four species with three individuals each). The overall quality of the adjustments (Fig. 10, *RMSE*: 0.0051) was close to that of the dynamic model (Fig. 4c, *RMSE*: 0.0049). However, the overall precision of parameter estimates was much lower for the Kirschbaum *et al.* (1988) model (Fig. 11 versus Fig. 7). Especially, the four time constants displayed very large confidence intervals (Fig. 11) and were significantly inter-correlated (all $r \geq 0.82$). They were also significantly correlated with $1/k$ from our dynamic model (all $r \geq 0.79$). For the steady-state section of the model (Fig. 11), the parameter values were close to those predicted from our dynamic model (Fig. 7). Maximal stomatal conductance ($g_{\max}$) estimated from the Kirschbaum *et al.* (1988) model displayed a higher precision (Fig. 11) than from our model for *Q. robur* and a lower one for *Q. suber* (Fig. 7). Nevertheless, except for *Q. robur*, $g_{\max}$ estimates from the two models were very close ($R^2 = 0.99$) and in all species, the values of minimal stomatal conductance ($g_{\min}$) were close to the estimates of the dynamic model ($R^2 = 0.99$).

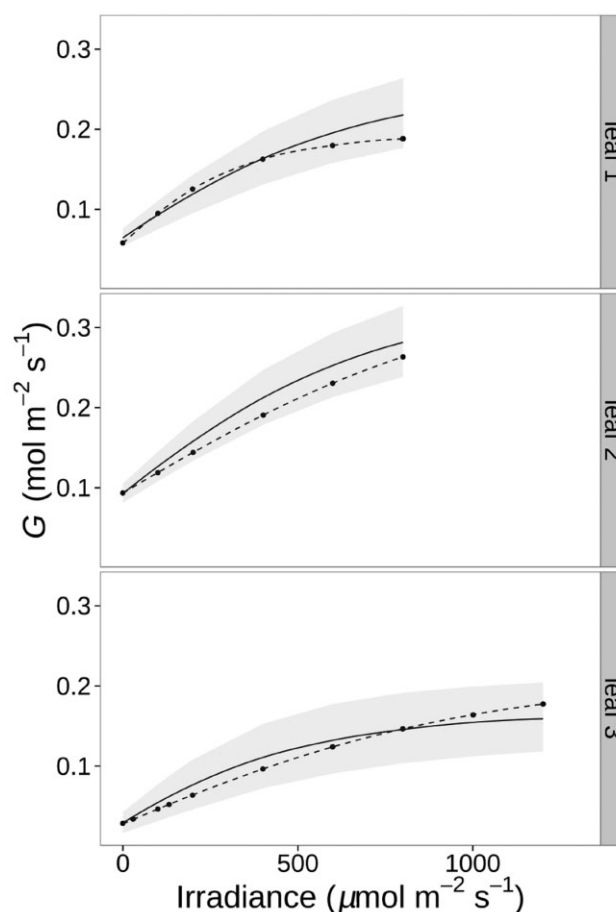


Figure 8. Comparison between modelled (continuous line) and observed (dashed lines and dots) steady-state stomatal conductance (G) in response to irradiance. Parameters used for the modelled response curves were obtained with adjustments from daily time courses (three individuals of *Quercus robur*). The grey area represents the confidence interval at 95% estimated from daily time courses using Monte-Carlo sampling.

Our dynamic model produced a similar simulation of g_s as the Kirschbaum *et al.* (1988) model to an instant given increase in irradiance (Fig. 12). After 200 simulations using the two models, the time constant $1/k$ was tightly correlated with the time constants for changes of osmotic pressure in the guard cells (τ_π) and for water movement into the guard cells (τ_w) ($1/k = -1.048 + 0.544 \tau_\pi + 0.595 \tau_w$; $P < 0.001$, $R^2 = 0.98$); however, for medium $1/k$ -values τ_w and τ_π could vary independently. The time constant for an increase of the biochemical signal (τ_i) was not significantly correlated with $1/k$ but with r_0 ($P < 0.001$, $R^2 = 0.91$, data not shown).

DISCUSSION

Temporal response to variations of irradiance

The temporal response of g_s to an instant given increase in irradiance has frequently been described by adjusting an exponential model (e.g. Whitehead & Teskey 1995; Vico *et al.* 2011). Nevertheless, such a model is unable to describe

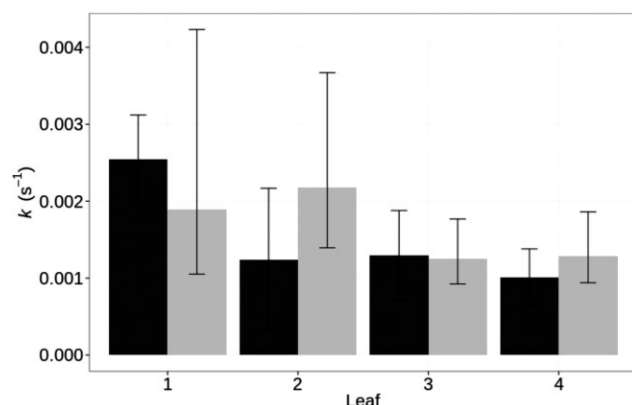


Figure 9. Comparison of the time constant (k) for a temporal response of stomatal conductance derived from instant increases in irradiance (grey) and from daily time courses (black). Four individuals of *Quercus robur* numbered 1 to 4 were used. Error bars represent confidence intervals at 95%.

the initial time lag observed after an instant increase in irradiance. Thus, Naumburg & Ellsworth (2000) suggested using two different models to estimate the time constant of g_s depending on the presence or absence of an initial time lag. In comparison, our dynamic model accurately described different temporal responses of g_s independently of the occurrence of a time lag. Moreover, there was no need to introduce a linear estimation of the maximal rate of g_s increase ($SI_{\max}$) as suggested by Naumburg & Ellsworth (2000). The dynamic model produced a direct estimation of $SI_{\max}$ that depends on the time constant (k) and the steady-state stomatal conductance (G).

Currently, canopy models use steady-state models to predict g_s . Such models do not include a temporal response of g_s during sunflecks and the resulting limitations of net CO_2 assimilation rate A (Way & Pearcy 2012). In our experiments, the temporal response of g_s to an instant given increase in irradiance showed a limitation of A , like observed during sunflecks (Way & Pearcy 2012). Moreover, during daily time courses, the limitation of A by g_s was also present due to the hysteresis of g_s to irradiance. To investigate stomatal and non-stomatal limitations of photosynthesis, dynamic models are essential. The small number of parameters in our model facilitates its parameterization, thus its integration into canopy models to more accurately capture forest carbon dynamics (Way & Pearcy 2012).

Daily time courses

Sun-exposed leaves are subjected, during clear days, to a continuous variation of irradiance. Our dynamic model clearly outperformed the two steady-state models to predict daily time courses of g_s . Using an exponential model, Rayment *et al.* (2000) also showed a better performance of their dynamic model; however, still with relatively low accuracy. In this and other publications (Whitehead & Teskey 1995; Vico *et al.* 2011) where an exponential model was used

to predict the temporal response of g_s , the environmental conditions were considered stable between each measured g_s , which results in a stepwise change of environmental conditions. Thus, the large time steps (20 min) used by Rayment *et al.* (2000) induced a biased estimation of the temporal response. To solve this problem, our dynamic model uses short-time intervals and a spline function in the differential equation to estimate the continuous variation of irradiance. Such an approach could indeed be extended to other environmental variables.

During simulated daily time courses, the slow temporal response of g_s has as main consequence that the maximal g_s is reached after the maximal irradiance. Under constant VPD_i , the observed hysteresis of g_s to irradiance is the result of previous variations of g_s . This dependence on past temporal variations is also valid under natural conditions, however, with the additional interaction of several other environmental factors such as VPD_i , temperature, etc. This suggests that a large component of the hysteresis observed under natural conditions may in fact merely represent the kinetic lag of g_s to environmental parameters. Such a hysteresis of g_s to irradiance has been described previously (Ng & Jarvis 1980) and is predicted with accuracy by the dynamic model that takes into consideration the previous state of g_s to predict the current value. The Ball *et al.* (1987) model was able to simulate a small hysteresis of g_s due to the indirect influence of observed g_s via A in the equation. The slower the response of g_s and therefore its limitation of A , the more hysteresis will the Ball model simulate. Our model is the first to accurately describe the hysteresis of g_s to irradiance.

Parameter estimates

Dynamic models are more difficult to adjust compared to steady-state models because they are based on differential equations. For its simplicity, Vico *et al.* (2011) used an

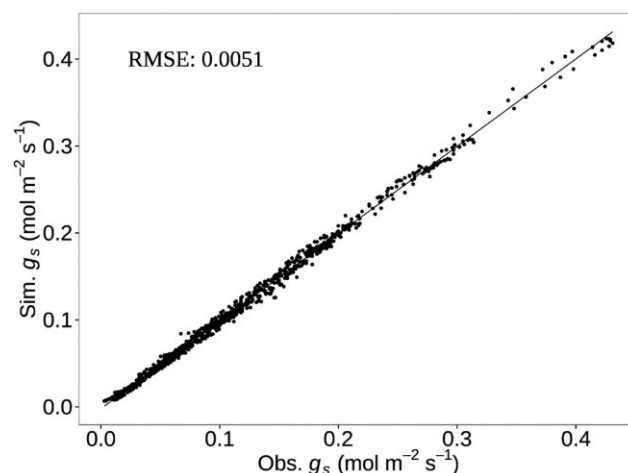


Figure 10. Comparison of stomatal conductance (g_s) recorded during daily time courses or simulated with the Kirschbaum *et al.* (1988) model. Data from four species and 12 daily time courses. Black line: 1/1 line.

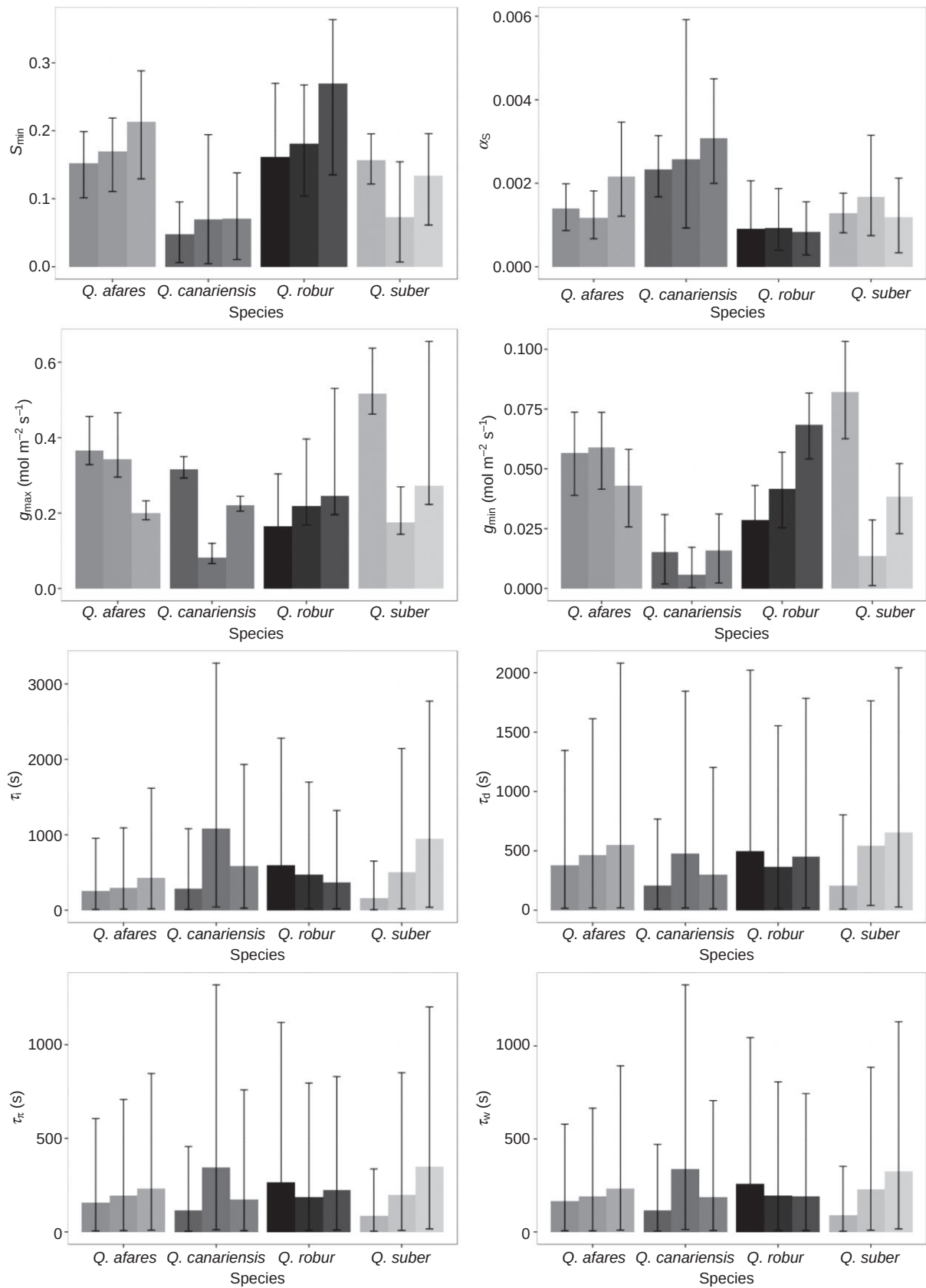


Figure 11. Parameters estimated using *ABC-MCMC* and the Kirschbaum *et al.* (1988) model over the four species and 12 daily time courses (see Table 1 for parameters definition). Error bars represent 2.5 and 97.5% quantiles of posterior distribution.

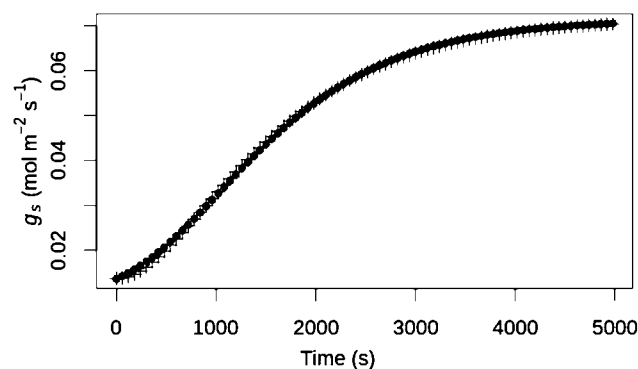


Figure 12. Response to an instant given increase in irradiance as simulated by the dynamic model (circle, $k = 0.00105 \text{ s}^{-1}$, $r_0 = 0.0104 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) and the Kirschbaum *et al.* (1988) model (crosses) using the values published by Kirschbaum *et al.* (1988) ($g_{\min} = 0.0136 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $g_{\max} = 0.0715 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $\tau_i = 0.27 \text{ min}$, $\tau_r = 13 \text{ min}$, $\tau_w = 15 \text{ min}$).

analytical exponential model to describe the temporal response of g_s , whereas Kirschbaum *et al.* (1988), Percy *et al.* (1997) and Naumburg, Ellsworth & Katul (2001) used more complex differential equations. However, parameter values of this more complex model were never adjusted statistically. Using the ABC procedure (Toni *et al.* 2009), we detected differences in precision of the estimated parameters of the dynamic model. For example, a large error in the estimation of $g_{\max}$ was detected for *Q. robur*, probably because the irradiance variation used during the daily time courses was not sufficient to reach the saturation of g_s . Further, the error in the estimation of the time constant k was depending on the rapidity of variation in irradiance. Estimates of k reach a higher precision under conditions that limit the speed of stomatal response and therefore constrain the adjustment. Thus, a slow variation of irradiance was closely followed by g_s and thus resulted in a lower precision in the estimation of k . The ABC procedure not only allows finding best parameters but also informs on their precision. Thus, the precision of parameter estimates using our dynamic model allowed detecting differences between species or individuals, comparing models or investigating experimental limitations.

Validation of parameter values

The estimates of steady-state parameters ($g_{\max}$, $g_{\min}$, α_G) as well as of the dynamic parameter k were similar when derived from daily time courses or from the response curves of G to irradiance. The validation was made under the assumption of a constant k during changes of irradiance. The high quality of the adjustments of the dynamic model during daily time courses suggests that the use of a constant k does not introduce a bias. In the future, dynamic and steady-state parameters estimated from response curves of G might be used to parameterize dynamic models of daily variation, for example, for canopy level simulations.

Model cross-validation

Using 10-folds cross-validation, our model displayed low RMSE for all species that signifies a high accuracy for predictions. The predictive power of our model was independent of the data used to adjust parameters.

Comparison with the Kirschbaum *et al.* (1988) model

Despite similar adjustment qualities, the precision of parameter estimates from the two models was different due to differences in their conception. The temporal response of g_s of our dynamic model was directly dependent on G and $g_{\max}$ while in the Kirschbaum *et al.* (1988) model it was calculated in two steps. In the first step, the shape of the temporal response of g_s was estimated and in the second step, $g_{\max}$ was used for scaling the response. This results in different precision for $g_{\max}$ estimates. The correlation among time constants for the Kirschbaum *et al.* (1988) model resulted in large confidence intervals which are the sign of an over-parameterized model. Moreover, the tight correlations among the time constants of the Kirschbaum *et al.* (1988) model indicate a constraint on the shape of temporal response. The small number of parameters in our dynamic model had no impact on the explained variability and allowed a more precise estimation of parameters. This suggests that the shape constrained by the asymmetric sigmoid model is close to the form imposed by biological processes. Parameters k and r_0 were significantly correlated with different time constants from the Kirschbaum *et al.* (1988) model. This allows, to some extent, the mechanistic interpretation: k is probably related to the osmotic changes and water movements during stomatal opening and closing whereas r_0 might be related to the biochemical processes involved in signal perception.

Importance of the temporal response of g_s for W_i

The temporal response of g_s after an instant given increase in irradiance resulted in a limitation of net CO_2 assimilation (A). Modelling the temporal response of g_s allows therefore to better predict not only when A is limited by g_s during the day but also the resulting variations of W_i . This was also shown by Kirschbaum *et al.* (1998) who suggested that A was under control of g_s under rapidly fluctuating irradiance. During repeated instant variations of irradiance, the temporal responses of W_i seemed to converge to a unique steady-state value. Vico *et al.* (2011) proposed a dynamic model using an optimal WUE value, based on the optimization theory by Cowan & Farquhar (1977). This optimal WUE value was used to generate steady-state targets for the exponential model describing separately the temporal response of g_s increase and decrease. Compared to the one proposed by Vico *et al.* (2011), our dynamic model is able to describe the transitions after a change of irradiance, which allows testing the impact of more complex irradiance variations on integrated W_i .

During daily time courses, the degree of limitation of A by g_s determines the daily variations of W_i . The temporal

responses of g_s and its asymmetry induce larger values of W_i in the morning than in the afternoon. Under natural conditions, rapid fluctuations of irradiance probably influence the temporal response of W_i (Kirschbaum *et al.* 1998; Kaiser & Kappen 2000). The dynamic model followed continuously each variation of irradiance to describe the temporal response of g_s . This resulted in a much more accurate prediction of W_i , compared to the Ball and Jarvis models. This suggests that the temporal response of g_s is highly important to predict temporal variations of W_i during the day and therefore the daily integrated W_i .

The daily variations of W_i suggest that W_i estimates from steady-state gas exchange measurements are not representative of daily integrated W_i . The interpretation of carbon isotope discrimination during photosynthesis ($\Delta^{13}\text{C}$) as an estimator of time integrated W_i depends on the temporal variations of W_i during the integration time period. Meinzer, Goldstein & Grantz (1990) proposed to integrate the variations of W_i by using a mean from daily time courses; however, the approaches since used in the literature still diverge widely. The main approaches used currently to estimate W_i in natural environmental variations are steady-state light saturated estimations (Zhang, Fins & Marshall 1994; Roussel *et al.* 2009) or repeated measurements during the day (Grossnickle, Fan & Russell 2005; Fan, Grossnickle & Russell 2008). To avoid fluctuations of W_i , measurements from daily time courses are often filtered with criteria based on irradiance (Guehl, Fort & Ferhi 1995), time of day (Gornall & Guy 2007) or VPD_i (Grossnickle & Fan 1998). This has as consequence that temporal variations of W_i are often ignored to facilitate the estimation of time integrated W_i . The introduction of temporal response of g_s in gas exchange models should allow assessing the daily integrated W_i more accurately and open the way to develop a standardized method of measurements.

Parameters of the dynamic model: comparison with the Literature

Results from the literature suggest that the parameters from our dynamic model might be related to leaf morphology. Buckley, Sack & Gilbert (2011) also recently linked speed of stomatal response to leaf anatomy, specifically bundle sheath extensions. Further, Franks & Farquhar (2007) suggested that the rapidity of stomatal movement (represented by k in our model) might be explained by the morphology of stomata and the interaction with their subsidiary cells. They also suggested that the differences of $g_{\max}$ were dependent on stomatal density or length.

In our experiments, we made the assumption that k remains constant during the daily time courses. This assumption seems to be valid when only irradiance changes. Nevertheless, there is experimental evidence that the time constant depends also on leaf temperature (Ng & Jarvis 1980; Pepin & Livingston 1997; Rayment *et al.* 2000), air humidity (Tinoco-Ojanguren & Percy 1993; Kaiser & Kappen 2000, 2001), leaf water status (Davies & Kozlowski 1975; Knapp & Smith 1990; Barradas, Jones & Clark 1994) and CO_2 concentration

(Knapp, Fahnestock & Owensby 1994; Hu *et al.* 2010). Biological processes might also modify the time constant during daily time courses: the perception of different light quality (Kirschbaum *et al.* 1988), the modifications of the osmotic potential by accumulation of potassium and malate during the day (Kirschbaum *et al.* 1988) and the activity of aquaporins during water movements in guard cells (Tyerman *et al.* 1999). Moreover, Paoletti & Grulke (2010) suggested that ozone exposure changed the time constant and increased the time lag after a change of irradiance. Further investigations are needed to describe the potential interactions among environmental variables on the time constants of stomatal response.

However, the interpretation of the variability of time constants in relation to irradiance levels depends on the underlying assumptions. For example, the duration of a shade period before a change of irradiance was shown to have an effect on time constants (Cardon, Berry & Woodrow 1994; Whitehead & Teskey 1995; Kaiser & Kappen 2000). To estimate them, Whitehead & Teskey (1995) assumed different steady-state target g_s for a same level of irradiance. Under this assumption, the adjustment of separate exponential response curves for subsequent shade/light periods resulted in apparently different time constants of g_s depending on the duration of the preceding shade period. Using a dynamic model and the assumption of a constant steady-state target G for a same level of irradiance as suggested by Ng & Jarvis (1980), a similar data set could be adjusted with a unique time constant.

Perspectives

Our dynamic model is formulated to allow extension to different environmental responses by modifying the steady-state g_s (G). Under natural conditions, VPD_i , temperature and CO_2 concentration impact g_s in addition to irradiance. Experiments conducted by Franks & Farquhar (2007) showed under higher VPD_i not only a lower g_s but also a little enhancement of the initial rate of the temporal response of g_s to irradiance. This suggests that G and perhaps also the time constant (k) were modified in response to VPD_i . In future experiments, the temporal response to VPD_i could be studied using for example the published model by Mott & Peak (2012) which predicts the combined response of g_s to VPD_i and temperature.

Conclusion

Four models were successfully adjusted with ABC on daily time courses of g_s . Dynamic models predicted g_s with a higher accuracy than steady-state models. For our dynamic model, parameters were estimated with a higher precision compared to the Kirschbaum *et al.* (1988) model, and this allows assessing the intra- and inter-specific diversity of the parameters. Our dynamic model was also more accurate in predicting variations of W_i during daily time courses by following continually the irradiance variations. This highlights the importance of the temporal response of g_s for the assessment of long term integrated W_i . Our dynamic model was tested

under controlled variations of irradiance; during future research VPD_1 effect should be studied in interaction with irradiance.

ACKNOWLEDGMENTS

Silvère Viallet-Chabrand was supported by a doctoral grant from Université de Lorraine (France). We thank Tracy Lawson (University of Essex, Colchester, UK) and Pierre Montpied (INRA, Champenoux, France) for their constructive comments on an earlier version of the manuscript and Cécile Baudet (INRA, Champenoux, France) and Sameh Mhamdi (INAT/INRGREF, Tunis, Tunisia) for their help during gas exchange measurements.

REFERENCES

- Andrieu C. & Thoms J. (2008) A tutorial on adaptive MCMC. *Statistics and Computing* **18**, 343–373.
- Baldocchi D. & Harley P. (1995) Scaling carbon-dioxide and water-vapor exchange from leaf to canopy in a deciduous forest: 2. Model testing and application. *Plant, Cell & Environment* **18**, 1157–1173.
- Ball M., Woodrow I. & Berry J. (1987) A model predicting stomatal conductance and its contribution to the control of photosynthesis under different environmental conditions. In *Progress in Photosynthesis Research* (ed. J. Biggins), pp. 221–224. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Barradas V., Jones H. & Clark J. (1994) Stomatal responses to changing irradiance in *Phaseolus-vulgaris* L. *Journal of Experimental Botany* **45**, 931–936.
- Bates D.M. & Watts D.G. (2008) *Nonlinear Regression Analysis and Its Applications*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Buckley T.N., Sack L. & Gilbert M.E. (2011) The role of bundle sheath extensions and life form in stomatal responses to leaf water status. *Plant Physiology* **156**, 962–973.
- Cardon Z., Berry J. & Woodrow I. (1994) Dependence of the extent and direction of average stomatal response in *Zea mays* L. and *Phaseolus vulgaris* L. on the frequency of fluctuations in environmental stimuli. *Plant Physiology* **105**, 1007–1013.
- Chen S.H., Jakeman A.J. & Norton J.P. (2008) Artificial Intelligence techniques: an introduction to their use for modelling environmental systems. *Mathematics and Computers in Simulation* **78**, 379–400.
- Cowan I.R. & Farquhar G.D. (1977) Stomatal function in relation to leaf metabolism and environment. In *Integration of Activity in the Higher Plants. Symposia of the Society of Experimental Biology* (ed. D.H. Jennings), pp. 471–505. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Cramer W., Bondeau A., Woodward F.I., et al. (2001) Global response of terrestrial ecosystem structure and function to CO_2 and climate change: results from six dynamic global vegetation models. *Global Change Biology* **7**, 357–373.
- Damour G., Simonneau T., Cochard H. & Urban L. (2010) An overview of models of stomatal conductance at the leaf level. *Plant, Cell & Environment* **33**, 1419–1438.
- Davies W. & Kozlowski T. (1975) Stomatal responses to changes in light-intensity as influenced by plant water stress. *Forest Science* **21**, 129–133.
- Fan S., Grossnickle S.C. & Russell J.H. (2008) Morphological and physiological variation in western redcedar (*Thuja plicata*) populations under contrasting soil water conditions. *Trees-Structure and Function* **22**, 671–683.
- Farquhar G.D. & Richards R. (1984) Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Australian Journal of Plant Physiology* **11**, 539–552.
- Farquhar G.D. & Sharkey T. (1982) Stomatal conductance and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology. Plant Molecular Biology* **33**, 317–345.
- Franks P.J. & Farquhar G.D. (2007) The mechanical diversity of stomata and its significance in gas-exchange control. *Plant Physiology* **143**, 78–87.
- Gelman A. & Rubin D.B. (1992) Inference from iterative simulation using multiple sequences. *Statistical Science* **7**, 457–472.
- Gornall J.L. & Guy R.D. (2007) Geographic variation in ecophysiological traits of black cottonwood (*Populus trichocarpa*). *Canadian Journal of Botany* **85**, 1202–1213.
- Grossnickle S.C. & Fan S.H. (1998) Genetic variation in summer gas exchange patterns of interior spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss x *Picea engelmannii* Parry ex Engelm.). *Canadian Journal of Forest Research* **28**, 831–840.
- Grossnickle S.C., Fan S.H. & Russell J.H. (2005) Variation in gas exchange and water-use efficiency patterns among populations of western redcedar. *Trees-Structure and Function* **19**, 32–42.
- Guehl J., Fort C. & Ferhi A. (1995) Differential response of leaf conductance, carbon-isotope discrimination and water-use efficiency to nitrogen deficiency in maritime pine and pedunculate oak plants. *New Phytologist* **131**, 149–157.
- Haario H., Saksman E. & Tamminen J. (2001) An adaptive Metropolis algorithm. *Bernoulli* **7**, 223–242.
- Harley P. & Baldocchi D. (1995) Scaling carbon-dioxide and water-vapor exchange from leaf to canopy in a deciduous forest: 1. Leaf model parametrization. *Plant, Cell & Environment* **18**, 1146–1156.
- Hartig F., Calabrese J.M., Reineking B., Wiegand T. & Huth A. (2011) Statistical inference for stochastic simulation models – theory and application. *Ecological Letters* **14**, 816–827.
- Hu H., Boisson-Dernier A., Israelsson-Nordstroem M., Boehmer M., Xue S., Ries A., Godoski J., Kuhn J.M. & Schroeder J.I. (2010) Carbonic anhydrases are upstream regulators of CO_2 -controlled stomatal movements in guard cells. *Nature Cell Biology* **12**, 87–U234.
- Jarvis P. (1976) Interpretation of variations in leaf water potential and stomatal conductance found in canopies in field. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **273**, 593–610.
- Jarvis P. (1995) Scaling processes and problems. *Plant, Cell & Environment* **18**, 1079–1089.
- Kaiser H. & Kappen L. (2000) In situ observation of stomatal movements and gas exchange of *Aegopodium podagraria* L. in the understorey. *Journal of Experimental Botany* **51**, 1741–1749.
- Kaiser H. & Kappen L. (2001) Stomatal oscillations at small apertures: indications for a fundamental insufficiency of stomatal feedback-control inherent in the stomatal turgor mechanism. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1303–1313.
- Kaufmann M. (1982) Leaf conductance as a function of photosynthetic photon flux-density and absolute-humidity difference from leaf to air. *Plant Physiology* **69**, 1018–1022.
- Kirschbaum M.U.F., Gross L. & Pearcy R. (1988) Observed and modelled stomatal responses to dynamic light environments in the shade plant *Alocasia-Macrorrhiza*. *Plant, Cell & Environment* **11**, 111–121.
- Kirschbaum M.U.F., Kuppers M., Schneider H., Giersch C. & Noe S. (1998) Modelling photosynthesis in fluctuating light with inclusion of stomatal conductance, biochemical activation and pools of key photosynthetic intermediates. *Planta* **204**, 16–26.
- Knapp A. & Smith W. (1990) Contrasting stomatal responses to variable sunlight in 2 sub-alpine herbs. *American Journal of Botany* **77**, 226–231.
- Knapp A.K., Fahnestock J.T. & Owensby C.E. (1994) Elevated atmospheric CO_2 alters stomatal responses to variable sunlight in a C_4 grass. *Plant, Cell & Environment* **17**, 189–195.
- Kohavi R. (1995) A study of cross-validation and bootstrap for accuracy estimation and model selection. In *Proceedings of the 14th International Joint Conference on Artificial Intelligence – Volume 2*, pp. 1137–1143. Morgan Kaufmann Publishers Inc., Montreal, Quebec, Canada.
- Leuning R. (1990) Modeling stomatal behavior and photosynthesis of *Eucalyptus grandis*. *Australian Journal of Plant Physiology* **17**, 159–175.
- Leuning R., Kelliher F., Depury D. & Schulze E. (1995) Leaf nitrogen, photosynthesis, conductance and transpiration – scaling from leaves to canopies. *Plant, Cell & Environment* **18**, 1183–1200.
- Marjoram P., Molitor J., Plagnol V. & Tavaré S. (2003) Markov Chain Monte Carlo without likelihoods. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 15324–15328.
- Meinzer F., Goldstein G. & Grantz D. (1990) Carbon isotope discrimination in coffee genotypes grown under limited water-supply. *Plant Physiology* **92**, 130–135.
- Misson L., Panek J.A. & Goldstein A.H. (2004) A comparison of three approaches to modelling leaf gas exchange in annually drought-stressed ponderosa pine forests. *Tree Physiology* **24**, 529–541.
- Mott K.A. & Peak D. (2012) Testing a vapour-phase model of stomatal responses to humidity. *Plant, Cell & Environment*. doi: 10.1111/pce.12026.
- Naumburg E. & Ellsworth D.S. (2000) Photosynthesis sunfleck utilization potential of understorey saplings growing under elevated CO_2 in FACE. *Oecologia* **122**, 163–174.

- Naumburg E., Ellsworth D.S. & Katul G.G. (2001) Modeling dynamic understory photosynthesis of contrasting species in ambient and elevated carbon dioxide. *Oecologia* **126**, 487–499.
- Ng P. & Jarvis P. (1980) Hysteresis in the response of stomatal conductance in *Pinus-Sylvestris* L. needles to light – observations and a hypothesis. *Plant, Cell & Environment* **3**, 207–216.
- Noe S.M. & Giersch C. (2004) A simple dynamic model of photosynthesis in oak leaves: coupling leaf conductance and photosynthetic carbon fixation by a variable intracellular CO₂ pool. *Functional Plant Biology* **31**, 1195–1204.
- Ooba M. & Takahashi H. (2003) Effect of asymmetric stomatal response on gas-exchange dynamics. *Ecological Modelling* **164**, 65–82.
- Paoletti E. & Grulke N.E. (2010) Ozone exposure and stomatal sluggishness in different plant physiognomic classes. *Environmental Pollution* **158**, 2664–2671.
- Pearcy R.W., Gross L.J. & He D. (1997) An improved dynamic model of photosynthesis for estimation of carbon gain in sunfleck light regimes. *Plant, Cell & Environment* **20**, 411–424.
- Pepin S. & Livingston N.J. (1997) Rates of stomatal opening in conifer seedlings in relation to air temperature and daily carbon gain. *Plant, Cell & Environment* **20**, 1462–1472.
- Plummer M., Best N., Cowles K. & Vines K. (2006) CODA: convergence diagnosis and output analysis for MCMC. *R News* **6**, 7–11.
- Rayment M.B., Loustau D. & Jarvis P.G. (2000) Measuring and modelling conductances of black spruce at three organizational scales: shoot, branch and canopy. *Tree Physiology* **20**, 713–723.
- Roussel M., Le Thiec D., Montpied P., Ningre N., Guehl J.-M. & Brendel O. (2009) Diversity of water-use efficiency among *Quercus robur* genotypes: contribution of related leaf traits. *Annals of Forest Science* **66**, 2419–2431.
- Sala A. & Tenhunen J.D. (1996) Simulations of canopy net photosynthesis and transpiration in *Quercus ilex* L. under the influence of seasonal drought. *Agricultural and Forest Meteorology* **78**, 203–222.
- Schwartz A. & Zeiger E. (1984) Metabolic energy for stomatal opening – roles of photophosphorylation and oxidative-phosphorylation. *Planta* **161**, 129–136.
- Soetaert K., Petzoldt T. & Setzer R.W. (2010) Solving Differential Equations in R: package deSolve. *Journal of Statistical Software* **33**, 1–25.
- Spritsin M., Chen J.M., Desai A. & Gough C.M. (2012) Evaluation of leaf-to-canopy upscaling methodologies against carbon flux data in North America. *Journal of Geophysical Research – Biogeosciences* **117**, G01023.
- Stegemann J., Timm H.C. & Kupperts M. (1999) Simulation of photosynthetic plasticity in response to highly fluctuating light: an empirical model integrating dynamic photosynthetic induction and capacity. *Trees – Structure and Function* **14**, 145–160.
- Tinoco-Ojanguren C. & Pearcy R.W. (1993) Stomatal dynamics and its importance to carbon gain in two rainforest Piper species. I: VPD effects on the transient stomatal response to lightflecks. *Oecologia* **94**, 388–394.
- Toni T., Welch D., Strelkowa N., Ipsen A. & Stumpf M.P.H. (2009) Approximate Bayesian Computation scheme for parameter inference and model selection in dynamical systems. *Journal of the Royal Society Interface* **6**, 187–202.
- Tuzet A., Perrier A. & Leuning R. (2003) A coupled model of stomatal conductance, photosynthesis and transpiration. *Plant, Cell & Environment* **26**, 1097–1116.
- Tyerman S.D., Bohnert H.J., Maurel C., Steudle E. & Smith J.A.C. (1999) Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. *Journal of Experimental Botany* **50**, 1055–1071.
- Van Wijk M.T., Dekker S.C., Bouten W., Bosveld F.C., Kohsiek W., Kramer K. & Mohren G.M.J. (2000) Modelling daily gas exchange of a Douglas-fir forest: comparison of three stomatal conductance models with and without a soil water stress function. *Tree Physiology* **20**, 115–122.
- Vico G., Manzoni S., Palmroth S. & Katul G. (2011) Effects of stomatal delays on the economics of leaf gas exchange under intermittent light regimes. *New Phytologist* **192**, 640–652.
- Wang Q.J. (1997) Using genetic algorithms to optimise model parameters. *Environmental Modelling & Software* **12**, 27–34.
- Way D.A. & Pearcy R.W. (2012) Sunflecks in trees and forests: from photosynthetic physiology to global change biology. *Tree Physiology* **32**, 1066–1081.
- Whitehead D. (1998) Regulation of stomatal conductance and transpiration in forest canopies. *Tree Physiology* **18**, 633–644.
- Whitehead D. & Teskey R. (1995) Dynamic-response of stomata to changing irradiance in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Tree Physiology* **15**, 245–251.
- Winsor C.P. (1932) The Gompertz curve as a growth curve. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **18**, 1–8.
- Zeiger E., Talbott L.D., Frechilla S., Srivastava A. & Zhu J.X. (2002) The guard cell chloroplast: a perspective for the twenty-first century. *New Phytologist* **153**, 415–424.
- Zhang J., Fins L. & Marshall J. (1994) Stable carbon-isotope discrimination, photosynthetic gas-exchange, and growth differences among western larch families. *Tree Physiology* **14**, 531–539.

Received 27 November 2012; received in revised form 20 February 2013; accepted for publication 20 February 2013

APPENDIX

The variation of the original Gompertz curve was constrained between $[0; G]$ (Fig. A1, curve 1). However, g_s varied between $g_{\min}$ and G , with $g_{\min} > 0$. The parameter r_0 was introduced into the model to allow variation of g_s to start from values different from 0. An indirect result was an apparent change of the initial time lag for initial values above 0 as presented in Fig. A1 between curve 2 and 3. The parameter r_0 did not modify directly the initial time lag but modified this effect. The initial time lag is more difficult to adjust because its weight in the whole curve is not very important; this is the case particularly during continuous diurnal variations. Nevertheless, the parameter r_0 is important in order to produce unbiased estimates of k and G .

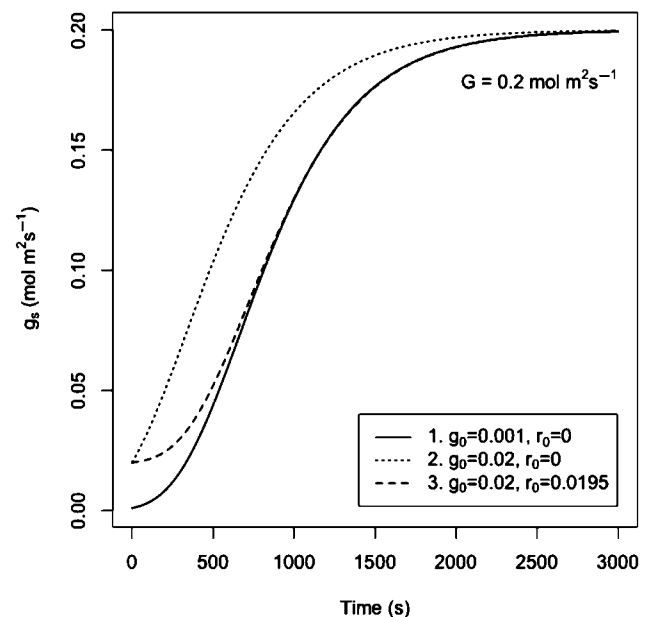


Figure A1. Effect of r_0 on temporal response of g_s , other parameters being kept constant ($k = 0.0025 \text{ s}^{-1}$, $G = 0.2 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Curves 1 and 2 were obtained with a different initial value of g_0 with stable r_0 . The result was a different time lag. Curve 3 shows that the variation of g_s started at r_0 and displays an initial time lag contrary to curve 2.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Figure S1. Example of a response curve of stomatal conductance (g_s) to irradiance ($PPFD$). Such curves were used for the validation procedure with *Quercus robur*. (Right axis: g_s , left axis: irradiance).

Figure S2. Example for one individual from *Quercus canariensis* of sample history and posterior density for

parameters: (a–b) k (s^{-1}), (c–d) r_0 ($\text{mol m}^{-2} s^{-1}$), (e–f) $g_{\min}$ ($\text{mol m}^{-2} s^{-1}$), (g–h) $g_{\max}$ ($\text{mol m}^{-2} s^{-1}$), (i–j) α_G ($\text{mol } \mu\text{mol}^{-1}$). Each chain contains 40 000 iterations a burn in period of 5000 iterations was removed and the chain was thinned by three.

Figure S3. Example for one individual from *Quercus canariensis* of autocorrelation for parameters: (a) k , (b) r_0 , (c) $g_{\min}$, (d) $g_{\max}$, (e) α_G . Each chain contains 40 000 iterations a burn in period of 5000 iterations was removed and the chain was thinned by three.

Annexe 3

Dynamics of stomatal responses to red light, blue light and CO₂ are not linked with stomatal size in oaks.

Short title: Dynamic of stomatal response to light and CO₂

Authors: Silvère Vialet-Chabrand^{1,2}, Erwin Dreyer^{1,2}, Didier Le Thiec^{1,2}, Oliver Brendel^{1,2,3}

Addresses:

¹ INRA, UMR1137 “Ecologie et Ecophysiologie Forestières”, F-54280 CHAMPENOUX, France

² Université de Lorraine, UMR1137 “Ecologie et Ecophysiologie Forestières”, Faculté des Sciences, F-54500 VANDOEUVRE-LES-NANCY, France

³ Corresponding author

Emails:

svialet@nancy.inra.fr, dreyer@nancy.inra.fr, lethiec@nancy.inra.fr, brendel@nancy.inra.fr

Additional keywords:

Kinetics, model, light spectrum, CO₂.

Abstract:

There is more and more evidence in the literature that the temporal response of stomata to changes in microclimate plays an important role in the carbon - water balance at leaf level. In order to provide new evidence on this question, a recently developed dynamic model was adjusted to changes of g_s observed during sequential variations of light (red; red+blue) and low/high CO₂, in two temperate and two Mediterranean oak species. Our objectives were to test the sensitivity of g_s responses to specific microclimate variations and to relate parameters describing the temporal response to the diversity detected for stomatal density and size. We detected significant differences of g_s responses to sequential variations of microclimate in all species. In each species, the parameter describing the rapidity of temporal responses displayed significant differences between each tested microclimate. The steady state stomatal conductance reached for each measured leaf was positively correlated with stomatal density. However, the large variability detected among individuals for the rapidity of the temporal response was not correlated to stomatal density and size. This suggests that for the here observed oak species, the stomatal size has no impact on the rapidity of their responses to light and CO₂.

Introduction

The slow temporal responses of stomatal conductance (g_s) to changes in microclimate (irradiance, VPD, CO₂, etc.) have a significant impact on the control of water use efficiency during the day (Way and Pearcy, 2012; Vialet-Chabrand *et al.*, 2013). A large diversity has been shown in the temporal responses of g_s among species, but little remains known about the physiological processes inducing this diversity (Ooba and Takahashi, 2003; Vico *et al.*, 2011). It may be due to differences of sensitivity to microclimate. In particular, two independent pathways of activation of stomatal opening by light were identified; one is specific to blue light, and the other one depends on photosynthetic activity (Lawson, 2009; Mott, 2009). Thus, the temporal responses of g_s and the steady state levels reached may differ depending on the pathway activated and on the sensitivity of the receptors to the signal. Moreover, this sensitivity could be different between an increase and a decrease of g_s as suggested by the asymmetry observed for time constants (Ooba and Takahashi, 2003; Vico *et al.*, 2011).

The proportion of blue to red light varies widely during the day and among days with a higher proportion of blue light during twilight (Hughes *et al.*, 1984). In the early morning, blue light is perceived by receptors (phototropin: phot1, phot2 or zeaxanthin), which induces stomatal opening. This has as consequence a rapid decrease of the limitation of net CO₂ assimilation (A) by g_s (Talbot *et al.*, 2006; Shimazaki *et al.*, 2007). Moreover, the blue light response of g_s is enhanced in the presence of red light and is brought about by guard cell chloroplast activity (Shimazaki *et al.*, 2007). This increase of g_s under blue light can result in a variation of intrinsic water use efficiency ($W_i = A/g_s$). Indeed, a small contribution of blue light (ex: 5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) can lead to a large increase of g_s compared to the energy brought to the photosynthesis (Shimazaki *et al.*, 2007). A strong correlation was detected between A and g_s under a variety of different light intensities, nutrient and CO₂ concentrations (Radin *et al.*, 1988; Hetherington and Woodward, 2003). It has been suggested that this correlation is driven by the variations of CO₂ concentration inside the leaf (Roelfsema *et al.*, 2002, 2006). However, the

question of whether the CO₂ signal is sensed directly by guard cells (Roelfsema *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008) or by mesophyll cells (Hedrich and Marten, 1993; Mott *et al.*, 2008) is still a matter of active debate. Recently, Fujita *et al.* (2013) and Mott *et al.* (2008) suggested an important role of the mesophyll in the response of g_s to CO₂. Indeed, these studies indicated that both stomatal opening and closure are strongly regulated by signals from the mesophyll. Moreover, stomatal opening depended on photosynthesis under low CO₂ whereas stomatal closure did not depend on photosynthesis under high CO₂, which could result in different temporal response of g_s . Nevertheless, Hu *et al.* (2010) have identified plant mutants that robustly affect CO₂ control of stomatal movements by disrupting carbonic anhydrases localized in the plasma membrane of guard cells. Their results showed an impact on temporal response of g_s and on W_i after a change of CO₂ concentration that was independent of the blue light response of g_s . Kim *et al.* (2010) suggested that both cell types (guard cells and mesophyll) contribute to this stomatal CO₂ response. Thus, the variability of temporal responses of g_s could be tested for a set of variations of microclimate activating specific signalling pathways.

The maximal g_s that can be reached for a given leaf depends on stomatal size (S) and density (D), which also constrained the steady state g_s reached under controlled conditions (Franks and Farquhar, 2001). Higher maximal g_s are usually associated with smaller S and higher D , keeping in mind that S is often negatively correlated with D (Hetherington and Woodward, 2003). Such a relationship also applies within a single species across environmental gradients (Franks *et al.*, 2009), within clones from one full-sib family (Roussel *et al.*, 2009) and also across six tree species of different genera (Aasamaa *et al.*, 2001). The temporal responses of g_s may be related to the biochemical processes involved in stomatal movements (Franks and Farquhar, 2007), which could depend on stomatal size.

The method used to assess the time constants describing the temporal response of g_s is critical. Vialet-Chabrand *et al.* (2013) pointed out that mechanistic models describing the biochemical processes involved in stomatal movements, such as Kirschbaum *et al.* (1988), were

over parameterized to predict g_s . Thus, alternative methods can be found in the literature to estimate time constants. The most basic method is a linear interpolation, where the time constant is estimated by dividing the increase in g_s by the time needed for this increase (Dumont *et al.*, 2013; Paoletti and Grulke, 2010; Tinoco-Ojanguren and Pearcy, 1993). An exponential model already provides a shape closer to the observed temporal response (Whitehead and Teskey, 1995; Vico *et al.*, 2011). However, it does not include the time lag observed after an instant change of irradiance (Tinoco-Ojanguren and Pearcy, 1993; Naumburg and Ellsworth, 2000; Violet-Chabrand *et al.*, 2013). The alternative is to use a sigmoidal model including a time lag λ (Naumburg and Ellsworth, 2000; Drake *et al.*, 2013; Violet-Chabrand *et al.*, 2013). Nevertheless, the time constants estimated need to be assessed independently from the level of g_s reached after a change of microclimate. Indeed, the maximal slope observed during the temporal responses of g_s and the time needed to reach a steady state level of g_s depend on the magnitude of variation of g_s after a change of microclimate. Thus, already in 1988, Kirschbaum have separated the temporal response of g_s from the maximal conductance to avoid this bias. Violet-Chabrand *et al.* (2013) provided a model with a time constant defined mathematically by the ratio between the maximal slope of g_s response and the magnitude of variation of g_s . This time constant has been related to parameters describing the biological processes involved in stomatal movements and allows testing the relationship between rapidity of stomatal movements and stomatal size independently from the relationship between steady state g_s and leaf anatomy.

Using dynamic modelling of g_s under different lights and CO₂ levels, we can test the sensitivity of g_s response and the relationship between temporal responses of g_s and leaf anatomy. The following hypotheses were tested: (i) parameters describing the temporal responses of g_s depend on species and the pathway activated for stomatal movements; (ii) these parameters are correlated with stomatal density and stomatal size; (iii) the diversity of responses of g_s impacts the intrinsic water use efficiency (W_i).

Materials and methods

Plant material

Four oak species were selected for their diversity of temporal responses of g_s (Viale-Chabrand *et al.* 2013): *Quercus robur* L., *Q. afares* Pomel, *Q. suber* L. and *Q. petraea* Matt. Liebl. All experiments were done with one-year-old seedlings grown in 10L pots, with a 1:1 v/v peat-sand mixture, well irrigated and well fertilized (35g Nutricote, Fertil, Type T100, 13.13.13.2+Olig.). Plants were grown in a greenhouse and transferred into the laboratory for gas exchange measurements. All plants were maintained under darkness at least for 10 hours before measurements. Whole plants were illuminated with a white LED panel (Photon Systems Instruments, Brno, Czech Republic). Leaf gas exchange was recorded with a LI-COR 6400 photosynthesis chamber (Li-Cor, Lincoln, Nebraska, US) under controlled conditions. Light in the chamber was provided by a red-blue light source. Vapour pressure deficit from leaf tissues to air (VPD_l) was controlled with a dew point generator (0.74 ± 0.08 kPa), leaf temperature was regulated to 25.1°C ($SD \pm 0.19^\circ\text{C}$) and the CO_2 reference mole fraction was set at $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$.

Measurement sequence

After darkness, the whole plant was submitted to an instant increase of irradiance of $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of white light while the leaf inside the gas exchange chamber was submitted to $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of red light. Then, after stabilisation of g_s , $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of blue light were added to the red light in the leaf chamber until a new steady state level of g_s was reached. This step was followed, while maintaining the red and blue light levels, by a reduction of the CO_2 mole fraction in the chamber to $100 \mu\text{mol mol}^{-1}$ until steady state and thereafter by an increase to $800 \mu\text{mol mol}^{-1}$ CO_2 (Fig. 1). The time needed to reach $100 \mu\text{mol mol}^{-1}$ of CO_2 in the photosynthesis chamber was around 30s and around 1min to reach $800 \mu\text{mol mol}^{-1}$ of CO_2 . This sequence was repeated on four species: *Q. robur* (5 seedlings x 4 leaves), *Q. petraea* (3 x 4), *Q. afares* (3 x 4), *Q. suber* (4 x 4).

Dynamic model of g_s

The dynamic model was based on the model proposed by Vialet-Chabrand *et al.* (2013). The analytical version presented here may be used to describe temporal response of g_s only to instant changes of microclimate:

$$g_s = (G - r_0) \cdot \exp\left(-\exp\left(\frac{1}{k} \cdot (\lambda - t) + 1\right)\right) + r_0 \quad (1)$$

with G the steady state targets of g_s after an instant change of microclimate, k the time constant, λ the time lag, r_0 the starting value of the asymmetric sigmoid and t the time, starting at 0 when the change occurs.

This model was adjusted using Bayesian inference with the LaplacesDemon R package. Two chains were used to determine the covariance matrix with the adaptive algorithm: Robust Adaptive Metropolis (RAM) with default parameters except a periodicity of 5. Each chain was run for 300000 iterations and the resulting covariance matrix was used to run a non-adaptive algorithm: Random Walk Metropolis (RWM). This algorithm was used to sample from the posterior distribution with two chains of 300000 iterations thinned to keep a representative sample of 2000 parameter sets. The convergence of the chains was verified with the consort function provided in the package. To assess the accuracy of predicted g_s , we used the root mean squared error (rmse), which characterized the mean error between observed and predicted values.

Statistical analysis

The statistical analysis was made with linear mixed effects models using the package nlme within R software. Models considered species or conditions as fixed effects and individuals as a random effect. All statistical results were considered significant based on a p-value < 0.05.

Leaf anatomy

For each measured leaf, 3 discs (1 cm²) were punched for measuring stomatal density and stomatal size. They were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Microphotographs were made with a variable pressure scanning electron microscope (model 1450VP, Leo, Cambridge, UK, 20–60 Pa inside chamber, accelerating voltage 15 kV, working distance 13 mm) and analysed for stomatal density and stomatal dimensions. One microphotograph at 300x of the abaxial epidermis (0.503 mm²) of 3 discs from each leaf was used to estimate stomatal density (SD), using the convention of excluding stomata overlapping the margins of the image, and was converted to the number of stomata per mm². On each disc, microphotographs at 1000x were used to sample stomata for measuring stomatal size (length x width of 30 stomata) by fitting an ellipse.

Results

The use of the dynamic model of Vialet-Chabrand *et al.* (2013) to adjust the temporal response of g_s in response to the specific variations of microclimate tested in this study resulted in very small rmse (Fig. 1 and Table 1). After a variation of microclimate, g_s increased significantly in all species in response to an instant increase of red light, blue light and an instant decrease of CO₂ concentration, and decreased in response to an instant increase of CO₂ (Fig. 2). All species displayed the same increase of g_s in response to red light without any significant difference (Fig. 2A). In response to blue light, *Q. petraea* displayed a significantly lower increase compared to the three other species (Fig. 2B). For some leaves of *Q. petraea*, the increase of g_s was so small (below than of 0.01 mol m⁻² s⁻¹ after 15 min) that we were unable to fit the model, which resulted in the absence of parameter estimation in these cases (Table 1). In response to a transition to low CO₂, *Q. afares* and *Q. suber* displayed a significantly larger increase of g_s than *Q. robur* and *Q. petraea* (Fig. 2C). In response to a transition to high CO₂, the decrease of g_s was similar among species (Fig. 2D).

In response to red light, *Q. suber* displayed a significantly lower k under red light compared to *Q. robur* and *Q. petraea*. In response to other variations of microclimate, we did not detect any significant differences among species. The time constants k observed for *Q. robur* were significantly higher in response to red light than in response to red plus blue light (Fig. 3). All leaves from different individuals displayed a significant decrease of k in response to red plus blue light. After a transition to low CO₂ in the air, k was different from those in response to red light and high CO₂ in the air but was not different from thus in response to red plus blue light. *Q. petraea* displays the same pattern of variation of k than *Q. robur*, however, in response to red plus blue light, parameters could not be estimated for some leaves and the resulting k could be underestimated. *Q. afares* did not display significant differences for k among the different tested conditions. *Q. suber* displayed higher k values in response to red light and low CO₂ in the air than in response to red plus blue light and high CO₂ in the air with significant differences between response to red and red plus blue lights. Globally, k was highest in response to red light, lowest in response to high CO₂ in air and not different in response to blue light and low CO₂ in the air. The parameter λ was significantly different from 0 in all species except for *Q. petraea* (Fig. 4). In all species, λ displayed the highest value in response to high CO₂ in the air. *Q. suber* displayed significant differences for λ in response to low and high CO₂ in the air. In response to red light, r_0 displayed values close to zero and displayed significantly higher values in response to other variations of microclimate in all species. After each instant change of microclimate except in response to red light, r_0 was significantly correlated with G_s (e.g. in response to red plus blue light among all leaves of all species, $R^2=0.96$; $G_s = 1.0752 \cdot r_0 + 0.0302$), which signifies that the ranking of g_s values was relatively conserved in response to a change of microclimate.

The variability of parameters describing the temporal response of g_s for each leaf allowed relating them to stomatal densities (D) and sizes. *Q. robur* and *Q. petraea* displayed significant differences for D compared to *Q. suber* and *Q. afares*. Steady state g_s (G_s) reached under low CO₂ conditions, representing the maximum g_s in this experimental set-up, were significantly and positively correlated with D (Fig. 6). Stomatal size was significantly and negatively correlated

with D ($R^2=0.39$, $D = -2.28 \cdot Surf + 1137.369$), thus leaves with a higher density had smaller stomata. The result was a significant negative correlation between G_s measured under low CO_2 concentration and stomatal surface ($R^2=0.23$, $G_s = -0.00147 \cdot Surf + 0.641$). The maximal slope of the temporal response of g_s (SI) was significantly correlated with G_s under red light and D (Fig. 7A-C). On the contrary, the time constants k were not correlated with G_s and moreover, they were not with D (Fig. 7B-D). After a transition to high CO_2 in the air, SI was significantly and negatively correlated with D ($R^2=0.15$; $SI = -5.634 \cdot 10^{-7} \cdot D - 2.466 \cdot 10^{-5}$) whereas k was not correlated with D . In all tested conditions, k was not correlated with stomatal size (data not shown).

In response to red as well as red plus blue light, the increase in net CO_2 assimilation (A) was not significantly different among species (Fig. 8). Considering the observed differences in increase of g_s in response to red plus blue light (Fig. 2B), this resulted in a decrease in intrinsic water use efficiency (W_i) significantly different among species (Fig. 9). Thus, *Q. robur* displayed a significantly higher decrease of W_i after adding blue light than *Q. petraea*. On the contrary to other species, the decrease of W_i in *Q. petraea* was not significantly different from zero. In response to red plus blue light, *Q. afares* and *Q. petraea* displayed significant differences for C_i/C_a and the species mean values displayed a large range from 0.55 to 0.7 (data not shown).

Discussion

The dynamic model accurately described the temporal response of g_s in all species and conditions. The only exception was for some leaves of *Q. petraea* that displayed a low response of g_s after adding blue light that did not allow estimating parameters. Overall, the shape of the temporal response of g_s described by the dynamic model was similar among the different environments. In these conditions, parameter differences in each tested environment were mainly due to intra and inter specific diversity.

Using the dynamic model and specific variations of light and CO₂ concentrations, we were able to detect differences for parameters describing the temporal response of g_s . In response to red plus blue light, *Q. robur* has a significantly higher increase of g_s than *Q. petraea* and after a transition to low CO₂ in the air, *Q. afares* and *Q. suber* have a significantly higher increase of g_s than *Q. robur* and *Q. petraea*. These results were consistent with the hypothesis that species have different sensitivity to environmental variations, which result in different responses of g_s .

For k , we detected a large intra-specific variability, however differences among individuals were maintained for all conditions, which resulted in significant differences in k between tested conditions. In response to red plus blue light, k was significantly lower than in response to red light in all species except *Q. afares*, which did not show any variations of k . This implies that in some species, k could be sensitive to the light spectrum as suggested by Kirschbaum *et al.* (1988). Nevertheless, this affirmation was nuanced for *Q. petraea* because k could be underestimated due to the absence of estimations for some individuals with low response of g_s to blue light. In each species, no differences were detected for k in response to red plus blue light and in response to low CO₂ in the air whereas there were differences for k after adding blue light for some species. This was surprising because red light and low CO₂ in the air should activate the same pathway for stomatal opening (Fujita *et al.*, 2013). The different k in response to red light and low CO₂ in the air could be explained by the presence of blue light after transition to low CO₂ in air that reduced the limitation of stomatal movements. After a transition to high CO₂ in the air,

g_s displayed a strong decrease and k displayed lower values than during increase of g_s as previously observed by Barillot *et al.* (2010), which was consistent with asymmetric time constants for stomatal movements (Ooba and Takahashi, 2003). The observed variations of k in response to different light spectra and CO_2 in the air suggest that under natural conditions, the dynamic response of g_s should be variable depending on the current microclimate and the characteristics of the individual. The delay between the change in microclimate and the response of g_s was described by λ , which was significantly different from zero in all species except for *Q. petraea*. After a transition to high CO_2 in the air, λ has values than under the other conditions in all species except for *Q. petraea*, which suggests an asymmetry of λ , similar to the one already observed for k . During sunflecks, the variation of microclimate should last longer than λ a significant effect on g_s (Naumburg and Ellsworth, 2000; Way and Pearcy, 2012).

Similarly to Drake *et al.* (2013), we observed a significant correlation between maximal slope of temporal response of g_s (SI) and stomatal size. Based on this observation, they concluded to a relationship between rapidity of stomatal movements and stomatal size. However, our results lead to a different interpretation by using k , which is independent of the steady state reached (G_s), as an estimator of rapidity of stomata. Indeed, we observed that SI results from the interaction of the speed of response of g_s and G_s . Based on the correlation between stomatal density and stomatal size, we conclude that the correlation between SI and stomatal size was indirectly due to a correlation between G_s and stomatal density. This was not the case for k that was neither correlated with stomatal density nor with stomatal size. This suggests that the rapidity of stomatal movements was not linked with stomatal size in the tested saplings.

In our experiments, k and G_s were modified by adding blue light to red light, which results in a diversity of temporal responses of g_s . These different temporal responses of g_s lead to a decrease in intrinsic water use efficiency (W_i) in all species with a significantly stronger decrease of W_i in *Q. robur* compared to *Q. petraea*. Karlsson and Assmann (1991) already

observed a decrease of W_i after adding blue light, under low and high VPD. Zeiger *et al.* (2002) suggested that in early morning when the proportion of blue light is larger, blue light allowed a more rapid decrease of limitation of A by g_s , which was in agreement with the lower k in response to red plus blue light than in response to red light. The blue light response saturates at low light fluxes (Shimazaki *et al.*, 2007) and during the day, most of the stomatal response to white light is caused by the red light effect (Zeiger and Field, 1982). Nevertheless, as k decreased in response to blue light, further experiments should be made on the blue light dose effect. During sunflecks, λ limits rapid variations of A by delaying the stomatal movements, which reduces the potential carbon gain depending on sunfleck duration and distribution during a day (Naumburg and Ellsworth, 2000; Way and Pearcy, 2012). After a transition to low CO₂ in the air, *Q. afares* and *Q. suber* showed a stronger increase of g_s than *Q. robur* and *Q. petraea*. Fujita *et al.* (2013) hypothesized that the variations of light and CO₂ in the air resulted in variations of CO₂ in the leaf that impact g_s . Our experiment displayed large inter-specific differences for increase of G_s after a transition to low CO₂ in the air and therefore in the leaf, which suggested that the differences of g_s among species were the result of different sensitivity to CO₂ inside the leaf. Differences in W_i among species in our experiment were mainly due to g_s and differences in g_s were due to differences in sensitivity to a variation of environment.

Using a new approach uncoupling the time constant (k) and the g_s reached in steady state (G_s), we conclude that in oaks, temporal response of g_s is influenced by microclimate and that the rapidity of stomatal movements is not linked to their size. The observed variations of W_i were mainly due to g_s and could be explained by differences in the magnitude of response of g_s to environmental variations controlling different pathways of activation of stomatal aperture. This approach allows targeting the sources of the variability of W_i which then can be explored by other approaches such as molecular biology.

312 **Acknowledgements**

313 Silvère Vialet-Chabrand was supported by a doctoral grant from Université de Lorraine
314 (France).

315

316 Bibliography

- 317 **Aasamaa K, Söber A, Rahi M.** 2001. Leaf anatomical characteristics associated with shoot
318 hydraulic conductance, stomatal conductance and stomatal sensitivity to changes of leaf water
319 status in temperate deciduous trees. *Functional Plant Biology* **28**, 765.
- 320 **Barillot R, Frak E, Combes D, Durand J, Escobar-Gutiérrez AJ.** 2010. What determines the
321 complex kinetics of stomatal conductance under blueless PAR in *Festuca arundinacea*?
322 Subsequent effects on leaf transpiration. *Journal of Experimental Botany* **61**, 2795–806.
- 323 **Drake PL, Froend RH, Franks PJ.** 2013. Smaller, faster stomata: scaling of stomatal size, rate of
324 response, and stomatal conductance. *Journal of Experimental Botany* **64**, 495–505.
- 325 **Dumont J, Spicher F, Montpied P, Dizengremel P, Jolivet Y, Le Thiec D.** 2013. Effects of ozone
326 on stomatal responses to environmental parameters (blue light, red light, CO₂ and vapour
327 pressure deficit) in three *Populus deltoides* × *Populus nigra* genotypes. *Environmental Pollution*
328 **173**, 85–96.
- 329 **Franks PJ, Drake PL, Beerling DJ.** 2009. Plasticity in maximum stomatal conductance
330 constrained by negative correlation between stomatal size and density: an analysis using
331 *Eucalyptus globulus*. *Plant, Cell & Environment* **32**, 1737–1748.
- 332 **Franks PJ, Farquhar GD.** 2001. The effect of exogenous abscisic acid on stomatal development,
333 stomatal mechanics, and leaf gas exchange in *Tradescantia virginiana*. *Plant Physiology* **125**,
334 935–942.
- 335 **Franks PJ, Farquhar GD.** 2007. The mechanical diversity of stomata and its significance in gas-
336 exchange control. *Plant Physiology* **143**, 78–87.
- 337 **Fujita T, Noguchi K, Terashima I.** 2013. Apoplastic mesophyll signals induce rapid stomatal
338 responses to CO₂ in *Commelina communis*. *New Phytologist* **2**.
- 339 **Hedrich R, Marten I.** 1993. Malate-induced feedback regulation of plasma membrane anion
340 channels could provide a CO₂ sensor to guard cells. *The EMBO Journal* **12**, 897.
- 341 **Hetherington AM, Woodward FI.** 2003. The role of stomata in sensing and driving
342 environmental change. *Nature* **424**, 901–8.
- 343 **Hu H, Boisson-Dernier A, Israelsson-Nordström M, Böhmer M, Xue S, Ries A, Godoski J,**
344 **Kuhn JM, Schroeder JI.** 2010. Carbonic anhydrases are upstream regulators of CO₂-controlled
345 stomatal movements in guard cells. *Nature Cell Biology* **12**, 87–93; sup pp 1–18.
- 346 **Hughes JE, Morgan DC, Lambton PA, Black CR, Smith H.** 1984. Photoperiodic time signals
347 during twilight. *Plant, Cell & Environment* **7**, 269–277.
- 348 **Karlsson PE, Assmann SM.** 1991. Rapid and specific modulation of stomatal conductance by
349 blue light in ivy (*Hedera helix*). An approach to assess the stomatal limitation of carbon
350 assimilation. *Plant Physiology* **95**, 440–447.

351 **Kim T-H, Böhmer M, Hu H, Nishimura N, Schroeder JI.** 2010. Guard cell signal transduction
352 network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annual Review of*
353 *Plant Biology* **61**, 561–91.

354 **Kirschbaum MUF, Gross LJ, Pearcy RW.** 1988. Observed and modelled stomatal responses to
355 dynamic light environments in the shade plant *Alocasia macrorrhiza*. *Plant, Cell & Environment*
356 **11**, 111–121.

357 **Lawson T.** 2009. Guard cell photosynthesis and stomatal function. *The New Phytologist* **181**,
358 13–34.

359 **Lee M, Choi Y, Burla B, Kim Y-Y, Jeon B, Maeshima M, Yoo J-Y, Martinoia E, Lee Y.** 2008. The
360 ABC transporter AtABCB14 is a malate importer and modulates stomatal response to CO₂.
361 *Nature Cell Biology* **10**, 1217–23.

362 **Mott KA.** 2009. Opinion: stomatal responses to light and CO₂ depend on the mesophyll. *Plant,*
363 *Cell & Environment* **32**, 1479–86.

364 **Mott KA, Sibbersen ED, Shope JC.** 2008. The role of the mesophyll in stomatal responses to
365 light and CO₂. *Plant, Cell & Environment* **31**, 1299–306.

366 **Naumburg E, Ellsworth DS.** 2000. Photosynthetic sunfleck utilization potential of understory
367 saplings growing under elevated CO₂ in FACE. *Oecologia* **122**, 163–174.

368 **Ooba M, Takahashi H.** 2003. Effect of asymmetric stomatal response on gas-exchange
369 dynamics. *Ecological Modelling* **164**, 65–82.

370 **Paoletti E, Grulke NE.** 2010. Ozone exposure and stomatal sluggishness in different plant
371 physiognomic classes. *Environmental Pollution* **158**, 2664–71.

372 **Radin JW, Hartung W, Kimball BA, Mauney JR.** 1988. Correlation of stomatal conductance
373 with photosynthetic capacity of cotton only in a CO₂-enriched atmosphere: mediation by abscisic
374 acid? *Plant Physiology* **88**, 1058–1062.

375 **Roelfsema MRG, Hanstein S, Felle HH, Hedrich R.** 2002. CO₂ provides an intermediate link in
376 the red light response of guard cells. *The Plant Journal* **32**, 65–75.

377 **Roelfsema MRG, Konrad KR, Marten H, Psaras GK, Hartung W, Hedrich R.** 2006. Guard cells
378 in albino leaf patches do not respond to photosynthetically active radiation, but are sensitive to
379 blue light, CO₂ and abscisic acid. *Plant, Cell & Environment* **29**, 1595–1605.

380 **Roussel M, Thiec D, Montpied P, Ningre N, Guehl J-M, Brendel O.** 2009. Diversity of water use
381 efficiency among *Quercus robur* genotypes: contribution of related leaf traits. *Annals of Forest*
382 *Science* **66**, 408–408.

383 **Shimazaki K, Doi M, Assmann SM, Kinoshita T.** 2007. Light regulation of stomatal movement.
384 *Annual Review of Plant Biology* **58**, 219–47.

385 **Talbott LD, Hammad JW, Harn LC, Nguyen VH, Patel J, Zeiger E.** 2006. Reversal by green light
386 of blue light-stimulated stomatal opening in intact, attached leaves of *Arabidopsis* operates only
387 in the potassium-dependent, morning phase of movement. *Plant & Cell Physiology* **47**, 332–9.

388 **Tinoco-Ojanguren C, Pearcy RW.** 1993. Stomatal dynamics and its importance to carbon gain
389 in two rainforest *Piper* species. *Oecologia* **94**, 395–402.

390 **Vialet-Chabrand S, Dreyer E, Brendel O.** 2013. Performance of a new dynamic model for
391 predicting diurnal time courses of stomatal conductance at the leaf level. *Plant, Cell &*
392 *Environment*.

393 **Vico G, Manzoni S, Palmroth S, Katul G.** 2011. Effects of stomatal delays on the economics of
394 leaf gas exchange under intermittent light regimes. *The New Phytologist* **192**, 640–52.

395 **Way DA, Pearcy RW.** 2012. Sunflecks in trees and forests: from photosynthetic physiology to
396 global change biology. *Tree Physiology* **32**, 1066–81.

397 **Whitehead D, Teskey RO.** 1995. Dynamic response of stomata to changing irradiance in loblolly
398 pine (*Pinus taeda* L.). *Tree Physiology* **15**, 245–251.

399 **Zeiger E, Field C.** 1982. Photocontrol of the functional coupling between photosynthesis and
400 stomatal conductance in the intact leaf: blue light and PAR-dependent photosystems in guard
401 cells. *Plant Physiology* **70**, 370–5.

402 **Zeiger E, Talbott LD, Frechilla S, Srivastava A, Zhu J.** 2002. The guard cell chloroplast: a
403 perspective for the twenty-first century. *New Phytologist* **28**, 415–424.

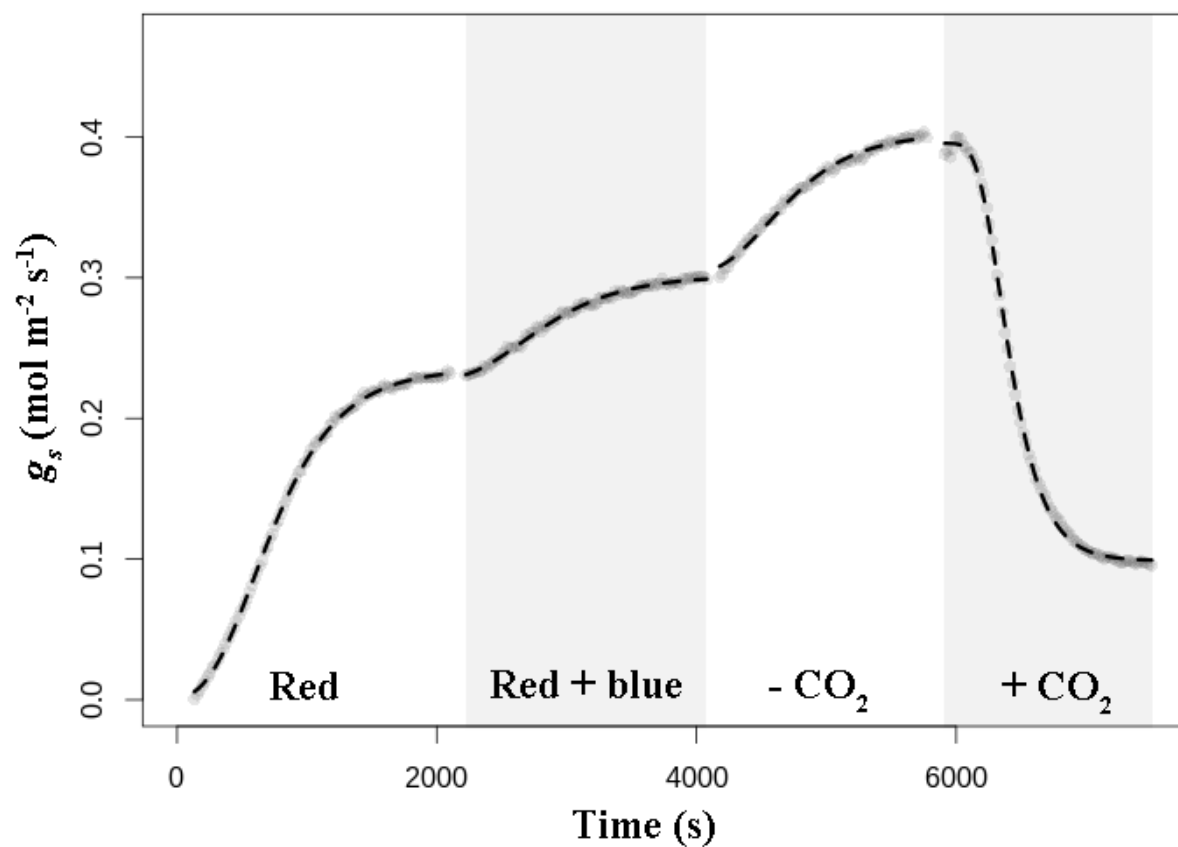
404

Tables

Table 1: Number of curves successfully adjusted for each species and microclimate over the number of measured curves. Mean root mean square error (RMSE) is represented in bold for each species and microclimate in $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ as a measure of accuracy of predicted values.

	Red	Red+Blue	Low CO ₂	High CO ₂
<i>Q. robur</i>	23/23 0.00152	22/23 0.00101	23/23 0.00152	23/23 0.00166
<i>Q. petraea</i>	12/12 0.00191	5/12 0.000691	10/12 0.00116	12/12 0.00178
<i>Q. afares</i>	15/15 0.00391	12/15 0.00154	15/15 0.00268	15/15 0.00337
<i>Q. suber</i>	17/17 0.00274	14/17 0.00104	17/17 0.00230	17/17 0.00302

411 **Figures**



412

413 Figure 1: Observed (points) and modelled (dashed lines) temporal response of g_s to successive
 414 instant changes of microclimate: red light (from 0 to 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), red and blue light
 415 (600+10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), low CO₂ in the air (100 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) and high CO₂ in the air (800 μmol
 416 mol^{-1}).

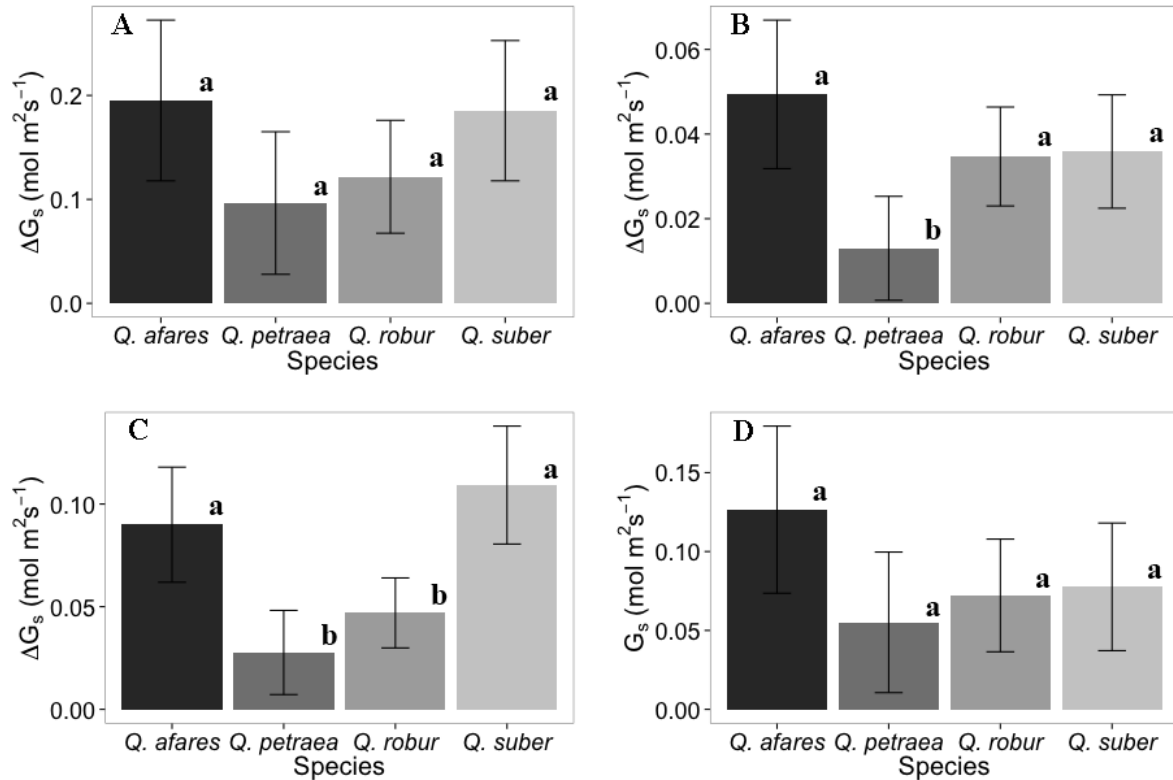


Figure 2: Response of stomatal conductance (g_s) to a change of microclimate: A/ absolute increase of g_s from its value under previous conditions to the new steady state level (ΔG_s) after instant increase of red light; B/ ΔG_s after adding blue light; C/ ΔG_s after a transition to low CO₂ in the air; D/ steady state g_s (G_s) reached after a transition to high CO₂ in the air. Error bars represent 95% confidence intervals and lower case letters represent significant differences (p < 0.05) between species.

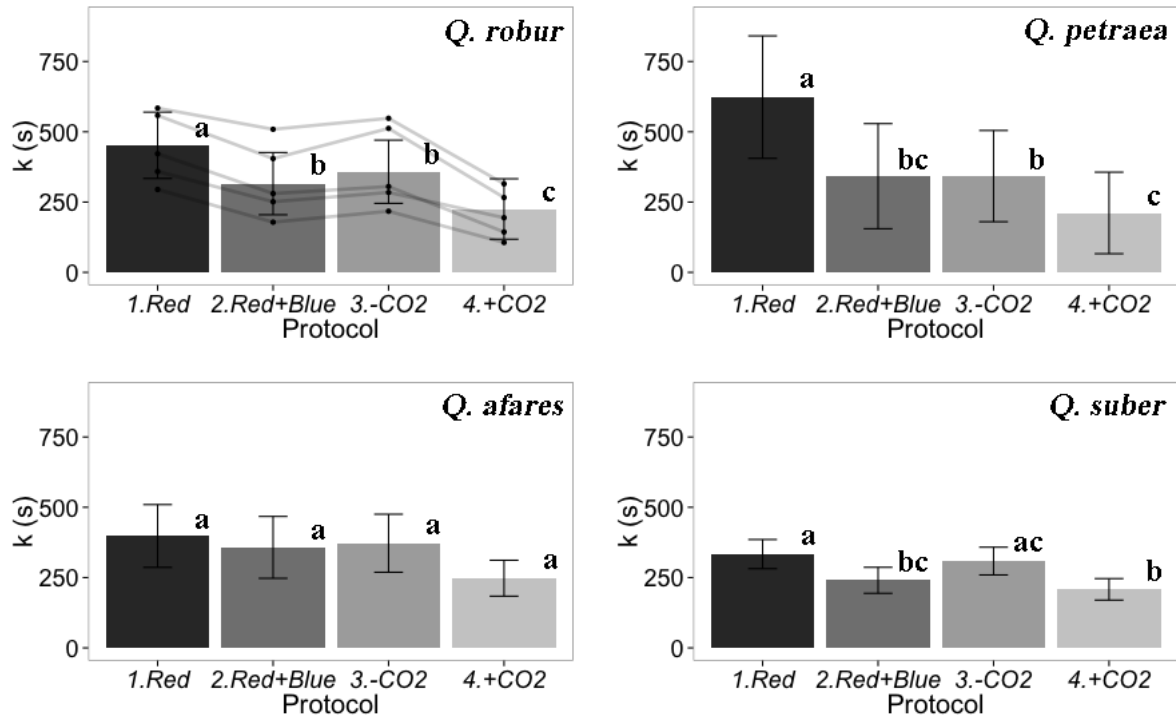


Figure 3: Time constants (k) for the temporal response of g_s after specific instant changes of microclimate. Error bars represent 95% confidence intervals. For *Q. robur*, lines and points represent individual means. Different lower case letters represent differences between conditions.

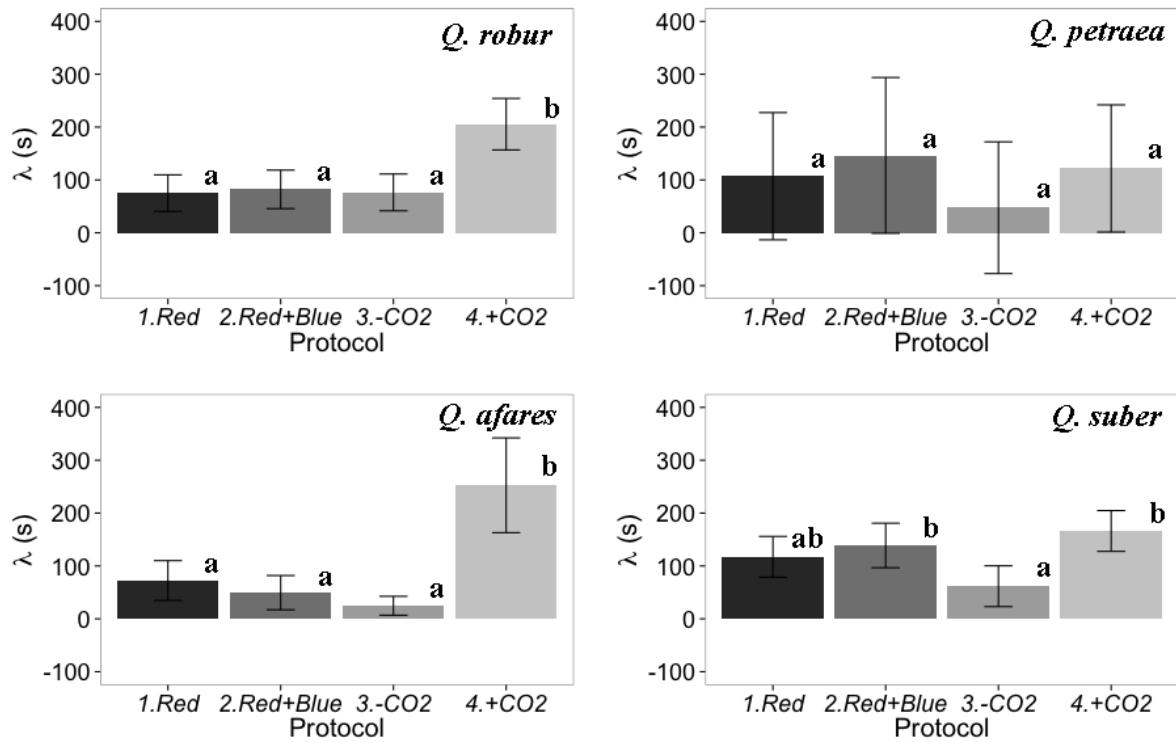


Figure 4: Time lag (λ) after specific instant changes of microclimate. Error bars represent 95% confidence intervals. Different lower case letters represent differences between conditions.

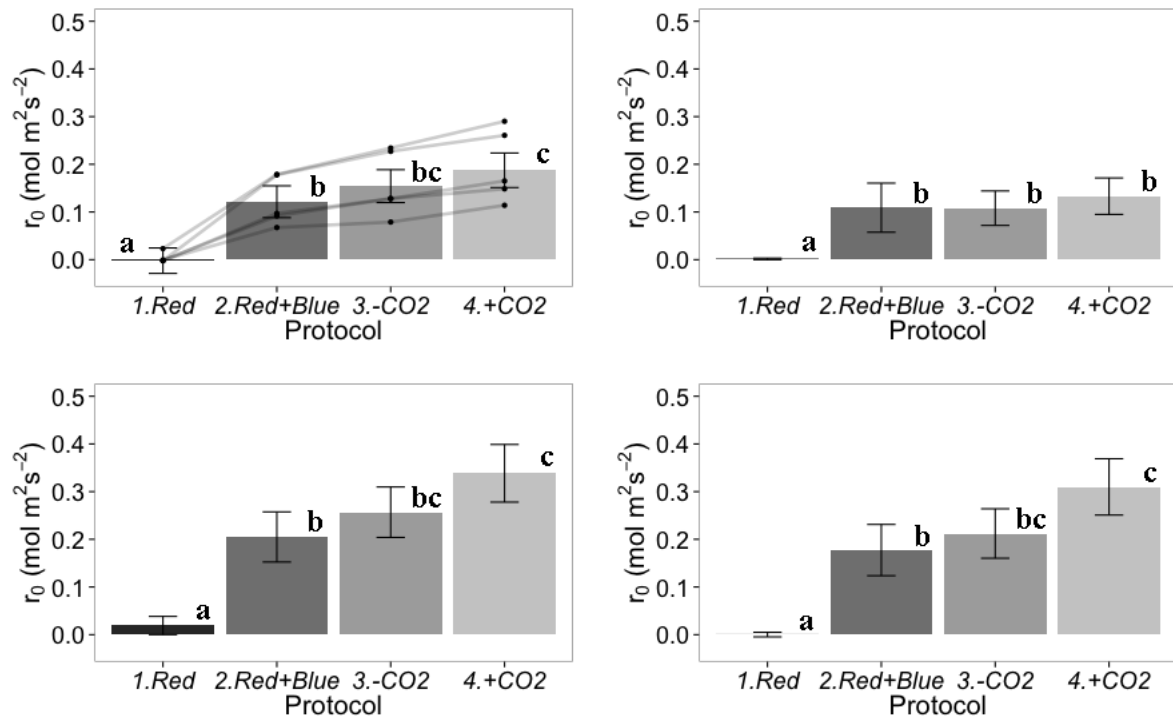


Figure 5: Starting value of sigmoid model (r_0) after specific instant changes of microclimate.

Error bars represent 95% confidence intervals. For *Q. robur*, lines and points represent individual means. Different lower case letters represent differences between conditions.

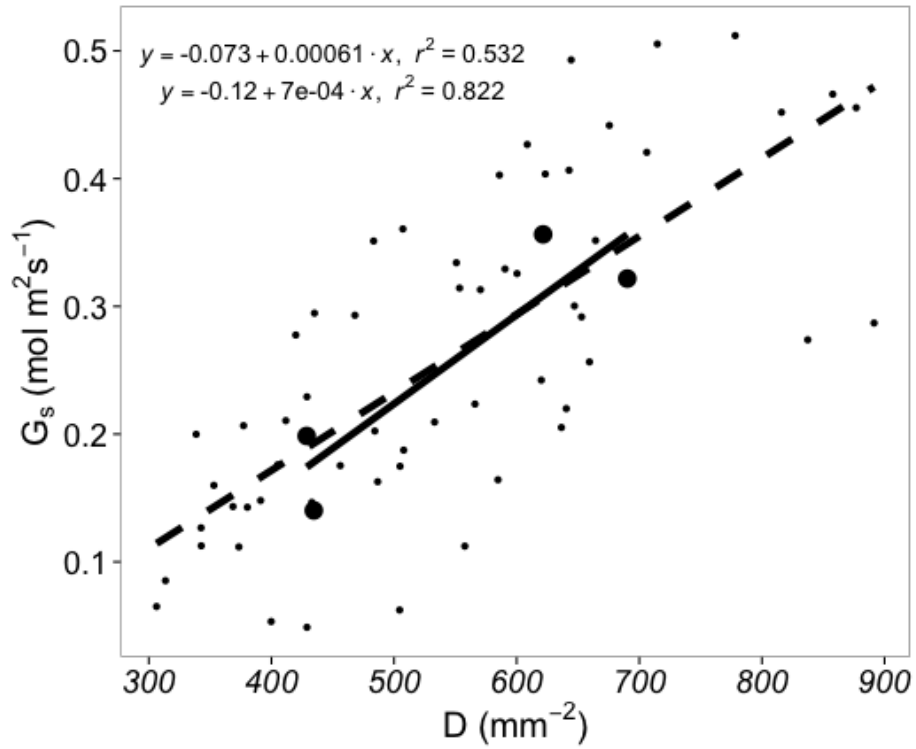


Figure 6: Correlation between steady state G_s and stomatal density (D) under low CO_2 concentration. Dots and dashed lines represent leaf level values; bold dots and continuous lines represent species level values. Lines (dashed and continuous) represent regression lines.

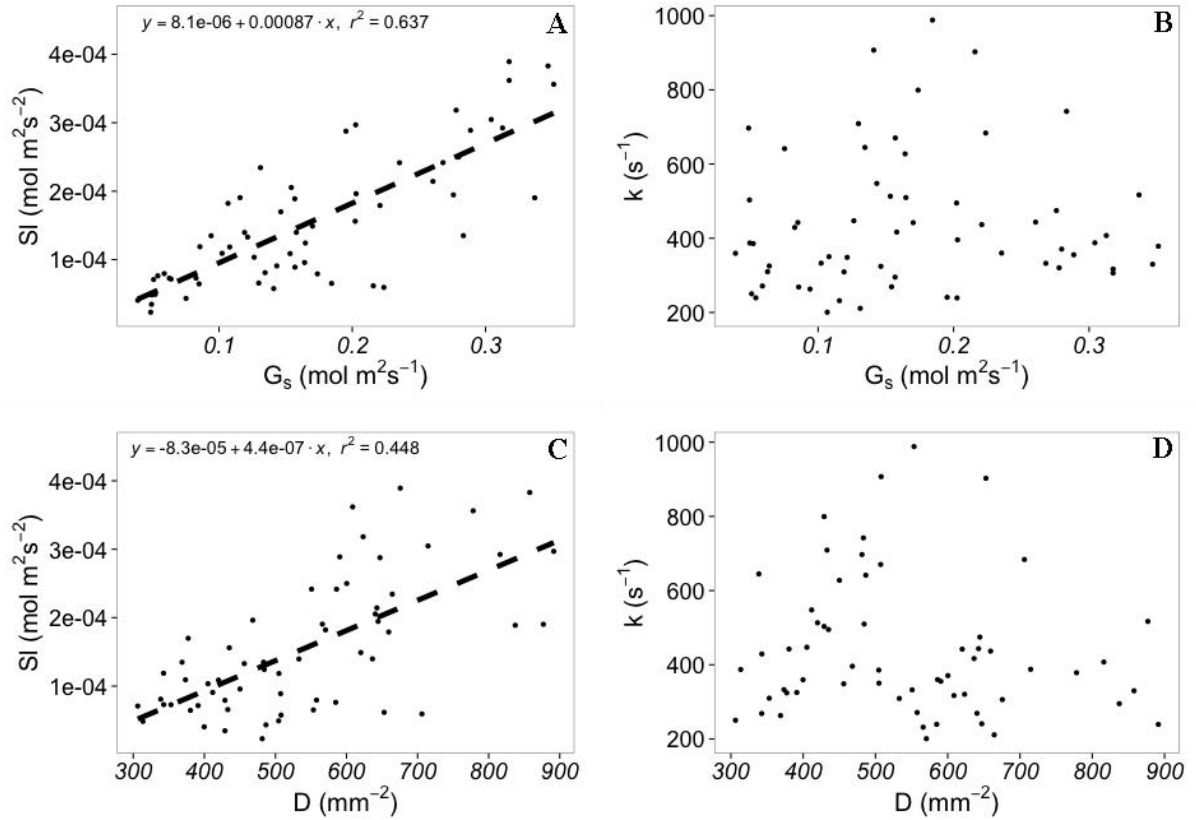


Figure 7: Relation between temporal responses of g_s under red light and stomatal density (D). **A** and **B** display maximal slope Sl and time constants k that describe temporal responses of g_s in relation with the target at steady state G_s ; **C** and **D** display same parameters in relation with D . Dashed lines represent the regression line associated with significant correlation.

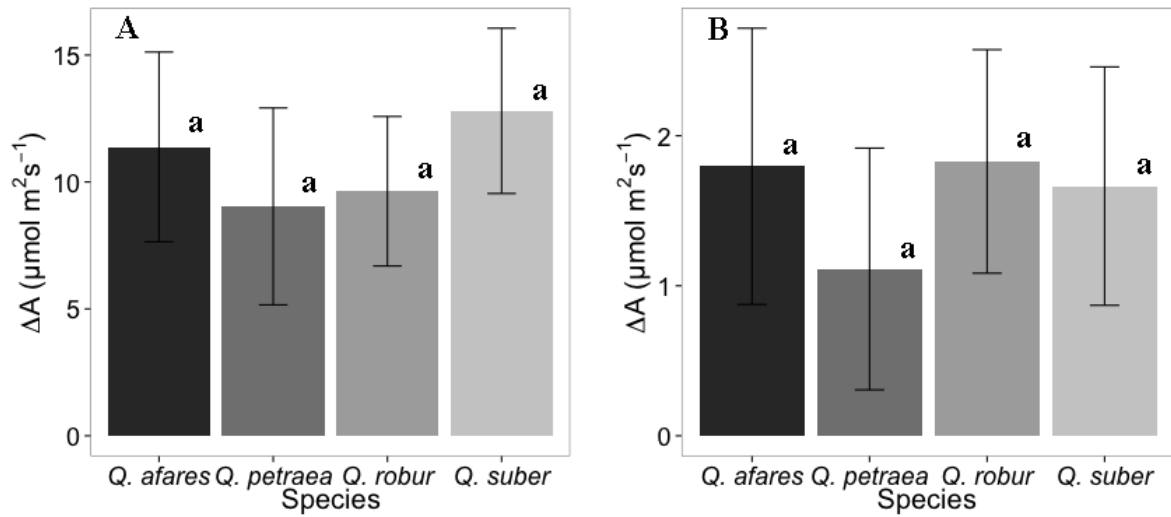


Figure 8: Response of net CO₂ assimilation (A) to an instant change of microclimate: A/ increase of A after in instant increase to 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of red light from darkness; B/ increase of A compared to the previous conditions after adding 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of blue light. Error bars represent 95% confidence intervals and lower case letters represent significant differences ($p < 0.05$) between species.

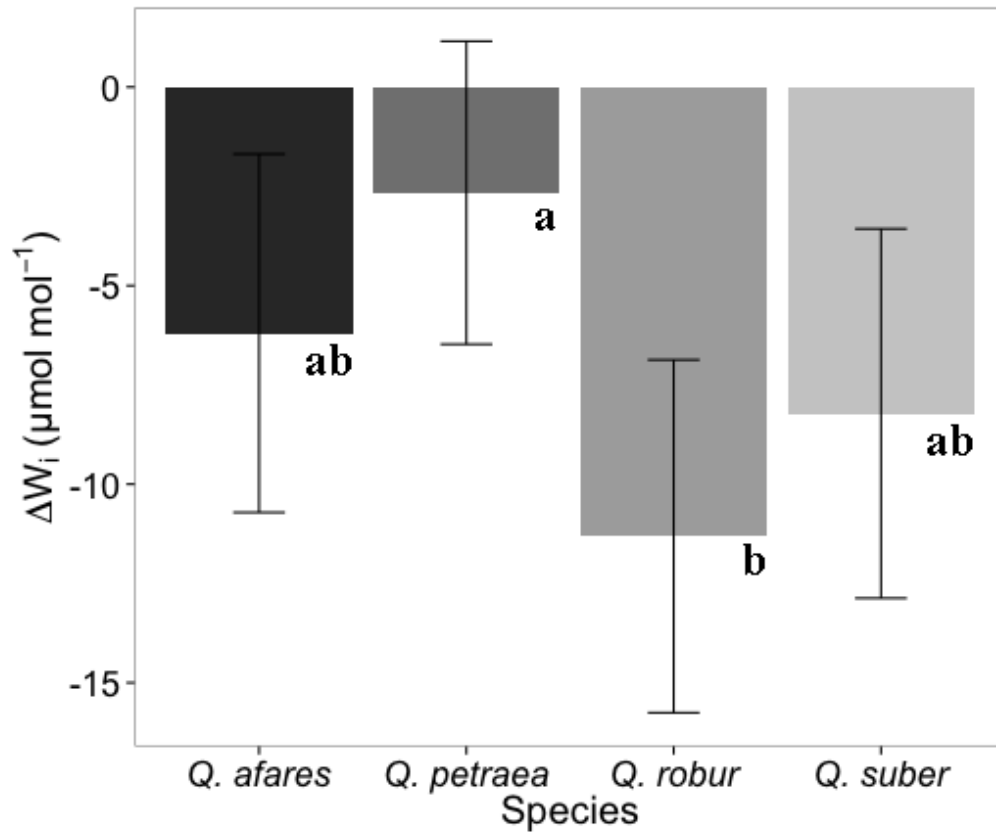


Figure 9: Variation of intrinsic water use efficiency (W_i) after adding blue light ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) to red light ($600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Error bars represent 95% confidence intervals and lower case letters represent significant differences ($p < 0.05$) between species.

Modélisation des variations journalières de la conductance stomatique: apports d'une approche dynamique et conséquences sur l'efficience intrinsèque d'utilisation de l'eau chez le chêne.

Résumé:

L'efficience intrinsèque d'utilisation de l'eau (W_i) définit comme le rapport de l'assimilation nette de CO_2 (A) sur la conductance stomatique à la vapeur d'eau (g_s) est un estimateur au niveau foliaire du compromis fait par la plante entre l'accumulation de biomasse et sa consommation en eau. De nombreuses études ont révélé une forte diversité inter et intra-spécifique de ce trait intégré dans le temps dont l'origine est encore mal connue. Les travaux réalisés sur les variations journalières de A et g_s ont jusqu'à maintenant révélé un rôle plus important de la diversité de g_s dans la diversité de W_i . Une approche de modélisation inversée a permis de décomposer les variations de g_s , observées lors de cinétiques journalières, sous la forme de paramètres décrivant les réponses stomatiques aux différentes variables microclimatiques. Comparé aux modèles décrivant les variations de g_s en régime permanent, le développement d'un nouveau modèle dynamique a permis d'ajouter une dimension temporelle essentielle décrivant la réponse temporelle des stomates aux variations microclimatiques. La diversité des réponses temporelles des stomates détectée ne semble pas dépendre de leur densité ou de leur taille. Elle présente toutefois une asymétrie entre l'ouverture et la fermeture des stomates qui participe à la diversité des variations journalières de g_s et impacte le bilan hydrique journalier au niveau du plant entier. Ainsi, on peut distinguer deux composantes aux variations journalières de W_i liées à g_s : une composante temporelle due à la lente réponse des stomates et une autre composante due aux différences de perception des variations du microclimat.

Mots clés: *conductance stomatique, réponse temporelle, modélisation inversée, chêne.*

Modelling daily variations of stomatal conductance: contributions of a dynamic approach and impact on the intrinsic water use efficiency in oak.

Abstract:

Intrinsic water use efficiency (W_i), defined as the ratio between net CO_2 assimilation rate (A) and stomatal conductance to water vapour (g_s), is a leaf level estimator of the trade-off between biomass accumulation and water loss at the plant level. A number of studies have shown a strong inter and intra-specific diversity, usually using a time integrated estimator of this trait. However, the origin of this diversity is not yet well known. Up to now, research on the daily variations of W_i have shown a stronger influence of g_s on the diversity of W_i as compared to A . An inverse modelling approach has allowed partitioning the variations of g_s observed during daily time-courses into parameters, which describe the stomatal responses to different microclimatic variables. Compared to steady-state g_s models, the development of a new dynamic model of g_s has allowed adding a necessary temporal dimension, which describes the temporal response of stomata to environmental variations. The observed diversity of these temporal stomatal responses was not related to stomatal density or size. The temporal responses of stomata were shown to be asymmetric between opening and closing, which impacts the observed diversity of g_s during daily time courses as well as whole plant water relations. Overall these results suggest two components that determine the variations of W_i related to g_s during daily time courses: one component due to the temporal response of stomata in itself, and one component which is due to differences in the sensing of microclimate variations.

Key words: *stomatal conductance, temporal response, inverse modelling, oaks.*