



Intégration de la phénologie et de la défense mécanique dans l'espace phénotypique des plantes

Jules Segrestin

► To cite this version:

Jules Segrestin. Intégration de la phénologie et de la défense mécanique dans l'espace phénotypique des plantes. Biologie végétale. Université Montpellier, 2018. Français. NNT : 2018MONTG024 . tel-01908660

HAL Id: tel-01908660

<https://theses.hal.science/tel-01908660>

Submitted on 30 Oct 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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En biologie des populations et écologie

École doctorale GAIA

Unité de recherche CEFE

Intégration de la phénologie et de la défense mécanique dans l'espace phénotypique des plantes

Présentée par Jules SEGRESTIN

Le 25 juin 2018

Sous la direction de Éric GARNIER
et Marie-Laure NAVAS

Devant le jury composé de

Sara PUIJALON, Chargée de recherche, UMR 5023 - LEHNA, Université Lyon 1

Bill SHIPLEY, Professor, Université de Sherbrooke

Francisco LLORET, Professor, CREAM

John THOMPSON, Directeur de recherche, CEFE

Rapportrice

Rapporteur

Examineur

Président du jury



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Je voudrais avant tout remercier Eric, qui a été mon directeur de tous les jours. Ton encadrement a été un savant mélange d'autonomie, d'appuis précieux sur la théorie et d'exigence sur la pratique. J'ai beaucoup apprécié ta capacité à me laisser voler des mes propres ailes tout en sachant répondre à mes interrogations et mes doutes. Tu as toujours pris le temps, au bon moment, pour m'accompagner, me conseiller et parfois me recadrer. Merci également pour ton exigence et ton ambition, parfois difficiles à gérer dans les moments de rush, mais qui rendent tes compliments sur un travail abouti tellement gratifiants ! Tu as été pour moi un grand moteur de progression.

Merci à Marie-Laure, qui me suit depuis mes débuts en écologie. Tu m'as toujours guidé dans mon parcours supérieur et c'est en partie grâce à toi que j'ai choisi de faire une thèse. Je te remercie pour ton aide dans la conception et le suivi du projet. Tu as su me donner un avis extérieur pertinent tout au long de la thèse. Merci pour ton pragmatisme et ton honnêteté qui font toujours avancer le travail.

Je tiens également à remercier Elena, sans qui je n'aurais pas pu réaliser mes manips de première année et qui m'a permis de m'investir dans les enseignements à SupAgro. Merci à Cyrille, pour tes bons conseils et pour avoir entretenu mes compétences créatives au moins une fois par an.

Merci aux membres de mon comité et en particulier à Nick Rowe. Nick, tu m'as offert un accès privilégié à ton laboratoire pour réaliser les mesures de biomécanique et je t'en suis très reconnaissant. Tu t'es également beaucoup impliqué dans les réflexions méthodologiques et écologiques qui ont fondé ma première année de thèse. J'espère avoir la chance de travailler avec toi dans le futur, ne serait-ce que pour finir de valoriser les données de la thèse !

Un grand merci à Jean ! J'ai passé de supers moments avec toi sur le terrain. Merci d'avoir affûté ma passion pour le terrain et pour les plantes. J'admire ton aisance dans la transmission de tes passions. Tu as été de très bon conseil pour les phases de terrain, mais aussi dans la gestion des autres tracas de la thèse.

Merci aussi à Sylvain et Johanne, qui travaillent sur des thématiques voisines mais qui ont accepté de collaborer avec moi sur un super projet. Nos échanges ont été très enrichissants et j'espère qu'on aura l'occasion de valoriser les caisses de données qu'il reste à explorer ! Merci à Ivan pour avoir contribué à la manip et pour m'avoir fait découvrir un peu plus l'univers des isotopes.

Enfin, merci à toute l'équipe du TE : Thierry, David, Pauline, Jeremy pour toute l'aide que vous m'avez fourni pendant les manip. Merci également à Alex, Soline et Farah pour leur aide pendant leur stage à mes côtés.

J'ai aussi une pensée pour les thésards de l'équipe avec qui j'ai commencé : les aventures de tricopar avec Iris et Pauline, les débuts des vidéos du jour, les débats enflammés de bobos bios toujours en questionnement, les dernières soirées bières non permanents et les grandes rigolades ! Puis il y a ceux qui sont arrivés en route et la formation des quatre mousquetaires : Kevin le critique fashion et design, Pierre le positiviste presque naïf, Florian expert en potins et relations humaines et moi pour l'explication presque fidèle des bruits de couloir. Merci les gars pour ces moments de décompression de fin thèse ! Un bravo à Kevin, qui a supporté mes obsessions compulsives pour les plantes, poissons, crevettes, mesures allométriques et jeux débiles sur internet et/ou avec des élastiques... Merci à Pierre pour nos discussions post 19h qui n'en finissent pas et qui remontent (parfois) le moral. Et merci Florian pour ton expérience de docteur, pour les cours qu'on a fait ensemble et pour toutes les pauses thé pour faire nos « bitches ». Il y a aussi Matthias, notre Wikipedia quand internet marche plus et pour qui j'ai appris à démonter un clavier, créer une misère punk et même alimenter un « repo Github » ! Je pense aussi à Laura (spécialiste pour ne pas venir aux événements qu'elle organise), la seule espagnole qui a appris par un français que la casa de papel ça déchire ! Et puis il y a Agathe, Floriane, Germain, François, Monique : il n'y a aucun doute ECOPAR est l'équipe la plus cool du cefe !

Merci à tous pour ces années intenses à vos côtés, c'était une belle aventure.



TABLE DES MATIÈRES

Introduction générale	1
1 CONTEXTE	3
1.1 Description fonctionnelle du phénotype des plantes	3
1.2 Les stratégies écologiques des plantes : relations entre le phénotype et l'environnement	10
1.2.1 Relations entre l'environnement et les valeurs de traits.....	11
1.2.2 Effet de l'environnement sur les corrélations entre traits	13
1.3 Conclusions et perspectives.....	14
2 PHÉNOLOGIE ET DÉFENSE CHEZ LES VÉGÉTAUX : ÉTAT DE L'ART	15
2.1 Phénologie	15
2.1.1 Définition, signification écologique et méthodes de mesure	15
2.1.2 Les facteurs de contrôle de la phénologie	18
2.1.3 La phénologie dans le contexte du cycle de vie	20
2.1.4 Relations entre la phénologie et les autres dimensions du fonctionnement des plantes	22
2.2 La défense chez les végétaux	23
2.2.1 Les stratégies de défense chez les plantes	24
2.2.2 Caractériser la défense par les traits	27
2.2.3 Relations entre la défense et les autres dimensions du fonctionnement des plantes	30
3 OBJECTIFS ET STRUCTURE DE LA THÈSE	31
4 RÉFÉRENCES	32

Chapitre 1	Matériel et méthodes	39
1	CONTEXTE MÉDITERRANÉEN DU SUD DE LA FRANCE	41
1.1	Climat et sols	41
1.2	Activités humaines	43
2	SITES D'ÉTUDE, SÉLECTION D'ESPÈCES ET DESIGN EXPÉRIMENTAUX	45
2.1	Successions secondaires de Cazarils et des hautes garrigues	46
2.1	Parcours ovin de la Fage	48
2.3	Expérimentations en jardin commun	49
3	RÉFÉRENCES	51

Chapitre 2 Quelle est la meilleure date pour fleurir et disperser ? Phénologie de la reproduction en Méditerranée

	53
1	INTRODUCTION.....	56
2	MATERIAL AND METHODS.....	57
2.1	Location of study sites and calculation of environmental variables	57
2.2	Collection of phenological data in the study sites	58
2.3	Normalization of phenological data and water deficit index	58
2.4	Data analyses: From population to species values	58
2.5	Data analyses: Statistical treatments	59
2.6	Phylogeny	59
3	RESULTS.....	60
3.1	Reproductive phenology, climate and phylogeny	60
3.2	Variation in reproductive phenology between groups of species	62
3.3	Covariations among reproductive phases	62
4	DISCUSSION.....	63
4.1	Constraints on plant phenology under Mediterranean climate conditions....	63
4.2	Reproductive phenology in different groups of species	64
4.3	fast-slow phenological continuum in herbaceous species?.....	65
5	CONCLUSIONS	66
	Supplementary material	69

Chapitre 3 Coordination entre phases phénologiques chez 23 espèces de parcours méditerranéens 83

1	INTRODUCTION	85
2	MATÉRIEL ET MÉTHODES	89
2.1	Sélection des espèces et design expérimental	89
2.2	Production de feuilles	90
2.3	Phénologie de la reproduction	91
2.4	Estimation des durées des phases, de leur asymétrie et des rythmes de développement	92
2.5	Analyses statistiques	93
3	RÉSULTATS	95
3.1	Couplage entre la floraison et la dispersion de graines	95
3.2	Effets de la date de début de floraison sur la période reproductive	96
3.3	Relation entre le phyllochrone et la date de floraison	100
4	DISCUSSION	100
4.1	Une forte coordination entre la floraison et la dispersion des graines	100
4.2	Compromis temps-taille ou continuum rapide-lent ?	101
4.3	Impact de la phénologie végétative sur la date de floraison	104
5	CONCLUSIONS	105
6	RÉFÉRENCES	105

Chapitre 4 La phénologie reproductive comme un axe de variation fonctionnelle : intégrer le facteur temporel dans l'espace phénotypique 109

1	INTRODUCTION.....	111
2	MATERIAL AND METHODS.....	113
2.1	Location of study sites and environmental conditions	113
2.2	Collection of trait data in the study sites	114
2.3	Normalization of phenological data and water deficit index	116
2.4	From population to species values	116
2.5	Phylogeny	117
2.6	Statistical analyses	118
3	RESULTS.....	119
3.1	Estimated trait means	119
3.2	Distribution of trait values	120
3.3	Patterns of trait co-variations	123
3.4	Effects of phylogeny	127
4	DISCUSSION.....	129
4.1	Reproductive phenology is a major axis of phenotypic variation in Mediterranean plant	129
4.2	Onset of the reproduction and reproductive plant height for herbaceous species	130
4.3	Seed mass at maturity and seed phenology	131
4.4	Leaf economics and water deficit during seed maturation	132
5	CONCLUSIONS	133
6	REFERENCES	134

Chapitre 5	Propriétés biomécaniques des feuilles et syndrome d'économie foliaire.....	141
1	INTRODUCTION.....	143
2	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	145
2.1	Site d'étude et sélection des espèces	145
2.2	Mesures biomécaniques et traits foliaires	146
2.3	Estimation de la teneur en fibres des feuilles	148
2.4	Traits du syndrome d'économie foliaire.....	148
2.5	Analyses des données.....	149
3	RÉSULTATS	150
3.1	Caractéristiques biomécaniques des feuilles.....	150
3.2	Propriétés biomécaniques des feuilles et traits morpho-anatomiques et chimiques	152
3.3	Propriétés biomécaniques et le syndrome d'économie foliaire	156
4	DISCUSSION.....	157
4.1	La résistance à la coupe et la force à l'étirement capturent différentes caractéristiques des feuilles	157
4.2	Les propriétés biomécaniques des feuilles dans le syndrome d'économie foliaire	158
5	CONCLUSIONS	159
6	RÉFÉRENCES	160

Chapitre 6 synthèse et discussion générale 163

1.	LA PHÉNOLOGIE	165
1.1	La phénologie comme axe de variation fonctionnelle	165
1.1.1	Reconsidérer le compromis « time-size » en Méditerranée.....	165
1.1.2	...vers un syndrome « fast-slow » de la phénologie?.....	167
1.2	La phénologie dans l'espace phénotypique des plantes	169
1.2.1	Relations avec la stature	169
1.2.2	Relations avec les capacités de reproduction.....	170
1.2.3	Relations avec le fonctionnement de la feuille.....	171
2	LA DÉFENSE ET LE SYNDROME D'ÉCONOMIE FOLIAIRE	172
2.1	La défense mécanique et la durée de vie des feuilles	173
2.2	La défense et la photosynthèse	175
2.3	Le compromis croissance-défense et le syndrome d'économie foliaire	175
3	APPORT DE LA PHÉNOLOGIE ET DE LA DÉFENSE DANS L'ESPACE PHÉNOTYPIQUE DES PLANTES	177
4	SUR LES MÉTHODES UTILISÉES DANS LA THÈSE	179
5	PERSPECTIVES DE RECHERCHE	181
6	RÉFÉRENCES	183

Introduction générale

1 CONTEXTE

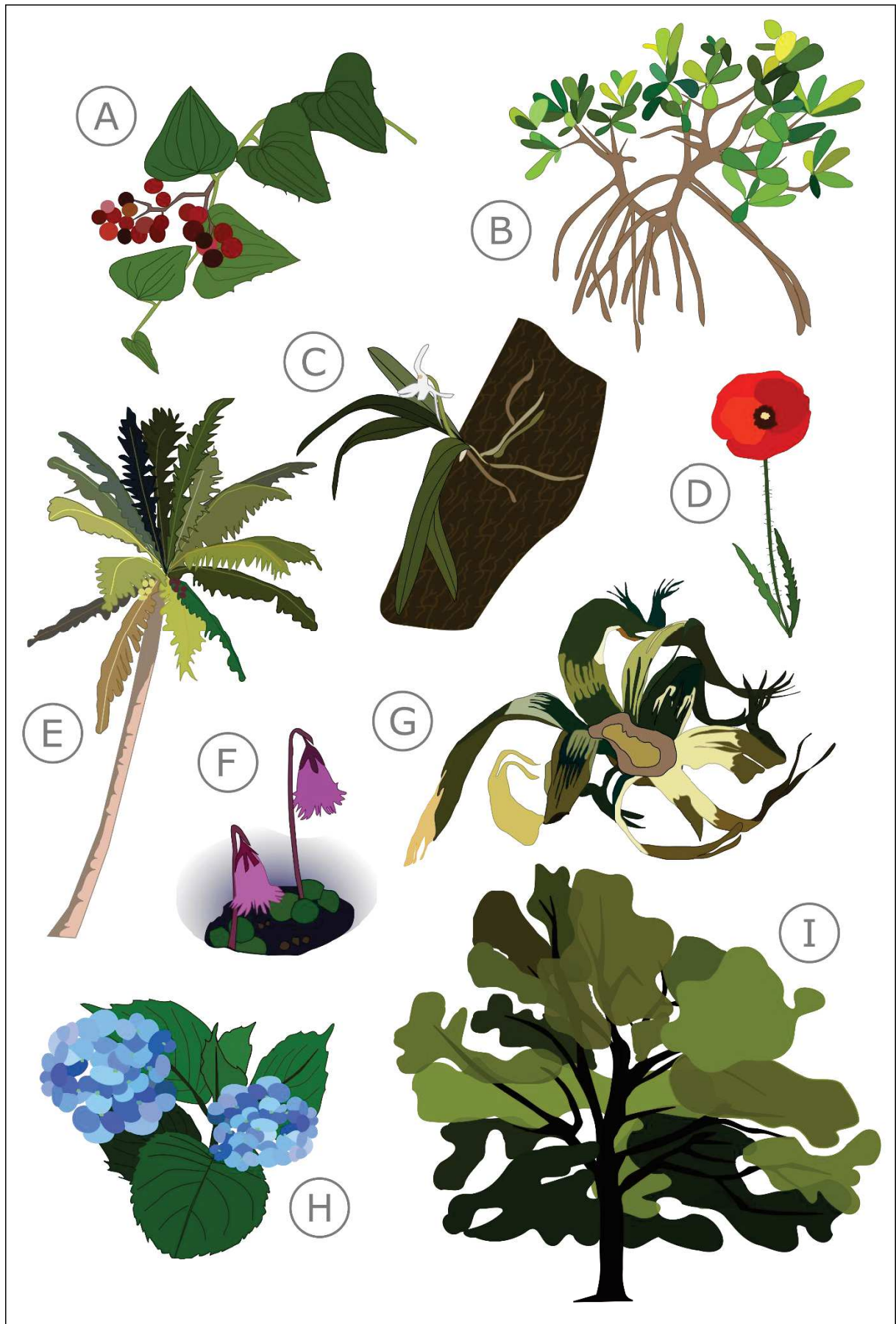
1.1 Description fonctionnelle du phénotype des plantes

Tous les végétaux font face à trois défis majeurs pour se maintenir et avoir une descendance : ils doivent (1) s'installer, (2) s'établir et (3) se disperser (Weiher *et al.* 1999). Grâce à leur grande capacité d'adaptation, et à plusieurs millions d'années d'évolution, les 391 000 espèces de plantes vasculaires vivantes aujourd'hui (estimation de Lughadha *et al.* 2016) arborent une immense variabilité de formes et de fonctions leur permettant de résoudre ces challenges dans la plupart des environnements terrestres (exemples en Fig. 1). Il est admis depuis longtemps que l'on peut identifier des patrons généraux au sein de cette diversité nous permettant de la structurer et de la classifier sur la base des caractéristiques phénotypiques des plantes. Depuis l'Antiquité, certaines fonctions des plantes ont été identifiées comme fondamentales pour leur survie et leur reproduction et sont utilisées dans différentes classifications dites fonctionnelles. Par exemple, le philosophe grec Théophraste a proposé une classification des végétaux en « arbres », « arbrisseaux », « sous-arbrisseaux » et « plantes herbacées » (300 ans avant J.-C.) sur la base de la taille des plantes et de leur capacité à produire du bois. Plus récemment, la classification des types biologiques de Raunkiaer (1934) se base sur la position des organes de résistance permettant la survie des plantes en réponse aux conditions climatiques.

Depuis le début des années 1990, la recherche d'une description plus détaillée du fonctionnement des plantes a connu un regain d'intérêt. En effet, cette démarche promet des améliorations significatives dans notre compréhension mais également notre prédiction du fonctionnement des communautés et des écosystèmes (Lavorel & Garnier 2002; Lavorel *et al.* 2007; Garnier, Navas & Grigulis 2016). Westoby *et al.* (2002) proposent de caractériser le phénotype des plantes par des axes de variation fonctionnelle, qui décrivent de manière continue différents aspects de la structure et des fonctions des individus. Cette approche se base sur le fait que toutes les espèces végétales utilisent les mêmes ressources principales (lumière, CO₂ et nutriment minéraux) et que les différences phénotypiques entre individus sont essentiellement dues à différentes stratégies d'acquisition et d'allocation de ces ressources plutôt qu'à l'utilisation de ressources alternatives. Cette classification n'est donc plus basée sur des catégories de plantes, mais sur la variation continue des caractéristiques des feuilles, tiges, racines, graines, etc... Trois critères primordiaux doivent être respectés pour définir un axe de variation fonctionnelle : (1) il doit avoir une signification claire pour le

fonctionnement et/ou la performance écologique des individus, mis en évidence expérimentalement, (2) il doit présenter une variabilité importante entre espèces et doit garder un certain degré de cohérence au niveau intra-spécifique, et (3) il peut être décrit de manière similaire pour une large gamme d'espèces. Les axes de variation sont généralement appréhendés par la mesure de caractères phénotypiques ou « traits », définis comme toute caractéristique morphologique, physiologique ou phénologique mesurable à l'échelle d'un individu (Violle *et al.* 2007).

FIGURE 1 | Exemples d'espèces représentant la diversité du monde végétal et leur capacité à coloniser la plupart des environnements terrestres. (A) *Smilax aspera*, rendue célèbre par la bande dessinée des Schtroumpfs, est une des rares espèces de lianes de milieux méditerranéens. Elle a des épines, des feuilles sclérophylles et elle est trop solide pour être rompue à la main, ce qui contribue à rendre la garrigue languedocienne difficilement pénétrable. (B) *Rhizophora mangle* est un arbuste tropical qui pousse dans les estrans et qui s'ancre dans la vase de la mangrove grâce à ses imposantes racines-échasses disposées en arceaux. Il supporte des milieux à forte concentration en sel ainsi que des immersions régulières au gré des marées. (C) *Jumellea rossii* est une petite orchidée épiphyte des forêts tropicales humides de l'île de la Réunion qui profite des troncs des arbres pour obtenir un accès privilégié à la lumière. (D) *Papaver rhoeas* est un adventice des cultures céréalières européennes. Elle supporte les fortes perturbations agricoles grâce à son cycle de vie annuel, sa croissance rapide et sa production massive de petites graines. (E) *Cocos nucifera* est un palmier qui pousse sur les plages tropicales et dont le fruit, qui peut peser jusqu'à 1.5 kg, flotte lui permettant de coloniser de nouvelles plages voire de nouvelles îles. (F) *Soldanella alpina* est une plante à rhizome pérenne des Alpes qui passe une grande partie de l'année sous un épais manteau neigeux tout en gardant des feuilles vertes. Elle démarre la croissance de ses fleurs sous la neige pendant la fonte de printemps malgré les faibles températures. (G) *Welwitschia mirabilis* est une plante du désert du Namib pouvant vivre plus de 1000 ans. Elle est constituée de deux feuilles à croissance indéfinie et est particulièrement adaptée à la sécheresse grâce à la morphologie de ses feuilles et sa photosynthèse de type CAM. (H) *Hydrangea macrophylla*, arbore des inflorescences spectaculaires une grande partie de l'année, ce qui lui a permis de coloniser nos jardins et en particulier celui de ma grand-mère. (I) *Quercus robur* est un arbre des régions tempérées d'Europe pouvant atteindre 40 mètres de haut. Il détecte le raccourcissement des jours en automne et déclenche un processus complexe de résorption des nutriments et de mort cellulaire programmée pour perdre ses feuilles en hiver et protéger ses bourgeons contre le gel.



Différentes propositions d'axes de variation ont été faites dans la littérature écologique.

Grime *et al.* (1997) proposent l'utilisation de 67 traits afin de caractériser un grand nombre d'aspects du fonctionnement des espèces en décomposant l'ensemble des étapes de l'histoire de vie (de la germination à la sénescence en passant par la croissance et la reproduction). Dans un souci de concision et de praticité, Weiher *et al.* (1999) ont réduit cette liste à 12 traits fondamentaux permettant d'appréhender les phases principales du cycle de vie des plantes : l'installation, l'établissement et la dispersion. Plus récemment, Laughlin (2014) propose de se concentrer sur sept dimensions, décrivant le fonctionnement des organes des plantes (feuilles, tiges, racines, fleurs, graines), la stature (hauteur) et des traits d'histoire de vie (longévité). Cependant, la plupart des études en écologie comparative n'intègrent qu'une partie de ces traits. À la suite de la proposition de Westoby (1998), un intérêt particulier a été porté à trois axes de variation :

- (1) Le plus étudié est sans doute celui du syndrome d'économie foliaire (LES par la suite pour "Leaf Economics Spectrum", Wright *et al.* 2004). Ce syndrome décrit les espèces de plantes selon leurs caractéristiques foliaires et met en avant un compromis entre la longévité des feuilles et leur capacité photosynthétique. Or, la vitesse de photosynthèse est fortement corrélée à la capacité d'acquisition du carbone et des minéraux alors que la durée de vie des feuilles est corrélée positivement au temps de résidence des minéraux dans la plante. On considère que l'utilisation des ressources par les plantes peut donc être décrite par un axe de variation fonctionnelle allant des plantes à acquisition rapide des ressources, avec un retour sur investissement rapide et un turn-over élevé des organes à des plantes à vitesse d'acquisition plus lente mais avec une meilleure conservation des nutriments.
- (2) Le second est un axe de stature de la plante qui caractérise un compromis entre l'âge à la première reproduction et la taille. Il s'agit ici d'un compromis d'allocation des ressources entre la croissance et la reproduction. On définit alors un axe de variation fonctionnelle allant d'espèces qui réalisent un investissement dans la reproduction tôt dans leur histoire de vie au détriment de leur propre survie (typiquement les plantes annuelles) à celles qui investissent préférentiellement les ressources dans la croissance et à la survie, afin de maximiser leur compétitivité pendant l'établissement, avant d'en allouer à la reproduction (typiquement les arbres).

- (3) Enfin, le troisième est un axe de capacité de régénération qui caractérise un compromis entre l'aptitude à la compétition des plantules et leur capacité de colonisation. En effet, lorsque l'on compare un grand nombre d'espèces, on observe une corrélation négative entre le nombre de graines produites et la masse individuelle des graines (Shipley & Dion 1992; Leishman *et al.* 2000; Moles & Westoby 2004). De nouveau, il s'agit d'un compromis d'allocation des ressources dans la production de graines : pour une quantité de ressource allouée à la reproduction, il est possible de produire beaucoup de petites graines pour maximiser la colonisation sans assurer toutefois la survie de toutes les plantules ou produire peu de grosses graines pour maximiser la survie des plantules mais en limitant leur dispersion.

Les traits les plus pertinents pour caractériser ces axes sont souvent très difficiles à obtenir (durée de vie des feuilles, vitesse de croissance, aptitude à la compétition, nombre de graines total...) et demandent des mesures coûteuses ou la mise en place d'expérimentations de longue durée. Il a alors été proposé d'utiliser des marqueurs fonctionnels, qui sont des traits corrélés à ces fonctions mais plus faciles à mesurer, afin de pouvoir estimer la position d'une large gamme d'espèces sur ces axes. La surface spécifique foliaire (SSF, rapport entre la surface d'une feuille et sa masse sèche), la hauteur de la plante (H) et la masse d'une graine (MG) sont considérés comme de bons marqueurs fonctionnels de ces trois axes et forment le schéma du Leaf-Height-Seed (LHS par la suite, Westoby 1998) largement utilisé pour la caractérisation fonctionnelle des espèces dans les études comparatives (Laughlin *et al.* 2010; Freschet, Aerts & Cornelissen 2012).

Dans une étude récente, Díaz *et al.* (2016) présentent pour la première fois l'espace phénotypique formé par plus de 2 200 espèces de plantes provenant de tous les biomes terrestres et construit à partir des trois traits du LHS, de la concentration en azote des feuilles, de la surface d'une feuille et de la densité des tiges (Fig. 2). Cette étude offre la première visualisation synthétique des variations phénotypiques de plusieurs dimensions fonctionnelles des plantes à l'échelle globale. Elle permet ainsi d'observer, d'une part, les gammes de variation de chaque trait à l'échelle mondiale mais aussi, d'autre part, les combinaisons de traits les plus courantes (hotspots fonctionnels) et celles qui sont plus rares ou semblent impossibles.

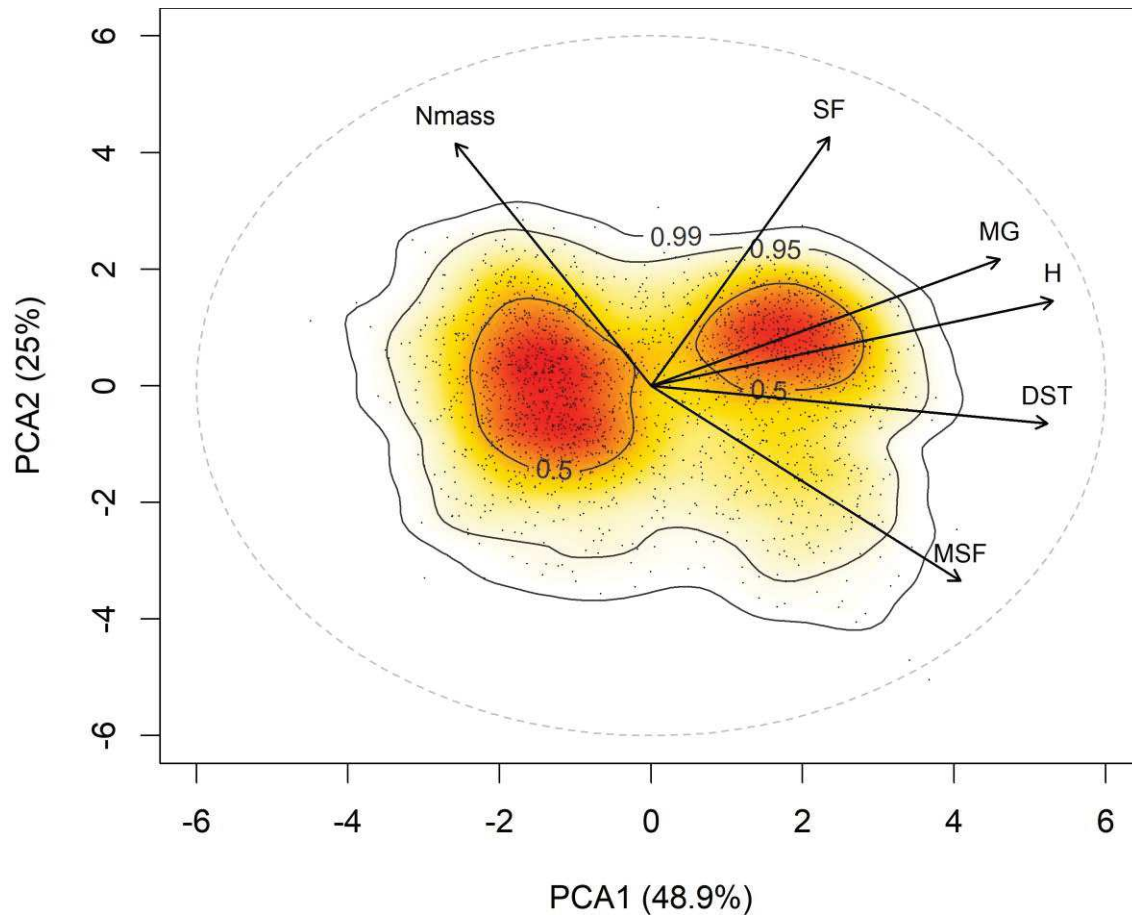


FIGURE 2 | Premier plan d’une analyse en composantes principales réalisée à partir de six traits (SF : surface d’une feuille, MSF : masse surfacique foliaire, Nmass : concentration en azote des feuilles, MG : masse d’une graine, H : hauteur et DST : la densité spécifique des tiges) pour plus de 2 200 espèces de plantes. Le gradient de couleurs indique les régions de forte (rouge) à faible (blanc) probabilité d’occurrence des espèces. Les contours représentent les quantiles 50%, 95% et 99%. Les régions rouges à l’intérieur du quantile 50% représentent des hotspots fonctionnels. Tiré de Díaz *et al.* (2016).

Les gammes de variation des traits sont généralement bornées par des processus physiques. Par exemple, la hauteur d’un arbre ne peut pas dépasser une valeur théorique comprise, selon les modèles, entre 122 et 130 mètres en raison d’une limite physique d’acheminement de l’eau à travers les vaisseaux du xylème (Koch *et al.* 2004). De même, la vitesse de photosynthèse d’une feuille ne peut pas dépasser une valeur maximale puisque la quantité de protéines photosynthétiques est limitée par le volume intracellulaire total des cellules du parenchyme. Cependant, d’autres contraintes peuvent être à l’origine d’une réduction de la gamme des valeurs de traits observées et l’expression de ces valeurs extrêmes restent anecdotiques (seuls quelques arbres de plus de 100 mètres de hauteur ont été répertoriés et le record est détenu par Hypérion, un séquoia à feuilles d’if de Californie du Nord dont la taille est de 115,55 mètres). En effet, les organes des plantes sont souvent impliqués dans différentes fonctions qui ne

peuvent pas être maximisées simultanément. La plante dispose d'une quantité de ressources finie et alloue une part plus ou moins importante de ces ressources dans chacune des fonctions pour optimiser son fonctionnement. Par exemple, les feuilles doivent assurer une fonction de photosynthèse mais aussi de transport des photosynthétats vers les autres organes de la plante. Une partie des ressources allouées à la construction de la feuille est donc investie dans la construction de nervures au détriment du volume de parenchyme.

Le fait que certaines combinaisons de traits sont plus communes que d'autres peut être expliqué par deux niveaux de contraintes : les contraintes physiologiques et biophysiques (contraintes proximales sensu Calow 1987) et les contraintes évolutives (contraintes distales sensu Calow 1987). Les premières découlent d'une coordination des fonctions à l'échelle de l'organisme afin d'assurer sa viabilité et sa reproduction. Par exemple, une grande stature de la plante, permettant une plus grande capacité de compétition pour l'accès à la lumière, doit être coordonnée à une forte densité des tiges pour permettre le soutien des structures végétatives. La production de grosses graines impose une stature suffisamment importante pour fournir les ressources nécessaires à leur développement et permettre une dispersion efficace. Ou encore, la vitesse d'acquisition du carbone au niveau foliaire doit être coordonnée à la vitesse d'acquisition des nutriments minéraux au niveau du système racinaire (Freschet, Aerts & Cornelissen 2012; Reich 2014). Certaines combinaisons de traits apparaissent donc comme non optimales, voire impossibles, même si les traits considérés sont associés à des axes de variation indépendants ou concernent des organes différents. Les contraintes évolutives, quant à elles, sont le résultat des interactions entre organismes. Certaines combinaisons de traits permettent la survie et la reproduction de la plante mais l'individu qui les exprime est éliminé par compétition pour les ressources par d'autres plantes plus performantes, ou par l'action de pathogènes ou d'herbivores. Ainsi, seuls les individus les plus performants sont sélectionnés réduisant la gamme de phénotypes observés.

L'étude des corrélations entre traits est donc centrale dans la caractérisation du phénotype des plantes. Bien qu'on puisse rarement identifier le type de contrainte à leur origine, elles apportent des éléments importants dans la compréhension du fonctionnement des plantes et de la structuration de la diversité végétale. Les corrélations entre traits du même axe de variation permettent d'identifier les meilleurs marqueurs fonctionnels qui allient (1) une implication directe dans la fonction ciblée, (2) une grande variabilité entre espèces et (3) une facilité de mesure. Puis, les corrélations entre les axes de variation permettent d'estimer la dimensionnalité du phénotype (Laughlin 2014), qui correspond au nombre de dimensions

indépendantes nécessaires à la description du phénotype. Ainsi, Díaz *et al.* (2016) utilisent six traits pour caractériser quatre axes de variation fonctionnelle : la masse surfacique foliaire (MSF, le rapport entre la masse des feuilles et leur surface = $1/SSF$) et la concentration en azote des feuilles pour l'axe de gestion des ressources, la hauteur de la plante et la surface d'une feuille pour l'axe de stature et de compétitivité pour la lumière, la masse d'une graine pour l'axe de capacité de régénération et la densité des tiges pour l'axe de soutien mécanique et de flux de sève. Ils montrent que les axes de stature des plantes, de capacité de reproduction et de soutien mécanique sont positivement corrélés entre eux et participent fortement à la première dimension de l'espace phénotypique. L'axe de gestion des ressources, quant à lui, apparaît indépendant des trois premiers et participe à la seconde dimension. L'étude conclut que la variation des six traits utilisés, décrivant quatre axes de variation, peut être décrite par un plan à deux dimensions.

Actuellement, il n'existe pas de consensus sur une liste d'axes de variation décrivant les fonctions majeures des plantes et certains auteurs basent leur raisonnement sur le fonctionnement d'organes considérés indépendamment (Laughlin 2014) quand d'autres se basent sur des composantes de la performances de l'individu (croissance, survie et reproduction), bien plus difficiles à appréhender par la mesure de traits (Weiher *et al.* 1999). Le cadre théorique de décomposition du phénotype en axes de variation se heurte également au fait que les traits sont très souvent impliqués dans plusieurs fonctions créant parfois des ambiguïtés sur la signification écologique de leur variation entre individus et entre espèces. Par exemple, la masse surfacique foliaire est un trait clairement impliqué dans le LES dans le sens où des feuilles à forte masse surfacique foliaire conservent leurs ressources plus longtemps (Wright *et al.* 2004). Cependant, il a également été mis en évidence que ce trait est impliqué dans la défense contre l'herbivorie (Onoda *et al.* 2011). Les variations de masse surfacique foliaire entre espèces ne peuvent donc pas être clairement associées à une réponse pour des stratégies de gestion des ressources différentes ou pour un investissement dans la défense contre l'herbivorie.

1.2 Les stratégies écologiques des plantes : relations entre le phénotype et l'environnement

Hutchinson (1957) définit la niche écologique d'un individu comme la gamme des facteurs abiotiques et biotiques dans laquelle il peut croître, survivre et se reproduire. Il s'agit d'une description multidimensionnelle de l'ensemble des ressources utilisables par l'individu et des

contraintes abiotiques et biotiques qu'il peut tolérer. Ce concept illustre le fait que la performance des organismes dépend des conditions environnementales dans lesquelles ils se développent et que certains phénotypes, bien que favorisés dans certains environnements, peuvent être défavorisés dans d'autres conditions. Il existe donc un certain degré de coordination entre phénotype et environnement, et on s'attend notamment à ce qu'au sein d'environnements similaires il existe une évolution convergente des patrons adaptatifs qui transcendent les barrières taxonomiques (Silvertown & Gordon 1989). Un exemple marquant est celui des plantes de climat méditerranéen. En effet, il existe plusieurs régions dans le monde, outre le pourtour méditerranéen, où les conditions climatiques sont caractérisées par des étés chauds et secs et des hivers doux et humides (Californie, centre du Chili, région du Cap en Afrique du Sud, Sud et Ouest de l'Australie). Malgré des compositions en espèces différentes et les longues histoires évolutives qui séparent les plantes de continents différents, on observe une convergence au niveau de la structure de la végétation et des valeurs de traits des espèces dans ces milieux (Mooney *et al.* 1970; Mooney & Dunn 1970; Rundel *et al.* 2016). Le maquis méditerranéen, le matorral chilien, le chaparral californien ou encore le fynbos d'Afrique du Sud sont toutes des formations végétales basses, majoritairement composées d'espèces buissonnantes, épineuses, odorantes et aux feuilles sclérophylles (Rundel *et al.* 2016).

1.2.1 Relations entre l'environnement et les valeurs de traits

Le modèle de Grime (1977) reste aujourd'hui la tentative la plus aboutie de connexion entre le phénotype et l'environnement. Il repose sur une caractérisation de l'environnement à partir de deux composantes indépendantes : (1) le niveau de stress qu'il impose et (2) le régime de perturbation. Trois stratégies écologiques primaires concernant la phase végétative des plantes sont identifiées en réponse à des variations de ces caractéristiques environnementales : (1) les plantes compétitives (C) sont adaptées à des milieux riches en ressources ou peu stressants et faiblement perturbés, (2) les plantes tolérantes au stress (S) à des milieux pauvres en ressources ou stressants et faiblement perturbés et (3) les plantes rudérales (R) à des milieux riches en ressources ou peu stressants et fortement perturbés. Les espèces végétales peuvent alors être positionnées dans un triangle dont les sommets représentent ces trois stratégies primaires selon leurs scores de compétitivité, de rudéralité et de résistance au stress, estimés à partir d'un ensemble de traits (Tableau 1, Hodgson *et al.* 1999; Pierce *et al.* 2013). Le succès de ce modèle réside dans sa capacité à formaliser les connexions entre plusieurs dimensions de l'environnement et celles du phénotype. Cependant, il a été critiqué pour deux raisons

majeures : d'une part, il n'existe pas de consensus sur la meilleure façon d'estimer le niveau de stress et de perturbation d'un milieu, mais surtout d'autre part, il ne prend pas en compte le fait que plusieurs combinaisons de traits peuvent être performantes dans le même environnement (Marks & Lechowicz 2005). Le modèle de Grime (1977) est donc pertinent pour une description des différences phénotypiques entre espèces provenant d'habitats différents mais il ne permet pas une description détaillée de la diversité phénotypique observée au sein d'un environnement.

TABLEAU 1 | Quelques caractéristiques des plantes compétitives, tolérantes au stress et rudérales.

Adapté et traduit de Grime (2001). Pour plus de caractéristiques, se référer à Grime (2001, pp. 89-90).

	Compétitives	Tolérantes au stress	Rudérales
(i) Morphologie			
1. Forme de croissance	Herbacées, buissons, arbres	Lichens, herbacées, buissons et arbres	Herbacées
2. Morphologie des parties aériennes	Canopée de feuille très dense. Grande extension latérale aérienne et souterraine	Très grande diversité de forme de croissance	Petite stature et extension latérale limitée
3. Forme des feuilles	Robustes, souvent mésophytiques	Souvent petites et coriaces ou en forme d'aiguilles	Variables, souvent mésophytiques
(ii) Histoire de vie			
4. Longévité de la phase établie	Longue ou relativement courte	Longue à très longue	Très courte
5. Longévité des feuilles et racines	Relativement courte	Longue	Courte
6. Phénologie de la floraison	Fleurs produites après (ou plus rarement avant) les périodes de productivité potentielle maximale	Pas de relation générale entre la date de floraison et les saisons	Fleurs produites tôt dans l'histoire de vie
7. Proportion de la production annuelle allouée aux graines	Faible	Faible	Élevée
(iii) Physiologie			
8. Taux de croissance relatif potentiel moyen	Élevé	Faible	Élevé
9. Photosynthèse et acquisition des nutriments	Fortement saisonnières, coïncidant avec les longues périodes de croissance végétative	Opportuniste, souvent découplées de la croissance végétative	Opportuniste, coïncidant avec la croissance végétative
10. Conservation des photosynthétats et des nutriments	La plupart des photosynthétats et des nutriments minéraux sont rapidement intégrés dans des structures végétatives mais une partie est stockée et forme un capital afin d'étendre la croissance lors de la saison de croissance suivante	Systèmes de stockage dans les feuilles, tiges et/ou racines	Limité aux graines
(iv) Autre			
11. Litière	Abondante, généralement non persistante	Éparse, généralement persistante	Éparse, généralement non persistante
12. Palatabilité pour des herbivores généralistes	Souvent élevée	Faible	Généralement élevée

D'autre part, une littérature scientifique abondante s'intéresse aux relations entre les traits des plantes et l'environnement en testant généralement la réponse d'un trait spécifique à un gradient d'une composante environnementale (traits foliaires vs aridité ou fertilité, hauteur vs régime de perturbation, etc...). Des synthèses scientifiques ont été réalisées à partir de ces études montrant la variabilité des réponses selon le trait et le gradient considéré (Poorter *et al.* 2010; Garnier, Navas & Grigulis 2016). Dans le contexte de la description du phénotype des plantes, on considère généralement que l'environnement abiotique ou biotique joue un rôle de filtre sur les valeurs de traits. On s'intéresse notamment à mettre en évidence une sélection vers des valeurs de traits optimales mais aussi à estimer la force du filtre environnemental en observant la réduction de la gamme de traits dans un environnement par rapport à un pool régional d'espèces. Selon l'intensité du filtre environnemental, plusieurs stratégies écologiques, associées à différentes combinaisons de traits, peuvent coexister (Marks & Lechowicz 2005).

1.2.2 Effet de l'environnement sur les corrélations entre traits

L'impact de l'environnement sur les corrélations entre traits reste mal connu. On s'attend à ce que les mêmes contraintes physiologiques opèrent dans tous les environnements. Ainsi, les corrélations entre les traits du LES sont observées dans tous les environnements terrestres (Wright *et al.* 2004). Cependant, les paramètres des relations peuvent changer et l'étude détaillée de l'effet de deux composantes environnementales sur la relation entre la masse surfacique foliaire et la durée de vie des feuilles montre des résultats contrastés : (1) une diminution de la disponibilité en ressources minérales modifie le filtre environnemental et déplace les valeurs de traits le long de la droite de régression sans changer ses paramètres (même pente et ordonnée à l'origine) alors qu'une (2) diminution de la disponibilité en eau provoque un raccourcissement de la durée de vie des feuilles pour une surface spécifique donnée (diminution de l'ordonnée à l'origine) (Fig. 3; Wright, Westoby & Reich 2002; Wright *et al.* 2005). Ainsi, les patrons de corrélations restent qualitativement similaires, mais dans certains cas les coefficients des relations peuvent être affectés par les conditions climatiques locales. Dans une autre optique, Dwyer and Laughlin (2017) proposent que la force des relations entre traits devrait augmenter dans des milieux stressants. Leur hypothèse se base sur le fait que certains phénotypes suboptimaux, présentant un écart à la droite de régression, ne peuvent pas survivre dans des milieux stressants en raison de contraintes climatiques plus sévères. Cette hypothèse a été très peu testée et plus d'études seraient nécessaires pour la valider.

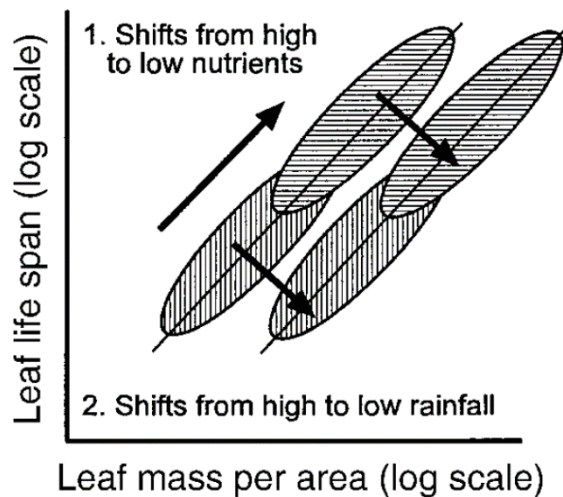


FIGURE 3 | Effet des conditions environnementales sur la relation entre la masse surfacique foliaire (leaf mass per area) et la durée de vie des feuilles (leaf life span). La diminution de la disponibilité en nutriments provoque un déplacement des valeurs sans changer les paramètres de la droite de régression alors qu'une diminution de la disponibilité en eau diminue l'ordonnée à l'origine de la relation. Extrait de Wright, Westoby and Reich (2002)

1.3 Conclusions et perspectives

Il n'existe pas de consensus sur l'identité et le nombre de traits que l'on doit utiliser pour décrire de manière complète le phénotype des plantes. Trois axes de variation fonctionnelle ont été très utilisés pour expliquer l'adéquation entre le phénotype des plantes et leur environnement, mais plusieurs autres dimensions restent peu explorées. L'objectif général du travail de thèse est d'explorer comment la phénologie et la défense peuvent être intégrées dans une meilleure description du phénotype dans les études d'écologie comparative. Bien que de nombreuses études aient été consacrées à ces deux aspects du fonctionnement des plantes, leurs relations avec les axes de variation communément utilisés en écologie comparative ont été encore peu étudiées. Avant de présenter plus en détail les objectifs de ce travail, une synthèse bibliographique portant sur la phénologie (section 2.1) et la défense (section 2.2) chez les végétaux est proposée dans la suite de ce chapitre.

2 PHÉNOLOGIE ET DÉFENSE CHEZ LES VÉGÉTAUX : ÉTAT DE L'ART

2.1 Phénologie

2.1.1 Définition, signification écologique et méthodes de mesure

La phénologie est l'étude de la temporalité des événements biologiques et périodiques du cycle de la vie des organismes au cours des saisons (Rathcke & Lacey 1985; Schwartz 2003). Elle décrit la dynamique temporelle de stades de développement comme les phases de dormance, de croissance, de reproduction et de sénescence chez les plantes. La phénologie permet de prendre en compte une dimension temporelle dans le concept de niche écologique, en décrivant la capacité des espèces à acquérir les ressources dont la disponibilité fluctue au cours de l'année (Fargione & Tilman 2005; Godoy *et al.* 2009). Elle joue également un rôle critique dans les interactions biotiques en permettant, par exemple, la synchronisation entre la floraison et la présence d'insectes pollinisateurs. La phénologie est donc une dimension fondamentale du fonctionnement des plantes puisqu'elle détermine le stade de développement au moment de leurs interactions avec les composantes de l'environnement (Forrest & Miller-Rushing 2010). En raison de son rôle majeur dans la survie et la reproduction, la phénologie est sous forte sélection, comme démontré par de rapides changements adaptatifs en réponse aux changements climatiques (Parmesan & Yohe 2003; Franks, Sim & Weis 2007) ou à un décalage phénologique des pollinisateurs (Visser & Holleman 2001).

TABLEAU 2 | Principaux stades du développement d'après l'échelle BBCH (Schwartz 2003)

Code	Stade phénologique
0	Germination / pousse / bourgeonnement
1	Développement des feuilles (tige principale)
2	Formation de tiges latérales / tallage
3	Élongation des tiges ou croissance de la rosette / développement de la tige (tige principale)
4	Développement des parties végétatives récoltables ou des organes de propagation végétative (tige principale)
5	Émergence des inflorescences (tige principale) / montaison
6	Floraison (tige principale)
7	Développement du fruit
8	Maturation des fruits ou des graines
9	Sénescence, début de dormance

La phénologie peut être décrite par des échelles standardisées. La plus courante est l'échelle BBCH (Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt und CHemische Industrie), formalisée

dans les années 1990 (Meier 1997) à partir de travaux menés pour les espèces cultivées datant des années 1970 (Zadoks, Chang & Konzak 1974). Cette échelle comporte neuf stades de développement principaux, organisés selon leur ordre d'apparition dans une séquence phénologique standard, et décrit l'activité végétative et reproductive des plantes (Tableau 2 et Fig. 4).

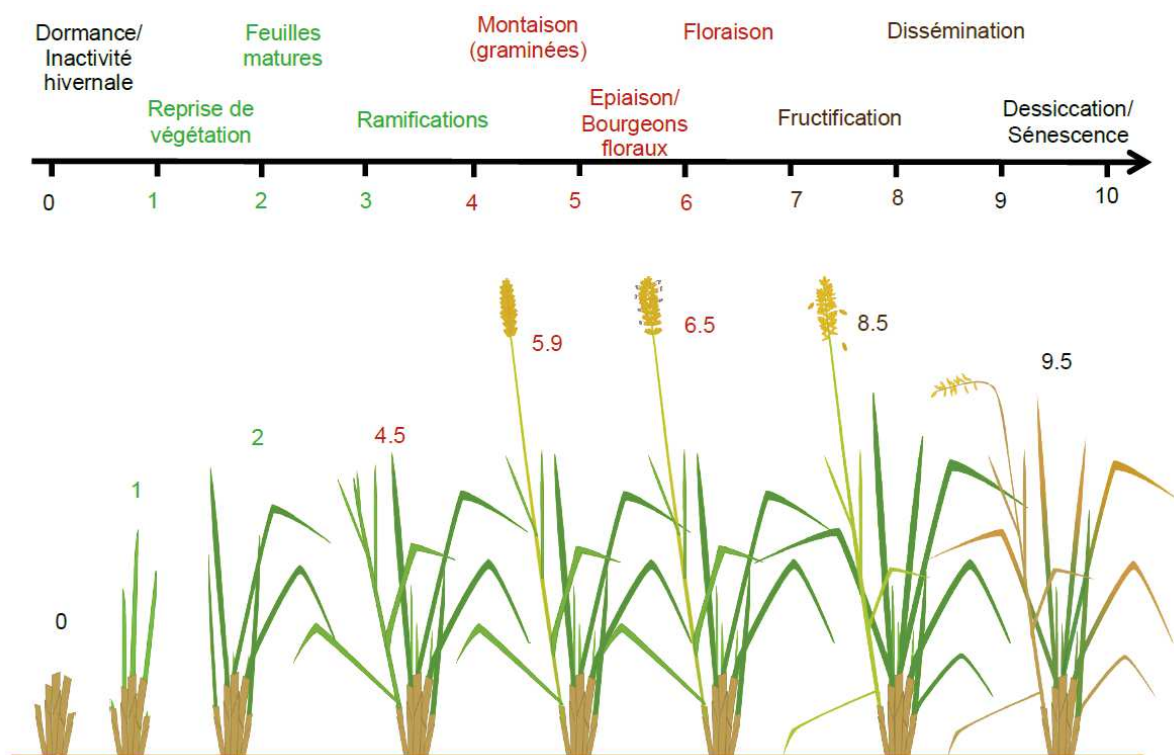


FIGURE 4 | Illustration des stades phénologiques selon l'échelle BBCH pour une espèce fictive de poacée pérenne. Se rapporter au tableau 2 pour plus de détails sur la signification des graduations. Les nombres décimaux représentent l'avancée de chaque stade (par exemple, 5.9 décrit la fin de l'épiaison, 6.5 le pic de floraison). Tiré de Bernard-Verdier (2012).

Les suivis phénologiques décrivant l'ensemble du cycle pour une large gamme d'espèces sont relativement rares. Ils impliquent un nombre important de mesures sur les mêmes individus (ou populations) et à une fréquence suffisamment fine pour ne pas manquer de stade et détecter les différences entre espèces. De plus certains stades, comme le développement des fruits (BBCH stade 7, Tableau 2), sont difficilement détectables par l'observation car la plupart des espèces gardent leurs parties florales au début de la formation du fruit et la maturation des graines peut prendre jusqu'à plusieurs années (*ex. Juniperus sp.*). Des graines produites à des années différentes peuvent alors coexister sur les plants adultes ce qui complique fortement le suivi de la maturation. En forêt, les suivis phénologiques sont complexifiés par un accès souvent impossible à la canopée. Ainsi, seuls quelques stades clés

(majoritairement le débourrement, la floraison et la chute des feuilles) ont été reportés pour une large gamme d'espèces (NECTAR database 2012).

Contrairement aux traits couramment utilisés dans les études comparatives (voir Pérez-Harguindeguy *et al.* 2013), il n'existe pas de protocole standard pour la mesure des traits phénologiques. Nous soulevons ici trois points méthodologiques critiques non résolus : (1) la phénologie peut être suivie à différents niveaux d'organisation : il est possible de caractériser les stades de développement au niveau de la population (groupe d'individus d'une même espèce), de l'individu ou de chaque organe (en suivant le devenir de chaque fleur par exemple) ; (2) les stades de développement ne sont généralement pas des événements ponctuels mais peuvent être décrits par des dynamiques temporelles. Par exemple, la floraison d'un individu peut être décrite par la date d'apparition de la première fleur, le pic de floraison, la durée de la floraison ou encore l'asymétrie de la production de fleurs, et (3) l'unité d'expression des données phénologiques est souvent problématique. Traditionnellement, les données de phénologie sont exprimées en dates calendaires ou en jours de l'année à partir du premier janvier. Cependant, ces unités ne prennent pas en compte le décalage des saisons entre l'hémisphère nord et l'hémisphère sud. On peut donc envisager une unité qui décrit la phénologie en relation avec les saisons et non à partir de la date arbitraire du premier janvier. Par exemple, la date du solstice d'hiver (21 décembre dans l'hémisphère nord et 21 juin dans l'hémisphère sud) est un repère qui a une signification écologique similaire dans tous les climats tempérés. De plus, des résultats initialement issus des sciences agronomiques, ont permis de développer des unités phénologiques comme les degrés jours de croissance, ou encore les unités photothermiques, basés sur la relation positive entre la température et les rythmes de développement des plantes (Bonhomme 2000). Les degrés jours de croissances sont une somme des températures journalières comprises entre une température de base (température à partir de laquelle la plante commence à croître) et une température maximale (température à partir de laquelle la croissance cesse) pendant les phases de développement (Bonhomme 2000). Les unités photothermiques sont une variante des degrés jours de croissance et pondèrent les températures journalières par la durée du jour. Ces indices sont utilisés pour prédire la date de récolte des espèces céréalières à partir des caractéristiques des géotypes et de mesures climatiques locales. L'expression des dates phénologiques en degrés jours de croissance, plutôt qu'en jours, permet une meilleure répétabilité des mesures puisqu'elle permet de prendre en compte en partie les variations interannuelles du climat. Selon la question de recherche, l'unité d'expression la plus pertinente peut donc varier : une

expression en jours semble être la plus pertinente pour étudier l'effet du changement climatique sur la phénologie des espèces alors qu'une expression en degrés jours de croissance permet de comparer les cycles phénologiques d'une large gamme d'espèces provenant de sites différents.

Globalement, chaque étude possède son propre protocole de mesure en raison de contraintes spécifiques au système d'étude et sa question de recherche, contribuant à la difficulté de réaliser des synthèses de données phénologiques à large échelle.

2.1.2 Les facteurs de contrôle de la phénologie

La phénologie est à l'interface entre plusieurs disciplines puisque son étude nécessite la prise en compte de facteurs climatiques et de processus physiologiques et développementaux. La plupart des études menées sur la phénologie des plantes concerne l'effet du climat et de ses variations spatiales et temporelles sur le déroulement des stades de développement. Ainsi, il a été mis en évidence que la photopériode, la température ou encore la disponibilité en eau affectaient les dates auxquelles les végétaux débourrent, fleurissent ou perdent leur feuilles (Rathcke & Lacey 1985; Fenner 1998). La prédictibilité de la phénologie des plantes augmente alors avec la saisonnalité du climat : dans les milieux tempérés, l'activité des plantes est limitée aux périodes hors gel et hors déficit hydrique (Pau *et al.* 2011). Dans les milieux tropicaux, bien que les arbres fleurissent tout au long de l'année en climat non saisonnier, et sans qu'il soit possible de prédire la durée et l'intensité de la floraison, les espèces ont généralement une floraison synchronisée avec la saison sèche dans les climats où la disponibilité en eau fluctue au cours de l'année (van Schaik, Terborgh & Wright 1993; Sakai 2001). Le climat agit donc comme un filtre sur les traits phénologiques et définit la saison de croissance potentielle d'un site.

Les bases physiologiques à l'origine de la synchronisation du développement des plantes aux périodes favorables sont relativement bien connues. De nombreuses espèces utilisent la photopériode et la température comme déclencheurs du démarrage de l'activité végétative ou de la chute des feuilles. Pour certaines espèces, l'exposition à de faibles températures pendant l'hiver peut contrôler le démarrage de l'activité végétative. Par exemple, plusieurs jours de froid sont nécessaires à la levée de la dormance des bourgeons chez *Betula pendula* (Myking & Heide 1995) ou à la stratification des graines chez *Arabidopsis thaliana* (Holdsworth, Bentsink & Soppe 2008). Ainsi, des modèles ont été développés sur la base de processus physiologiques pour prédire les cycles phénologiques des espèces selon différents scénarios

climatiques (Chuine 2010). La performance des espèces peut alors être prédite dans différents environnements afin d'estimer leur niche écologique et de modéliser leurs aires de répartition actuelles et futures en réponse aux changements climatiques. Cependant, ces modèles nécessitent des calibrations importantes et n'ont été paramétrés que pour un nombre limité d'espèces, majoritairement arbustives.

Au sein de la saison de croissance, d'autres niveaux de contrainte opèrent pouvant mener à des différences de phénologie entre espèces :

(1) La forme de croissance est un premier facteur de différenciation. En climat tempéré, la plupart des arbres décidus fleurissent en premier, avant le débourrement des feuilles, grâce à l'initiation des bourgeons floraux l'année précédente et un stockage important de ressources. Cette stratégie permet de maximiser la visibilité des fleurs pour les pollinisateurs et de minimiser les obstacles au flux de pollen (Grainger 1939). Chez les plantes herbacées, on observe généralement des différences claires entre la phénologie des plantes à bulbe et à rhizome (géophytes) et celle des plantes qui ne possèdent pas d'organe de stockage spécifique (thérophytes et hémicryptophytes). Les géophytes ont une phénologie reproductive bimodale, avec des espèces à floraison précoce en début de printemps et des espèces à floraison tardive en automne, alors que les thérophytes et hémicryptophytes ont généralement une floraison unimodale, au moment du pic de disponibilité des ressources (Grainger 1939).

(2) au-delà des formes de croissance, il ne semble pas y avoir d'effet systématique du cycle de vie sur la phénologie : les herbacées annuelles (thérophytes) et pérennes (hémicryptophytes) fleurissent pendant les mêmes périodes en climats tempérés (Grainger 1939; Heydel & Tackenberg 2017) et dans les savanes tropicales (Sarmiento & Monasterio 1983). En climat méditerranéen les espèces annuelles fleurissent avant les pérennes (Jackson & Roy 1986; Petanidou *et al.* 1995) et l'inverse est trouvé dans les prairies du Konza, au centre des États-Unis (Craine *et al.* 2012).

(3) enfin, l'histoire évolutive joue également un rôle majeur dans l'explication des différences phénologiques entre espèces. Plusieurs études ont montré que les espèces appartenant à la même famille botanique ont des cycles phénologiques similaires (Kochmer & Handel 1986; Johnson 1992) et une analyse plus récente montre un fort signal phylogénétique sur la date de débourrement et la date de floraison pour près de 200 et 4 000 espèces respectivement (Davies *et al.* 2013). Les espèces proches dans la phylogénie expriment donc

des cycles phénologiques proches traduisant une forte héritabilité des contraintes développementales et physiologiques. On connaît chez *A. thaliana* les gènes mis en jeux dans le déclenchement de la floraison ainsi que les processus physiologiques qui contrôlent leur expression. Par exemple, l'allongement des jours ou encore l'augmentation de la température ambiante engendrent une cascade d'activation de gènes qui provoque la transition de la phase végétative vers la phase reproductive (Wilczek *et al.* 2010). Il semblerait que ces voies génétiques soient généralisables à l'ensemble des plantes et que l'on puisse identifier des gènes orthologues à ceux connus chez *A. thaliana* même en profondeur dans la phylogénie. C'est notamment le cas des gènes impliqués dans la sensibilité à la photopériode que l'on peut retrouver chez les gymnospermes et les bryophytes (Wilczek *et al.* 2010).

2.1.3 La phénologie dans le contexte du cycle de vie

Étonnamment, la phénologie est rarement étudiée dans le contexte du cycle de vie des espèces (Forrest & Miller-Rushing 2010; Ehrlén 2015). On s'intéresse généralement à la synchronisation entre chaque stade de développement et des composantes climatiques ou biotiques sans considérer le cycle de vie dans sa globalité. Or, les phases de développement (croissance des organes végétatifs, floraison, maturation puis dispersion des graines) se suivent généralement selon une séquence temporelle (Grainger 1939) et un certain degré de coordination entre ces phases peut être attendu. Par exemple, la production de graines dépend complètement du succès de la floraison. La temporalité de la maturation des graines, puis de leur dispersion peut donc être indirectement influencée par des contraintes spécifiques à la floraison (Ehrlén 2015). La question formulée par Rathcke and Lacey (1985) reste peu élucidée : « Les événements phénologiques se suivent-ils selon des intervalles de temps réguliers, ou sont-ils contrôlés indépendamment par différents signaux environnementaux ? ». Autrement dit, le programme développemental des espèces est-il suffisamment souple pour permettre un découplage de la temporalité des stades de développement et exprimer le phénotype optimal en réponse aux conditions environnementales ?

La floraison et la dispersion des graines sont généralement soumises à des pressions de sélection différentes (synchronisation avec la présence des pollinisateurs et des agents de dispersion, différences de sensibilité aux pathogènes ou aux risques climatiques, etc...) mais leur éventuelle coordination peut empêcher l'expression du phénotype le plus adapté (Ehrlén 2015). Dans le cas d'une forte coordination entre ces phases, la sélection n'agit pas sur chaque stade indépendamment mais sur l'ensemble des phases de la reproduction. La prise en compte

du niveau de coordination entre les phases permettrait donc d'expliquer des décalages potentiels entre les dates optimales pour chaque stade et les observations, typiquement dans le cas de l'étude des adaptations aux changements climatiques. Slade, Horton and Mooney (1975) ont montré que les stades de développement de sept espèces annuelles de Californie sont mieux prédits par la date du stade précédent que par un évènement climatique particulier suggérant une forte contrainte développementale chez ces espèces. Par ailleurs, Sun et Frelich (2011) ont montré que la date de floraison de 25 espèces herbacées dicotylédones peut être prédite par leur vitesse de croissance végétative. Enfin, une forte corrélation entre la date de floraison et la date de dispersion des graines est observée chez les plantes herbacées des régions tempérées (revue dans Garnier, Navas & Grigulis 2016). Ces résultats suggèrent une forte contrainte développementale sur la phénologie des espèces herbacées et Diggle (1999) propose de prédire les cycles phénologiques, et en particulier la date de floraison des espèces, uniquement sur la base du programme développemental des plantes à partir de trois composantes : (1) la date de démarrage de végétation, (2) le rythme de développement végétatif et (3) le stade de développement au passage à la reproduction. Ce modèle ne prend en compte ni les signaux environnementaux, ni les interactions biotiques.

En revanche, Wheelwright (1985) trouve un découplage entre la durée de la floraison et la durée de la dispersion des graines chez 22 espèces de Lauracées de forêt tropicale du Costa Rica : des fruits produits à partir de fleurs ouvertes au même moment se développent à des rythmes différents et certaines espèces ont des périodes de floraison brèves associées à des périodes de dispersion des graines longues. Ainsi, il est considéré que le programme développemental des arbres tropicaux est suffisamment souple pour découpler la floraison et la dispersion des graines (van Schaik, Terborgh & Wright 1993) permettant une meilleure adaptation aux contraintes spécifiques à chacun de ces stades (présence du pollinisateur pour la floraison et période de mousson pour la dispersion des graines par exemple). Les facteurs biologiques à l'origine de ces différences de contraintes développementales sur le cycle phénologique des espèces sont encore mal connus.

Les parts relatives du programme développemental et des facteurs environnementaux dans l'expression du cycle phénologique des plantes ont un impact majeur dans la description d'un axe de variation fonctionnelle. Dans un premier cas, l'ensemble du cycle phénologique peut être prédit par la mesure de quelques caractéristiques de plantes (démarrage de l'activité végétative, vitesse de croissance, etc..) permettant de définir clairement un axe de variation fonctionnelle pour la phénologie. Dans un second cas, la phénologie est contrôlée par des

facteurs environnementaux spécifiques à chaque espèce ne permettant pas de décrire de manière synthétique les combinaisons phénologiques.

2.1.4 Relations entre la phénologie et les autres dimensions du fonctionnement des plantes

Les relations entre la phénologie et les autres dimensions du fonctionnement des plantes sont encore mal connues. En effet, l'approche comparative a largement ignoré la phénologie dans ses tentatives de description du phénotype à large échelle (Wolkovich & Ettinger 2014). Quelques hypothèses de relations entre la phénologie et les traits du phénotype plus couramment utilisés ont cependant été formulées, mais rarement testées. Une revue exhaustive de la bibliographie (Tableau 3) illustre cette affirmation : la plupart des études à ce sujet décrivent uniquement la phénologie de la reproduction, en particulier la date de floraison, et montrent des patrons de corrélations plus ou moins robustes selon les traits considérés.

TABLEAU 3 | Relations entre les traits de la phénologie de la reproduction et d'autres traits de la plante trouvées dans plusieurs études. ↗ et ↘ représentent respectivement une relation positive ou négative entre les traits considérés, alors ↔ indique une relation testée mais non significative. Chaque flèche est basée sur un nombre différent d'études spécifié entre parenthèses. (↗) indique qu'une relation positive est attendue mais qu'elle n'a pas encore été testée. Les cellules vides indiquent que la relation n'a pas été testée à notre connaissance. Ce tableau est construit à partir de Wolkovich and Cleland (2014), prenant en compte les résultats de Mooney *et al.* (1986); Primack (1987); Chiariello (1989); Mazer (1989); Eriksson and Ehrlén (1991); Smith-Ramírez, Armesto and Figueroa (1998); Moles and Westoby (2003); Louault *et al.* (2005); Vile, Shipley and Garnier (2006); Bolmgren and Cowan (2008); Ansquer *et al.* (2009); Duru *et al.* (2009); Du and Qi (2010); Laughlin *et al.* (2010); Jia *et al.* (2011); Sun and Frelich (2011); Catorci *et al.* (2012); Craine *et al.* (2012); Heydel and Tackenberg (2017).

	Hauteur reproductive	Surface d'une feuille	Masse d'une graine	Masse surfacique foliaire	Teneur en matière sèche des feuilles	Concentration en azote des feuilles
Date de floraison	↗ ₍₉₎	↔ ₍₁₎	↘ ₍₆₎ ou ↗ ₍₂₎ ou ↔ ₍₁₎	↔ ₍₄₎	↗ ₍₄₎ ou ↔ ₍₁₎	↘ ₍₁₎ ou ↔ ₍₁₎
Date de dispersion	(↗)				↗ ₍₁₎	
Période maturation d'une graine			↗ ₍₄₎			

L'étude de la coordination des différentes phases phénologiques et de leurs relations avec différents types de traits seront des points importants traités lors de ce travail de thèse.

2.2 La défense chez les végétaux

Les espèces végétales sont contraintes par leur nature fixée. Contrairement à la plupart des animaux, elles ne peuvent pas fuir face aux prédateurs et ont développé des mécanismes de défense face aux herbivores. De même, elles ne peuvent pas réaliser de grandes migrations pour traquer les conditions environnementales favorables et doivent faire face à la saisonnalité du climat dans les climats tempérés. Il existe différentes stratégies de réponse aux attaques biotiques et abiotiques qui entraînent des différences dans l'investissement pour la défense entre les espèces. En effet, certaines espèces investissent peu dans les défenses mais vont plutôt (1) **tolérer** la prédation en compensant les pertes de biomasse par une forte croissance végétative ou (2) **échapper** à la prédation grâce à leur forme de vie ou leur phénologie. À l'opposé, certaines espèces vont (3) **investir dans la défense** et vont mettre en place différents mécanismes de défense directs (en diminuant leur qualité pour leur consommation) ou indirects (en diminuant leur qualité d'accueil pour les herbivores) (Boege & Marquis 2005). Enfin, des stratégies similaires à celles décrites pour la réponse à l'herbivorie ont été mises en évidence en réponse à des contraintes mécaniques imposées par l'environnement (Puijalon *et al.* 2011).

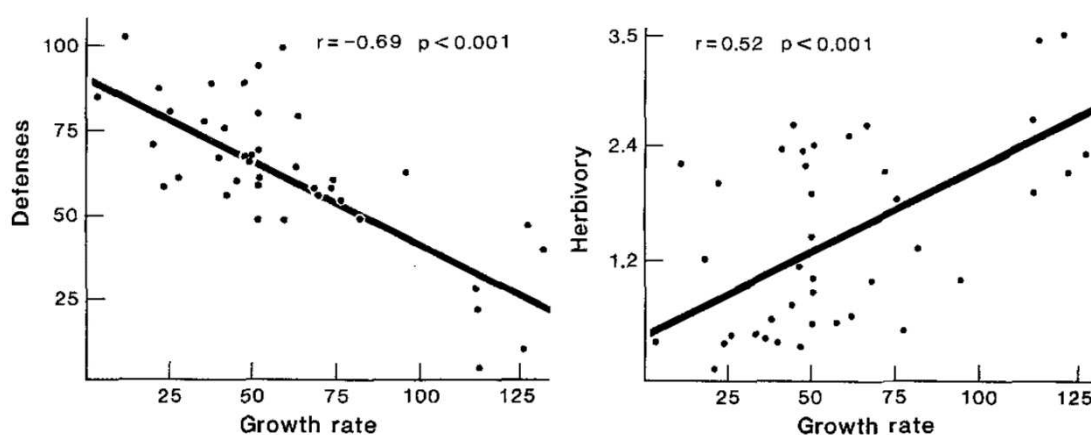


FIGURE 5 | Herbivorie et défense en fonction de la croissance en hauteur (cm.an-1) pour des espèces arbustives sur l'île du Barro Colorado, Panama (n=41). La défense est une combinaison linéaire de défenses, incluant des mesures de fibres, tanins, résistance et pubescence (unités arbitraires). L'herbivorie est calculée à partir du log de la moyenne annuelle du taux de consommation des feuilles pour chaque espèce [$\ln(1000 * \% \text{feuille mangée par jour} + 1)$] (extrait de Coley 1988).

On considère généralement que l'investissement dans la défense représente un coût pour la plante, qui se répercute notamment sur la croissance. Cette idée est issue de travaux de Coley (1988) montrant une série de corrélations entre la vitesse de croissance, l'investissement dans la défense et le taux d'herbivorie sur 41 espèces d'arbres tropicaux (Fig. 5). Cependant, cette idée a été peu testée jusqu'à présent notamment pour des raisons méthodologiques. En effet, les traits associés à la défense sont nombreux et complexes et les corrélations entre ces traits sont encore mal connues (Moles *et al.* 2013). Les parties suivantes détaillent les différents mécanismes de défense chez les plantes ainsi que leur impact sur le fonctionnement de la plante.

2.2.1 Les stratégies de défense chez les plantes

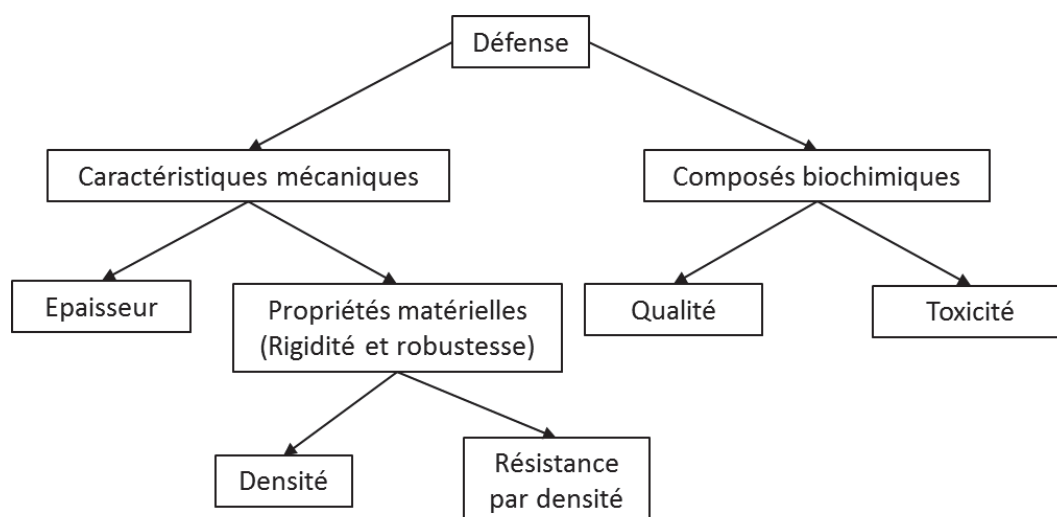


FIGURE 6 | Décomposition des mécanismes de défense chez les végétaux.

Dans le cas d'un investissement dans la défense, on considère généralement en deux catégories de mécanismes (Briske 1996) : (1) les caractéristiques mécaniques et (2) les composés biochimiques (Fig. 6). À l'échelle de la feuille, Choong (1996) remarque que la défense se fait essentiellement via la résistance mécanique et plus particulièrement via la nervation. En effet, cette dernière est associée à des tissus dont les cellules ont des parois épaisses et donc riches en fibres (cellulose, hémicellulose et lignine). Les parois des cellules photosynthétiques, quant à elles, doivent conserver une épaisseur plus faible afin de ne pas limiter les apports énergétiques lumineux et possèdent donc une résistance mécanique plus limitée. Kitajima and Poorter (2010) confirment ces observations en montrant qu'il existe un facteur d'ordre 10 entre la résistance du tissu du limbe et les nervures. Choong (1996) identifie également une localisation spécifique des tanins dans les cellules du parenchyme. Il conclut alors que la défense chimique se limiterait aux régions qui ne peuvent pas bénéficier

de renforcement mécanique suggérant que ce type de défense représente un coût plus élevé pour la plante. Une seconde validation de cette observation est faite par Coley and Barone (1996) qui montrent que les défenses biochimiques sont localisées dans les organes en croissance et qui ne peuvent donc pas bénéficier d'une défense mécanique efficace. Hanley *et al.* (2007) montrent que dans la plupart des cas, les plantes ont de fortes concentrations de composés toxiques aux stades plantules et au début de la vie des feuilles jusqu'à ce que les défenses mécaniques se mettent en place.

2.2.1.1 Propriétés mécaniques

Il existe deux types de stratégies mécaniques pour lutter contre les attaques extérieures : la rigidité et la robustesse (Lucas *et al.* 2000). La rigidité correspond à une stratégie de limitation du stress mécanique. Elle consiste à procurer une rigidité telle que la pression nécessaire pour infliger une déformation (ou un stress mécanique) soit supérieure à celle que peut fournir le prédateur. On peut comparer cette propriété à celle du verre qui est très rigide mais qui se rompt en plusieurs morceaux dès que la force de résistance maximale est atteinte. La robustesse quant à elle correspond à une stratégie de défense de limitation du déplacement. Elle consiste à limiter la propagation de blessures à travers les tissus. On peut comparer cette propriété à celle d'un steak de viande dans lequel on mord. On arrive assez facilement à créer des blessures mais il est difficile d'arracher un morceau. Cette propriété est généralement associée à une élasticité importante des tissus.

Cependant, baser sa défense sur la rigidité impose une densité des tissus très élevée et une maximisation de l'épaisseur des parois cellulaires qui limite, voire élimine, l'espace intracellulaire (Lucas *et al.* 2000). Cette stratégie est donc généralement réservée aux organes de défense morts, situés à l'extérieur des tissus, comme les épines ou les poils. Ainsi, les bois les plus rigides (avec un volume intracellulaire réduit de 90%) résistent à une pression mécanique de 300 MPa (ce qui est proche de la limite physiologique constructible à partir de fibres végétales) alors que les dentitions des vertébrés sont capables de fournir une pression jusqu'à 3 500 MPa. Afin d'augmenter leur rigidité et de pallier aux limites physiologiques, les épines et les poils contiennent généralement la silice pour atteindre une résistance pouvant aller jusqu'à 5 000 MPa (Lucas *et al.* 2000). Cette stratégie semble donc insuffisante, à l'échelle de la plante entière, pour se protéger efficacement contre les herbivores puisque tous les organes ne peuvent en bénéficier si l'on considère les autres fonctions qu'ils doivent remplir (transport d'eau et de sève, activité photosynthétique, etc...).

La stratégie de robustesse est donc la plus commune à l'échelle de la plante entière. Elle est le résultat de la structuration des parois cellulaires qui confère, en plus d'un module élastique élevé, un effet de synergie entre les fibres (notamment entre les fibres de cellulose d'après Lucas *et al.* 2000 alors que la lignine conférerait la rigidité) qui renforce l'ensemble de la structure et limite la propagation des imperfections ou des blessures. Au niveau des feuilles, la nervation semble également jouer un rôle important (Roth-Nebelsick *et al.* 2001; Sack & Scoffoni 2013). En effet, les tissus vasculaires ont des cellules dotées d'une paroi secondaire riche en lignine et suber qui augmente leur rigidité. La nervation forme alors une hétérogénéité de tissus aux propriétés mécaniques différentes qui rend la propagation des ruptures à travers la feuille plus difficile. Les différences de résistances des feuilles entre espèces sont donc en partie expliquées par leur différence de nervation.

Plusieurs études ont montré que la robustesse du limbe (hors nervures) varie également entre espèces (Westbrook *et al.* 2011; Kitajima *et al.* 2012; Méndez-Alonzo, Ewers & Sack 2013). Cette variation peut être expliquée par la mise en place de tissus de soutien (sclérenchyme) et par la lignification et/ou subérification des épidermes et cuticules. Le limbe peut alors être vu comme une structure en sandwich de tissus parenchymeux fragiles entre deux couches, plus ou moins rigides selon les espèces. On sait également que les propriétés mécaniques des différents tissus et organes (parenchymes, nervures et tiges) sont corrélées positivement entre elles (Kitajima & Poorter 2010; Westbrook *et al.* 2011; Méndez-Alonzo, Ewers & Sack 2013). L'investissement dans la défense semble donc être assez homogène au niveau de la plante entière et au sein des tissus.

À l'échelle de la feuille, on peut dissocier la résistance mécanique en deux composantes : l'épaisseur et les propriétés matérielles (Fig. 6). En effet, à propriétés matérielles égales (composition, densité, etc...), il peut exister des différences de résistance uniquement liées à l'épaisseur de ce matériel. Inversement, il peut exister pour des feuilles de même épaisseur des différences de résistance liées à des propriétés mécaniques différentes. Il semble il y avoir aujourd'hui un consensus sur le fait que ce sont les propriétés matérielles, et non structurelles, qui jouent un rôle dans les différences de résistance entre espèces (Méndez-Alonzo, Ewers & Sack 2013; Sack & Scoffoni 2013). Une explication proposée serait que la gamme de variation des propriétés matérielles est largement supérieure à celle de l'épaisseur des feuilles entre espèces (Onoda *et al.* 2011). Ainsi, l'effet de l'épaisseur de la feuille sur les propriétés mécaniques de celles-ci a rarement été mis en évidence lors de comparaisons interspécifiques. Ces effets deviennent cependant significatifs dans les comparaisons intraspécifiques lorsque

les gammes de variation de propriétés matérielles sont réduites (Méndez-Alonzo, Ewers & Sack 2013).

Enfin, Onoda *et al.* (2011) proposent de décomposer les propriétés matérielles en deux composantes : la densité du matériel et la résistance par unité de densité. Le facteur de densité est alors uniquement lié à la composition chimique des tissus (teneurs en fibres) alors que le facteur de résistance par unité de densité est lié à l'agencement spatial des fibres et à leur effet de synergie. Ainsi, à épaisseur égale et à densité de matériel égale, il peut exister des différences de résistance mécanique liées à l'agencement des fibres (résistance par unité de densité) et inversement, à épaisseur égale et à résistance par unité de densité égale, il peut exister des différences entre espèces liées à des différences de densité (via l'augmentation de l'épaisseur des parois).

La résistance mécanique des plantes est donc le résultat d'une combinaison de tissus rigides et/ou robustes eux-mêmes issus d'une interaction entre leur composition chimique et l'agencement des fibres au sein de leurs parois cellulaires. L'épaisseur des organes quant à elle, ne semble pas jouer de rôle fondamental dans l'explication des différences de résistance mécanique entre espèces. La nervation semble jouer un rôle important dans ces propriétés bien qu'elle ne soit pas le seul facteur explicatif. Cependant, (Roth-Nebelsick *et al.* 2001) rappellent que les tissus vasculaires jouent d'autres rôles dans le fonctionnement de la plante (notamment le transport d'eau) et que leurs propriétés ne peuvent être expliquées uniquement d'un point de vue biomécanique.

2.2.1.2 Composés biochimiques

La défense via les composés biochimiques peut être caractérisée par une diminution de la qualité de la plante pour les herbivores, notamment via une augmentation de la cellulose qui diminue la digestibilité (Hanley *et al.* 2007) ou par la production de composés toxiques. Pour cette dernière, il existe une grande variabilité de composés produits par les plantes (les phénols - dont font partie les tanins - les cyanures, les alcaloïdes, etc...) et leur concentration varie en fonction de l'âge de la plante et des tissus. Il est donc très difficile de caractériser les défenses chimiques d'une plante puisqu'elles peuvent varier en terme de composition par rapport aux autres espèces mais également au cours du temps (Hanley *et al.* 2007). Il n'existe pour l'instant aucune mesure simple qui permette de comparer toutes les espèces entre elles sur la base de leurs défenses chimiques.

2.2.2 Caractériser la défense par les traits

Coley, Bryant and Chapin (1985) montrent qu'il existe une relation positive entre la durée de vie des feuilles et la quantité de carbone allouée à la défense. Il s'agit d'hypothèses, postulées par Chabot and Hicks (1982) puis testées par la suite selon lesquelles les plantes dont la durée de vie des feuilles est longue doivent mettre en place une défense plus efficace contre les attaques biotiques et abiotiques que celles à durée de vie des feuilles plus courte (Coley, Bryant & Chapin 1985; Southwood, Brown & Reader 1986; Coley 1988; Wright & Cannon 2001). La durée de vie des feuilles serait donc un trait synthétique qui permettrait d'avoir une estimation globale de l'investissement de la plante dans la défense. Afin de caractériser la défense de manière plus directe, certains auteurs utilisent des index ou des variables composites à partir de plusieurs traits (Coley 1988; Moles *et al.* 2013).

Dans un souci de simplicité, la plupart des études s'intéressent à un nombre restreint de traits qui couvrent souvent un seul type de défense (mécanique ou chimique). Pour la défense mécanique, les mesures plus courantes sont des mesures de résistance des feuilles. Trois types de mesures existent et sont décrites dans une synthèse proposée par Onoda *et al.* (2011) : (1) la résistance à la coupe, qui permet d'estimer la robustesse (travail par unité de longueur) et la robustesse spécifique (travail par unité de surface et de densité – corrigé par l'épaisseur et la densité de la feuille), (2) la force à l'étirement, qui est sans doute l'un des traits les plus utilisés dans la littérature et qui permet de mesurer le module élastique longitudinal de la feuille ou sa robustesse et sa robustesse spécifique en fonction du protocole utilisé (création ou non d'une entaille à la marge de la feuille testée) et enfin (3) la force à la perforation qui permet d'estimer la rigidité du limbe (par unité de surface d'application de la force).

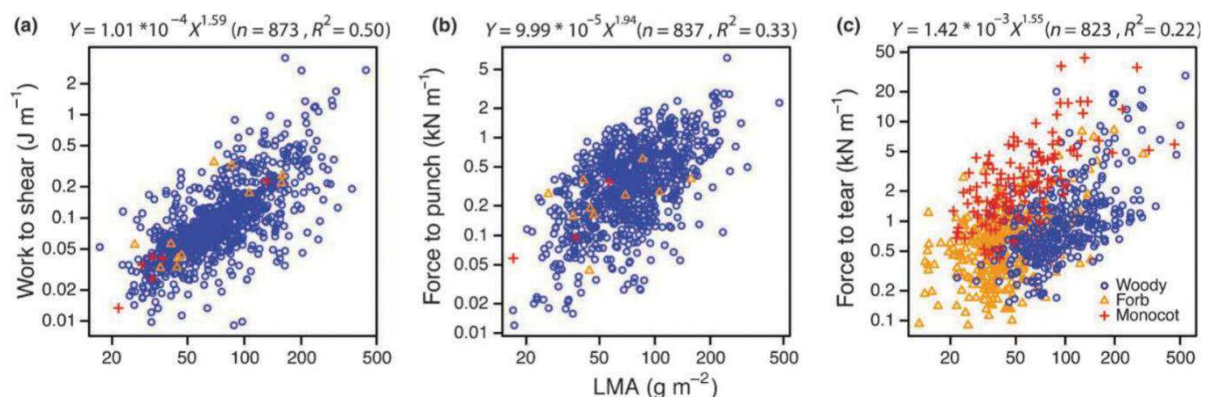


FIGURE 7 | Relations entre la masse surfacique foliaire (LMA) et (a) la résistance à la coupe (work to shear), (b) la force à la perforation (Force to punch) et (c) la force à l'étirement (force to tear). Le nombre d'espèces, ainsi que le R^2 des relations sont mentionnés sur chaque panneau. Tiré de Onoda *et al.* (2011).

Dans leur revues, Hanley *et al.* (2007) et Onoda *et al.* (2011) notent que la masse surfacique foliaire (MSF, masse sèche d'une feuille divisée par sa surface) est un trait largement connu comme étant corrélé à la défense (exprimée par la palatabilité ou le taux d'herbivorie mais aussi par les traits de résistance mécanique, Fig. 7). Comme la surface d'une feuille peut être exprimée comme le rapport entre son volume (V) et son épaisseur (E). On peut donc exprimer la MSF comme le produit de la densité (ρ) et de l'épaisseur (E) de la feuille qui ont été identifiés comme des composantes importantes de propriétés biomécaniques de feuilles :

$$MSF = \frac{M}{A} = \frac{M}{V} * E = \rho * E$$

Étonnamment, peu d'études utilisent la teneur en matière sèche des feuilles (TMSF par la suite) pour caractériser la défense. La TMSF est le rapport entre la masse sèche (Ms) d'une feuille et sa masse fraîche (Mf). Or, la masse fraîche d'une feuille est un bon estimateur de son volume (Vf) (Vile *et al.* 2005) ce qui permet d'utiliser la TMSF comme estimateur de la densité de la feuille ($\rho = \frac{Ms}{Vf}$).

$$TMSF = \frac{Ms}{Mf} \approx \frac{Ms}{Vf} = \rho$$

Une autre manière d'estimer la densité des tissus passe par la mesure de teneurs en fibres. Après une calibration grâce à des méthodes chimiques (Van Soest, Robertson & Lewis 1991), ces teneurs peuvent être estimées à partir de la spectroscopie proche infrarouge. Trois teneurs sont alors estimées : le NDF qui correspond au taux d'hémicellulose, cellulose et lignine, l'ADF qui correspond au taux de cellulose et lignine et l'ADL qui correspond au taux de lignine. Ces traits sont positivement corrélés entre eux et sont souvent associés à la palatabilité et la digestibilité.

Aussi, partant du constat que les nervures des feuilles expliquent largement les propriétés mécaniques des feuilles, certains auteurs utilisent la densité en nervures ou encore la distance moyenne entre deux nervures (Sack & Scoffoni 2013) pour estimer la résistance.

Bien que cela soit plus complexe, la défense via les composés biochimiques peut être mesurée en partie par les teneurs en polyphénols et en tanins. Des études ont inclus ces traits dans leurs analyses pour compléter leur index de défense (Coley & Barone 1996) ou ont mis en évidence un effet de ces teneurs sur la palatabilité (Wardle, Bonner & Barker 2002).

2.2.3 Relations entre la défense et les autres dimensions du fonctionnement des plantes

La défense est généralement étudiée dans le cadre du compromis d'allocation des ressources entre la croissance et la défense (Coley, Bryant & Chapin 1985; Briske 1996; Coley & Barone 1996). Or, la durée de vie des feuilles, qui est un trait central dans la description de l'investissement dans la défense, est également impliquée dans le syndrome d'économie foliaire. Cet axe de variation fonctionnelle décrit la gestion des ressources au niveau foliaire à travers un compromis acquisition-conservation illustré par la relation négative entre vitesse de photosynthèse et durée de vie des feuilles (voir section 1.1, Wright *et al.* 2004).

Les connexions entre la défense et le syndrome d'économie foliaire sont encore mal connues. Comme mentionné précédemment, un investissement dans la défense est généralement associé à une MSF plus élevée et une durée de vie des feuilles plus longue. La défense est donc clairement associée à la stratégie de conservation des ressources. L'effet de la défense mécanique sur la durée de vie des feuilles n'a cependant été mis en évidence que pour les arbres et doit être confirmé pour d'autres formes de croissance. Certains auteurs ont proposé d'aller plus loin et de considérer que la défense est à l'origine du compromis entre acquisition et conservation des ressources (Shipley *et al.* 2006). La défense mécanique impacterait positivement la durée de vie des feuilles mais négativement la capacité photosynthétique, par son effet sur l'épaisseur de la feuille et des parois cellulaires. Cependant, les relations avec l'acquisition des ressources ont rarement été testées ne permettant pas de valider cette hypothèse. De plus, on ne sait pas comment les différents types de défense impactent le syndrome d'économie foliaire et un investissement dans la défense chimique permettrait d'augmenter la durée de vie des feuilles sans affecter nécessairement la capacité photosynthétique.

3 OBJECTIFS ET STRUCTURE DE LA THÈSE

Au cours de ce travail de thèse, nous avons caractérisé des espèces végétales, majoritairement herbacées, se développant dans un contexte climatique méditerranéen du sud de la France pour répondre à quatre questions principales :

- (1) Comment est distribuée la phénologie de la reproduction des espèces végétales en relation avec les conditions climatiques locales ?
- (2) Existe-t-il une coordination entre les phases de la phénologie permettant la description d'un axe de variation phénologique ?
- (3) Comment la phénologie de la reproduction s'articule-t-elle avec les autres dimensions du fonctionnement des plantes ?
- (4) Quelles sont les relations entre la défense mécanique et le syndrome d'économie foliaire.

Ce projet s'appuie à la fois sur une démarche expérimentale basée sur la mesure de plusieurs traits utilisés comme marqueurs fonctionnels de la phénologie et de la défense, mais aussi sur une synthèse scientifique (sensu Hampton & Parker 2011) compilant et analysant les données de plusieurs expérimentations indépendantes menées avant la thèse.

Le manuscrit de thèse est organisé autour de quatre articles scientifiques dont les trois premiers traitent de la phénologie et le quatrième de la défense des plantes. Nous proposons d'étudier les stratégies phénologiques d'espèces végétales dans le contexte méditerranéen. Ainsi, plusieurs traits sont utilisés pour décrire la temporalité des stades de développement de manière détaillée. Les gammes de variation de ces traits sont alors mises en relation avec les conditions environnementales locales (chapitre 2), puis les coordinations entre les phases phénologiques sont testées dans le but d'identifier un axe de variation fonctionnelle (chapitres 2 et 3). Nous testons ensuite les relations entre les stratégies phénologiques et d'autres axes de variation fonctionnelle afin d'estimer l'importance de cet axe dans la dimensionnalité du phénotype (chapitre 4). Puis, nous avons caractérisé les propriétés mécaniques de feuilles de 23 espèces à partir de différentes mesures biomécaniques, de traits morpho-anatomiques et de traits de composition chimique des feuilles. Ces traits ont été mis en relation avec les traits du syndrome d'économie foliaire afin de tester les connexions entre la défense et la gestion des ressources (chapitre 5). Enfin, une analyse complète teste simultanément l'apport de ces deux dimensions dans la description du phénotype des plantes dans le chapitre de discussion générale (chapitre 6).

4 RÉFÉRENCES

- Ansquer, P., Al Haj Khaled, R., Cruz, P., Theau, J.-P., Therond, O. & Duru, M. (2009) Characterizing and predicting plant phenology in species-rich grasslands. *Grass and Forage Science*, **64**, 57-70.
- Bernard-Verdier, M. (2012) Structure et assemblage des communautés végétales de parcours des Grands Causses : approche fonctionnelle, phénologique et phylogénétique.
- Boege, K. & Marquis, R.J. (2005) Facing herbivory as you grow up: the ontogeny of resistance in plants. *Trends in Ecology & Evolution*, **20**, 441-448.
- Bolmgren, K. & Cowan, P.D. (2008) Time – size tradeoffs: a phylogenetic comparative study of flowering time, plant height and seed mass in a north-temperate flora. *Oikos*, **117**, 424-429.
- Bonhomme, R. (2000) Bases and limits to using ‘degree. day’ units. *European journal of agronomy*, **13**, 1-10.
- Briske, D. (1996) Strategies of plant survival in grazed systems: a functional interpretation. *The ecology and management of grazing systems*, 37-67.
- Calow, P. (1987) Towards a definition of functional ecology. *Functional Ecology*, **1**, 57-61.
- Catorci, A., Cesaretti, S., Gatti, R. & Tardella, F. (2012) Trait-related flowering patterns in submediterranean mountain meadows. *Plant Ecology*, **213**, 1315-1328.
- Chabot, B.F. & Hicks, D.J. (1982) The ecology of leaf life spans. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **13**, 229-259.
- Chiariello, N. (1989) Phenology of California grasslands. *Grassland structure and function* (eds L.F. Huenneke & H.A. Mooney), pp. 47-58. Springer, Netherlands, Dordrecht.
- Choong, M. (1996) What makes a leaf tough and how this affects the pattern of *Castanopsis fissa* leaf consumption by caterpillars. *Functional Ecology*, 668-674.
- Chaine, I. (2010) Why does phenology drive species distribution? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **365**, 3149-3160.
- Coley, P. (1988) Effects of plant growth rate and leaf lifetime on the amount and type of anti-herbivore defense. *Oecologia*, **74**, 531-536.
- Coley, P.D. & Barone, J. (1996) Herbivory and plant defenses in tropical forests. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **27**, 305-335.
- Coley, P.D., Bryant, J.P. & Chapin, F.S. (1985) Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science*, **230**, 895-899.
- Craine, J.M., Wolkovich, E.M., Gene Towne, E. & Kembel, S.W. (2012) Flowering phenology as a functional trait in a tallgrass prairie. *New Phytologist*, **193**, 673-682.
- Davies, T.J., Wolkovich, E.M., Kraft, N.J., Salamin, N., Allen, J.M., Ault, T.R., Betancourt, J.L., Bolmgren, K., Cleland, E.E. & Cook, B.I. (2013) Phylogenetic conservatism in plant phenology. *Journal of Ecology*, **101**, 1520-1530.
- Díaz, S., Kattge, J., Cornelissen, J.H.C., Wright, I.J., Lavorel, S., Dray, S., Reu, B., Kleyer, M., Wirth, C., Colin Prentice, I., Garnier, E., Bönsch, G., Westoby, M., Poorter, H., Reich, P.B., Moles, A.T., Dickie, J., Gillison, A.N., Zanne, A.E., Chave, J., Joseph Wright, S., Sheremet'ev, S.N., Jactel, H., Baraloto, C., Cerabolini, B., Pierce, S., Shipley, B., Kirkup, D., Casanoves, F., Joswig, J.S., Günther, A., Falczuk, V., Rüger, N., Mahecha, M.D. & Gorné, L.D. (2016) The global spectrum of plant form and function. *Nature*, **529**, 167-171.
- Diggle, P.K. (1999) Heteroblasty and the evolution of flowering phenologies. *International Journal of Plant Sciences*, **160**, S123-S134.
- Du, G. & Qi, W. (2010) Trade-offs between flowering time, plant height, and seed size within and across 11 communities of a Qinghai-Tibetan flora. *Plant Ecology*, **209**, 321-333.
- Duru, M., Khaled, R.A.H., Ducourtieux, C., Theau, J.P., de Quadros, F.L. & Cruz, P. (2009) Do plant functional types based on leaf dry matter content allow characterizing native grass species and grasslands for herbage growth pattern? *Plant Ecology*, **201**, 421.
- Dwyer, J.M. & Laughlin, D.C. (2017) Constraints on trait combinations explain climatic drivers of biodiversity: The importance of trait covariance in community assembly. *Ecology Letters*, **20**, 872-882.
- Ehrlén, J. (2015) Selection on flowering time in a life-cycle context. *Oikos*, **124**, 92-101.

- Eriksson, O. & Ehrlén, J. (1991) Phenological variation in fruit characteristics in vertebrate-dispersed plants. *Oecologia*, **86**, 463-470.
- Fargione, J. & Tilman, D. (2005) Niche differences in phenology and rooting depth promote coexistence with a dominant C 4 bunchgrass. *Oecologia*, **143**, 598-606.
- Fenner, M. (1998) The phenology of growth and reproduction in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, **1**, 78-91.
- Forrest, J. & Miller-Rushing, A.J. (2010) Toward a synthetic understanding of the role of phenology in ecology and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **365**, 3101-3112.
- Franks, S.J., Sim, S. & Weis, A.E. (2007) Rapid evolution of flowering time by an annual plant in response to a climate fluctuation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 1278-1282.
- Freschet, G.T., Aerts, R. & Cornelissen, J.H. (2012) A plant economics spectrum of litter decomposability. *Functional Ecology*, **26**, 56-65.
- Garnier, E., Navas, M.-L. & Grigulis, K. (2016) *Plant functional diversity: organism traits, community structure, and ecosystem properties*. Oxford University Press, Oxford.
- Godoy, O., Castro-Díez, P., Valladares, F. & Costa-Tenorio, M. (2009) Different flowering phenology of alien invasive species in Spain: evidence for the use of an empty temporal niche? *Plant Biology*, **11**, 803-811.
- Grainger, J. (1939) Studies upon the time of flowering of plants: anatomical, floristic and phenological aspects of the problem. *Annals of Applied Biology*, **26**, 684-704.
- Grime, J. (1977) Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *American naturalist*, 1169-1194.
- Grime, J., Thompson, K., Hunt, R., Hodgson, J., Cornelissen, J., Rorison, I., Hendry, G., Ashenden, T., Askew, A. & Band, S. (1997) Integrated screening validates primary axes of specialisation in plants. *Oikos*, 259-281.
- Grime, J.P. (2001) *Plant strategies, vegetation processes, and ecosystem properties*, 2 edn. John Wiley & Sons, Chichester.
- Hampton, S.E. & Parker, J.N. (2011) Collaboration and productivity in scientific synthesis. *BioScience*, **61**, 900-910.
- Hanley, M.E., Lamont, B.B., Fairbanks, M.M. & Rafferty, C.M. (2007) Plant structural traits and their role in anti-herbivore defence. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, **8**, 157-178.
- Heydel, F. & Tackenberg, O. (2017) How are the phenologies of ripening and seed release affected by species' ecology and evolution? *Oikos*, **126**, 738-747.
- Hodgson, J.G., Wilson, P.J., Hunt, R., Grime, J.P. & Thompson, K. (1999) Allocating C-S-R plant functional types: a soft approach to a hard problem. *Oikos*, **85**, 282-294.
- Holdsworth, M.J., Bentsink, L. & Soppe, W.J. (2008) Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytologist*, **179**, 33-54.
- Hutchinson, G.E. (1957) Cold spring harbor symposium on quantitative biology. *Concluding remarks*, **22**, 415-427.
- Jackson, L. & Roy, J. (1986) Growth patterns of Mediterranean annual and perennial grasses under simulated rainfall regimes of southern France and California. *Acta oecologica. Oecologia plantarum*, **7**, 191-212.
- Jia, P., Bayaerta, T., Li, X. & Du, G. (2011) Relationships between flowering phenology and functional traits in eastern Tibet alpine meadow. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, **43**, 585-592.
- Johnson, S.D. (1992) Climatic and Phylogenetic Determinants of Flowering Seasonality in the Cape Flora. *Journal of Ecology*, **81**, 567-572.
- Kitajima, K., Llorens, A.M., Stefanescu, C., Timchenko, M.V., Lucas, P.W. & Wright, S.J. (2012) How cellulose-based leaf toughness and lamina density contribute to long leaf lifespans of shade-tolerant species. *New Phytologist*, **195**, 640-652.
- Kitajima, K. & Poorter, L. (2010) Tissue-level leaf toughness, but not lamina thickness, predicts sapling leaf lifespan and shade tolerance of tropical tree species. *New Phytologist*, **186**, 708-721.

- Koch, G.W., Sillett, S.C., Jennings, G.M. & Davis, S.D. (2004) The limits to tree height. *Nature*, **428**, 851.
- Kochmer, J.P. & Handel, S.N. (1986) Constraints and competition in the evolution of flowering phenology. *Ecological Monographs*, **56**, 303-325.
- Laughlin, D.C. (2014) The intrinsic dimensionality of plant traits and its relevance to community assembly. *Journal of Ecology*, **102**, 186-193.
- Laughlin, D.C., Leppert, J.J., Moore, M.M. & Sieg, C.H. (2010) A multi-trait test of the leaf-height-seed plant strategy scheme with 133 species from a pine forest flora. *Functional Ecology*, **24**, 493-501.
- Lavorel, S., Díaz, S., Cornelissen, J.H.C., Garnier, E., Harrison, S.P., McIntyre, S., Pausas, J.G., Pérez-Harguindeguy, N., Roumet, C. & Urcelay, C. (2007) Plant functional types: are we getting any closer to the Holy Grail? *Terrestrial ecosystems in a changing world*, pp. 149-164. Springer.
- Lavorel, S. & Garnier, É. (2002) Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail. *Functional Ecology*, **16**, 545-556.
- Leishman, M.R., Wright, I.J., Moles, A.T. & Westoby, M. (2000) The evolutionary ecology of seed size. *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities* (ed. M. Fenner), pp. 31-57. CAB International, Wallingford, UK.
- Louault, F., Pillar, V., Aufrère, J., Garnier, E. & Soussana, J. (2005) Plant traits and functional types in response to reduced disturbance in a semi-natural grassland. *Journal of Vegetation Science*, **16**, 151-160.
- Lucas, P.W., Turner, I.M., Dominy, N.J. & Yamashita, N. (2000) Mechanical defences to herbivory. *Annals of botany*, **86**, 913-920.
- Lughadha, E.N., Govaerts, R., Belyaeva, I., Black, N., Lindon, H., ALLKIN, R., MAGILL, R.E. & Nicolson, N. (2016) Counting counts: Revised estimates of numbers of accepted species of flowering plants, seed plants, vascular plants and land plants with a review of other recent estimates. *Phytotaxa*, **272**, 82-88.
- Marks, C.O. & Lechowicz, M.J. (2005) Alternative designs and the evolution of functional diversity. *The American Naturalist*, **167**, 55-66.
- Mazer, S.J. (1989) Ecological, taxonomic, and life history correlates of seed mass among Indiana dune angiosperms. *Ecological Monographs*, **59**, 153-175.
- Meier, U. (1997) *Growth stages of mono- and dicotyledonous plants : BBCH-Monograph*. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin; Boston.
- Méndez-Alonzo, R., Ewers, F.W. & Sack, L. (2013) Ecological variation in leaf biomechanics and its scaling with tissue structure across three mediterranean climate plant communities. *Functional Ecology*, **27**, 544-554.
- Moles, A.T., Peco, B., Wallis, I.R., Foley, W.J., Poore, A.G., Seabloom, E.W., Vesk, P.A., Bisigato, A.J., Cella-Pizarro, L. & Clark, C.J. (2013) Correlations between physical and chemical defences in plants: tradeoffs, syndromes, or just many different ways to skin a herbivorous cat? *New Phytologist*, **198**, 252-263.
- Moles, A.T. & Westoby, M. (2003) Latitude, seed predation and seed mass. *Journal of Biogeography*, **30**, 105-128.
- Moles, A.T. & Westoby, M. (2004) Seedling survival and seed size: a synthesis of the literature. *Journal of Ecology*, **92**, 372-383.
- Mooney, H., Dunn, E., Shropshire, F. & Song, L. (1970) Vegetation comparisons between the mediterranean climatic areas of California and Chile. *Flora*, **159**, 480-496.
- Mooney, H.A. & Dunn, E.L. (1970) Convergent evolution of Mediterranean-climate evergreen sclerophyll shrubs. *Evolution*, **24**, 292-303.
- Mooney, H.A., Hobbs, R.J., Gorham, J. & Williams, K. (1986) Biomass accumulation and resource utilization in co-occurring grassland annuals. *Oecologia*, **70**, 555-558.
- Myking, T. & Heide, O. (1995) Dormancy release and chilling requirement of buds of latitudinal ecotypes of *Betula pendula* and *B. pubescens*. *Tree physiology*, **15**, 697-704.
- National Center for Ecological Analysis and Synthesis & Wolkovich, E. (2012) NECTAR: Network of Ecological and Climatological Timings Across Regions. nceas.988.17 (<https://knb.ecoinformatics.org/knb/metacat/nceas.988.17/knb>)

- Onoda, Y., Westoby, M., Adler, P.B., Choong, A.M.F., Clissold, F.J., Cornelissen, J.H.C., Díaz, S., Dominy, N.J., Elgart, A., Enrico, L., Fine, P.V.A., Howard, J.J., Jalili, A., Kitajima, K., Kurokawa, H., McArthur, C., Lucas, P.W., Markesteijn, L., Pérez-Harguindeguy, N., Poorter, L., Richards, L., Santiago, L.S., Sosinski, E.E., Van Bael, S.A., Warton, D.I., Wright, I.J., Joseph Wright, S. & Yamashita, N. (2011) Global patterns of leaf mechanical properties. *Ecology Letters*, **14**, 301-312.
- Parmesan, C. & Yohe, G. (2003) A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature*, **421**, 37-42.
- Pau, S., Wolkovich, E.M., Cook, B.I., Davies, T.J., Kraft, N.J., Bolmgren, K., Betancourt, J.L. & Cleland, E.E. (2011) Predicting phenology by integrating ecology, evolution and climate science. *Global Change Biology*, **17**, 3633-3643.
- Pérez-Harguindeguy, N., Díaz, S., Garnier, E., Lavorel, S., Poorter, H., Jaureguiberry, P., Bret-Harte, M., Cornwell, W., Craine, J. & Gurvich, D. (2013) New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany*.
- Petanidou, T., Ellis, W.N., Margaris, N.S. & Vokou, D. (1995) Constraints on flowering phenology in a phryganic (East Mediterranean shrub) community. *American Journal of Botany*, 607-620.
- Pierce, S., Brusa, G., Vagge, I. & Cerabolini, B.E. (2013) Allocating CSR plant functional types: the use of leaf economics and size traits to classify woody and herbaceous vascular plants. *Functional Ecology*, **27**, 1002-1010.
- Poorter, H., Niinemets, Ü., Walter, A., Fiorani, F. & Schurr, U. (2010) A method to construct dose-response curves for a wide range of environmental factors and plant traits by means of a meta-analysis of phenotypic data. *Journal of Experimental Botany*, **61**, 2043-2055.
- Primack, R.B. (1987) Relationships among flowers, fruits, and seeds. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, 409-430.
- Puijalon, S., Bouma, T.J., Douady, C.J., van Groenendael, J., Anten, N.P., Martel, E. & Bornette, G. (2011) Plant resistance to mechanical stress: evidence of an avoidance-tolerance trade-off. *New Phytologist*, **191**, 1141-1149.
- Rathcke, B. & Lacey, E.P. (1985) Phenological patterns of terrestrial plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **16**, 179-214.
- Raunkiaer, C. (1934) *The life forms of plants and statistical plant geography: being the collected papers of C. Raunkiaer*. Clarendon Press, Oxford.
- Reich, P.B. (2014) The world-wide 'fast-slow' plant economics spectrum: a traits manifesto. *Journal of Ecology*, **102**, 275-301.
- Roth-Nebelsick, A., Uhl, D., Mosbrugger, V. & Kerp, H. (2001) Evolution and function of leaf venation architecture: a review. *Annals of botany*, **87**, 553-566.
- Rundel, P.W., Arroyo, M.T., Cowling, R.M., Keeley, J.E., Lamont, B.B. & Vargas, P. (2016) Mediterranean biomes: Evolution of their vegetation, floras, and climate. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **47**, 383-407.
- Sack, L. & Scoffoni, C. (2013) Leaf venation: structure, function, development, evolution, ecology and applications in the past, present and future. *New Phytologist*, **198**, 983-1000.
- Sakai, S. (2001) Phenological diversity in tropical forests. *Population Ecology*, **43**, 77-86.
- Sarmiento, G. & Monasterio, M. (1983) Life forms and phenology. *Ecosystems of the World XIII. Tropical savannas* (ed. F. Bourliere), pp. 79-108. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.
- Schwartz, M.D. (2003) *Phenology: An integrative environmental science*. Springer, Dordrecht.
- Shipley, B. & Dion, J. (1992) The allometry of seed production in herbaceous angiosperms. *The American Naturalist*, **139**, 467-483.
- Shipley, B., Lechowicz, M.J., Wright, I. & Reich, P.B. (2006) Fundamental trade-offs generating the worldwide leaf economics spectrum. *Ecology*, **87**, 535-541.
- Silvertown, J. & Gordon, D.M. (1989) A framework for plant behavior. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **20**, 349-366.
- Slade, N.A., Horton, J.S. & Mooney, H.A. (1975) Yearly variation in the phenology of California annuals. *American Midland Naturalist*, 209-214.

- Smith-Ramírez, C., Armesto, J.J. & Figueroa, J. (1998) Flowering, fruiting and seed germination in Chilean rain forest myrtaceae: ecological and phylogenetic constraints. *Plant Ecology*, **136**, 119-131.
- Southwood, T., Brown, V. & Reader, P. (1986) Leaf palatability, life expectancy and herbivore damage. *Oecologia*, **70**, 544-548.
- Sun, S. & Frelich, L.E. (2011) Flowering phenology and height growth pattern are associated with maximum plant height, relative growth rate and stem tissue mass density in herbaceous grassland species. *Journal of Ecology*, **99**, 991-1000.
- van Schaik, C.P., Terborgh, J.W. & Wright, S.J. (1993) The Phenology of Tropical Forests: Adaptive Significance and Consequences for Primary Consumers. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **24**, 353-377.
- Van Soest, P.v., Robertson, J. & Lewis, B. (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of dairy science*, **74**, 3583-3597.
- Vile, D., Garnier, E., Shipley, B., Laurent, G., Navas, M.-L., Roumet, C., Lavorel, S., Diaz, S., Hodgson, J.G. & Lloret, F. (2005) Specific leaf area and dry matter content estimate thickness in laminar leaves. *Annals of botany*, **96**, 1129-1136.
- Vile, D., Shipley, B. & Garnier, E. (2006) A structural equation model to integrate changes in functional strategies during old-field succession. *Ecology*, **87**, 504-517.
- Violle, C., Navas, M.-L., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I. & Garnier, E. (2007) Let the concept of trait be functional! *Oikos*, **116**, 882-892.
- Visser, M.E. & Holleman, L.J. (2001) Warmer springs disrupt the synchrony of oak and winter moth phenology. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **268**, 289-294.
- Wardle, D., Bonner, K. & Barker, G. (2002) Linkages between plant litter decomposition, litter quality, and vegetation responses to herbivores. *Functional Ecology*, **16**, 585-595.
- Weiher, E., Werf, A., Thompson, K., Roderick, M., Garnier, E. & Eriksson, O. (1999) Challenging Theophrastus: a common core list of plant traits for functional ecology. *Journal of Vegetation Science*, **10**, 609-620.
- Westbrook, J.W., Kitajima, K., Burleigh, J.G., Kress, W.J., Erickson, D.L. & Wright, S.J. (2011) What makes a leaf tough? Patterns of correlated evolution between leaf toughness traits and demographic rates among 197 shade-tolerant woody species in a Neotropical forest. *The American Naturalist*, **177**, 800-811.
- Westoby, M. (1998) A leaf-height-seed (LHS) plant ecology strategy scheme. *Plant and Soil*, **199**, 213-227.
- Westoby, M., Falster, D.S., Moles, A.T., Vesk, P.A. & Wright, I.J. (2002) Plant ecological strategies: some leading dimensions of variation between species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **33**, 125-159.
- Wheelwright, N.T. (1985) Competition for dispersers, and the timing of flowering and fruiting in a guild of tropical trees. *Oikos*, 465-477.
- Wilczek, A.M., Burghardt, L.T., Cobb, A.R., Cooper, M.D., Welch, S.M. & Schmitt, J. (2010) Genetic and physiological bases for phenological responses to current and predicted climates. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **365**, 3129-3147.
- Wolkovich, E.M. & Cleland, E.E. (2014) Phenological niches and the future of invaded ecosystems with climate change. *AoB Plants*.
- Wolkovich, E.M. & Ettinger, A.K. (2014) Back to the future for plant phenology research. *New Phytologist*, **203**, 1021-1024.
- Wright, I.J. & Cannon, K. (2001) Relationships between leaf lifespan and structural defences in a low-nutrient, sclerophyll flora. *Functional Ecology*, **15**, 351-359.
- Wright, I.J., Reich, P.B., Cornelissen, J.H., Falster, D.S., Groom, P.K., Hikosaka, K., Lee, W., Lusk, C.H., Niinemets, Ü. & Oleksyn, J. (2005) Modulation of leaf economic traits and trait relationships by climate. *Global Ecology and Biogeography*, **14**, 411-421.
- Wright, I.J., Reich, P.B., Westoby, M., Ackerly, D.D., Baruch, Z., Bongers, F., Cavender-Bares, J., Chapin, T., Cornelissen, J.H.C., Diemer, M., Flexas, J., Garnier, E., Groom, P.K., Gulias, J., Hikosaka, K., Lamont, B.B., Lee, T., Lee, W., Lusk, C., Midgley, J.J., Navas, M.-L., Niinemets, U., Oleksyn, J., Osada, N., Poorter, H., Poot, P., Prior, L., Pyankov, V.I., Roumet,

- C., Thomas, S.C., Tjoelker, M.G., Veneklaas, E.J. & Villar, R. (2004) The worldwide leaf economics spectrum. *Nature*, **428**, 821-827.
- Wright, I.J., Westoby, M. & Reich, P.B. (2002) Convergence towards higher leaf mass per area in dry and nutrient-poor habitats has different consequences for leaf life span. *Journal of Ecology*, **90**, 534-543.
- Zadoks, J.C., Chang, T.T. & Konzak, C.F. (1974) A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, **14**, 415-421.

Chapitre 1

Matériel et méthodes

Chacun des chapitres présentant les résultats du travail (chapitre 2 à 5) contient une section « matériel et méthodes » qui détaille les sites et les espèces sélectionnés, les mesures de traits réalisées et les protocoles utilisés. Le présent chapitre présente des éléments de contexte du système méditerranéen du sud de la France où les divers volets du travail ont été réalisés, et décrit brièvement les quatre sites d'études utilisés pour nos analyses.

1 CONTEXTE MÉDITERRANÉEN DU SUD DE LA FRANCE

1.1 Climat et sols

La région méditerranéenne représente une transition entre les régions tropicales sèches et les régions tempérées froides. Elle est avant tout caractérisée par la saisonnalité de son climat avec des été chauds et sec et des hivers froids et humides (Daget 1977). La période de maximum de température et d'irradiation solaire correspond au minimum des précipitations créant une période de déficit hydrique pour les plantes. Des périodes de gels sont également fréquentes en hiver créant deux saisons favorables à la croissance des plantes : (1) la fin d'hiver et le printemps, après les gelées tardives et avant la sécheresse estivale et (2) l'automne, suite au retour des précipitations et avant le démarrage de l'hiver (Thompson 2005). Il existe une classification du climat méditerranéen en plusieurs sous-climats, basée sur la température moyenne du mois le plus froid (m) et le quotient pluviométrique d'Emberger (Fig. 1). Ce dernier est un indice d'aridité (voir Nahal 1981) qui prend en compte les précipitations totales (P) et l'amplitude thermique entre la température du mois le plus froid (m) et du mois le plus chaud (M) selon l'équation :

$$Q = \frac{2000P}{M^2 - m^2} \quad (1)$$

Une caractéristique importante du climat méditerranéen est la grande variabilité interannuelle du régime de précipitations. En moyenne, plus de 65% des précipitations annuelles ont lieu pendant les 6 mois d'hiver, qui consistent en des événements pluvieux imprévisibles, peu fréquents et intenses (Aschmann 1973). Ainsi, malgré des précipitations annuelles relativement élevées (en particulier dans le sud de la France), les plantes souffrent d'un déficit hydrique estival plus ou moins long et intense selon les années. Le sol joue également un rôle majeur dans la disponibilité en eau pour la végétation. En effet le socle géologique de la région méditerranéenne du sud de la France est majoritairement sédimentaire, avec de nombreuses régions karstiques. Le sol est basique et généralement peu profond, en raison de la forte érosion due aux épisodes pluvieux violents, entraînant une faible capacité de rétention

de l'eau en surface et une faible disponibilité en nutriments minéraux. Ainsi, la plupart des précipitations alimentent des nappes profondes et l'eau de surface est rarement disponible. On observe cependant des variations de ces caractéristiques localement. Des configurations topographiques particulières, ou la présence d'un socle géologique différent, peuvent mener à une accumulation de sol localement permettant une disponibilité en eau et en nutriments plus élevée ou à une modification du pH du sol, entraînant une forte modification de la composition en espèces des communautés végétales. Cette mosaïque de configurations, en association avec des régimes de perturbation contrastés, fait de la région Méditerranéenne l'un des hotspots de biodiversité végétale les plus importants de la planète (Médail & Myers 2004).

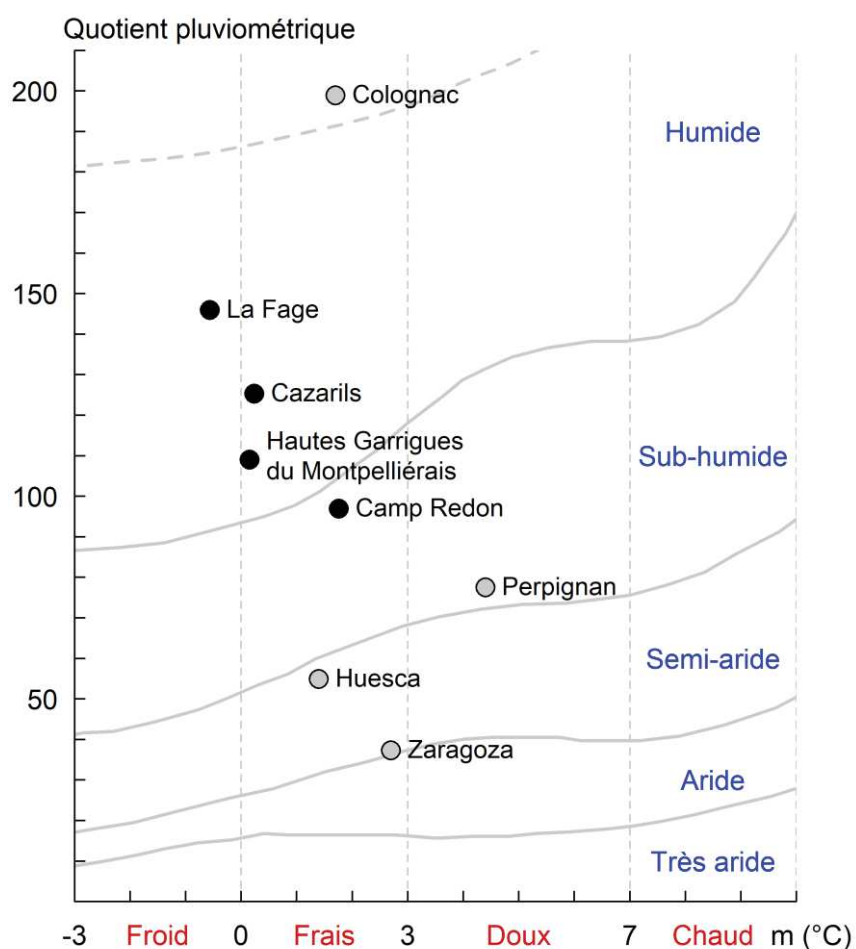


FIGURE 1 | Diagramme représentant les sous-climats méditerranéens à partir de la température moyenne du mois le plus froid (m) et du quotient pluviométrique d'Emberger (voir équation 1 dans la section 1.1). Chaque point représente les données climatiques mesurées entre 1981 et 2010 pour différents sites méditerranéens. Les points noirs sont les sites utilisés dans cette étude.

Les conditions climatiques méditerranéennes placent de fortes contraintes sélectives sur les organismes et sont considérés comme étant le facteur structurant majeur de la végétation (Thompson 2005). Au niveau des communautés végétales, on observe que l'activité des plantes est bimodale, avec généralement un pic de croissance et de reproduction des espèces au printemps et une repousse d'automne plus ou moins importante selon le régime de précipitations de l'année (Daget 1977; Thompson 2005). Trois types d'adaptation sont observées en réponse à la sécheresse estivale: l'échappement (de l'anglais « escape »), l'évitement (de l'anglais « avoidance ») et la tolérance (de l'anglais « tolerance ») (Sack *et al.* 2016; Volaire 2018). L'échappement est une stratégie qui consiste en un arrêt de l'activité de la plante pendant la sécheresse *via* une dormance estivale ou sous la forme de graines, notamment chez les espèces annuelles. Ces espèces réalisent alors leur cycle en dehors des périodes de sécheresse. L'évitement et la tolérance consistent en la mise en place de mécanismes qui permettent le maintien du fonctionnement des cellules et la persistance de la plante pendant la sécheresse. Elles décrivent deux stratégies opposées en réponse au compromis entre la déshydratation des tissus et l'acquisition du carbone. La première peut être décrite comme une stratégie de maintien du potentiel hydrique de la plante (isohydrique) pendant le déficit hydrique grâce à la régulation stomatique et des systèmes racinaires profonds, ayant pour conséquence une diminution des échanges gazeux foliaires. La seconde correspond à une résistance à la cavitation permettant une diminution du potentiel hydrique de la plante (anisohydrique) pendant les périodes de déficit hydrique sans modifier les échanges gazeux au niveau de la feuille (Sack *et al.* 2016).

1.2 Activités humaines

Le Bassin Méditerranéen est la région qui a connu la plus longue histoire d'occupation humaine en Europe. Les activités humaines ont un impact majeur sur la végétation et la structure du paysage. Elles doivent être considérées comme un processus écologique à part entière dans le système méditerranéen puisqu'elles ont eu - et ont toujours - un effet non seulement sur la configuration spatiale des habitats mais aussi sur les pressions de sélections et les contraintes qui déterminent la performance de différentes stratégies écologiques (Thompson 2005). On peut citer quatre types d'activités qui ont eu un impact significatif sur les écosystèmes méditerranéens : le feu, l'installation de cultures (céréales, olivier, vigne), le pastoralisme et l'exploitation forestière. Ces quatre activités ont en commun le fait qu'elles modifient le régime de perturbation du milieu. Globalement, cela a eu pour effet une forte diminution de la surface forestière au profit d'habitats ouverts dominés par des espèces

herbacées ou buissonnantes. On considère qu'en moins de dix siècles, du V^{ème} siècle av. J.C. jusqu'aux invasions barbares, plus de la moitié des forêts méditerranéennes ont été détruites par le feu pour la recherche de terres de culture et de pacage (Quézel & Médail 2003). Le déboisement s'accompagne généralement d'une érosion des sols rendant la recolonisation difficile voire impossible par endroits. S'en sont suivis de nombreux cycles de recolonisation forestière temporaire et de déboisement intensif au cours des époques de l'empire romain, du Moyen-âge, du XVIII^{ème} et du XIX^{ème} siècle. Pendant ces périodes, les activités humaines se concentrent dans les plaines et les plateaux pour la culture et l'élevage et les forêts restent localisées sur les terrains montagneux ou inaptes à la culture et sont utilisées comme source de bois d'œuvre ou de bois de chauffage. Au milieu du XIX^{ème} siècle, suite à l'expansion du pastoralisme caprin et ovin, notamment dans les zones montagneuses, les trois-quarts de la forêt méditerranéenne avait disparu.



FIGURE 2 | Évolution typique du paysage de garrigue du sud de la France observée à Saint-Bauzille-de-Putois (Hérault) entre 1929 et 1992 (pour plus de détail voir Debussche, Lepart & Dervieux 1999).



Après la fin de la seconde guerre mondiale, l'augmentation de l'utilisation des énergies fossiles a pour effet une diminution des pratiques de taillis des forêts. D'autre part, l'exode rural, associé à la mise en place de la politique agricole commune et des quotas de production, provoquent une déprise agricole importante avec la disparition des petites exploitations et l'abandon de nombreuses parcelles agricoles. On observe alors une recolonisation de ces

milieux par la végétation selon des processus de successions végétales secondaires. Les forêt recolonisent progressivement les plaines provoquant une dynamique de fermeture du paysage (Debussche, Lepart & Dervieux 1999).

2 SITES D'ÉTUDE, SÉLECTION D'ESPÈCES ET DESIGN EXPÉRIMENTAUX

Les travaux de thèse s'appuient sur deux approches : la synthèse scientifique et la mise en place d'expérimentations. La synthèse scientifique s'appuie sur des mesures réalisées sur quatre sites du sud de la France (Fig. 3) aux climats méditerranéens allant du froid humide au frais sub-humide (Fig. 1 et 4). Différentes campagnes de mesures de traits ont été réalisées sur des communautés naturelles sur les sites de Cazarils (1998, Fig. 5), des hautes garrigues du Montpelliérais (2000 et 2002, Fig. 6) et de la Fage (2006, 2007 et 2010, Fig. 7). Le jeu de données contient également des valeurs de traits mesurées sur une expérimentation en jardin commun au terrain d'expérience du CEFE à Montpellier (Camp Redon, 2003 et 2004). La partie expérimentale de la thèse a consisté en des mesures de traits sur le site de la Fage (2015) et sur une expérimentation en pots menée sur le terrain d'expérience du CEFE (2016). Les parties suivantes donnent des éléments de contexte plus détaillés pour chacun des sites.

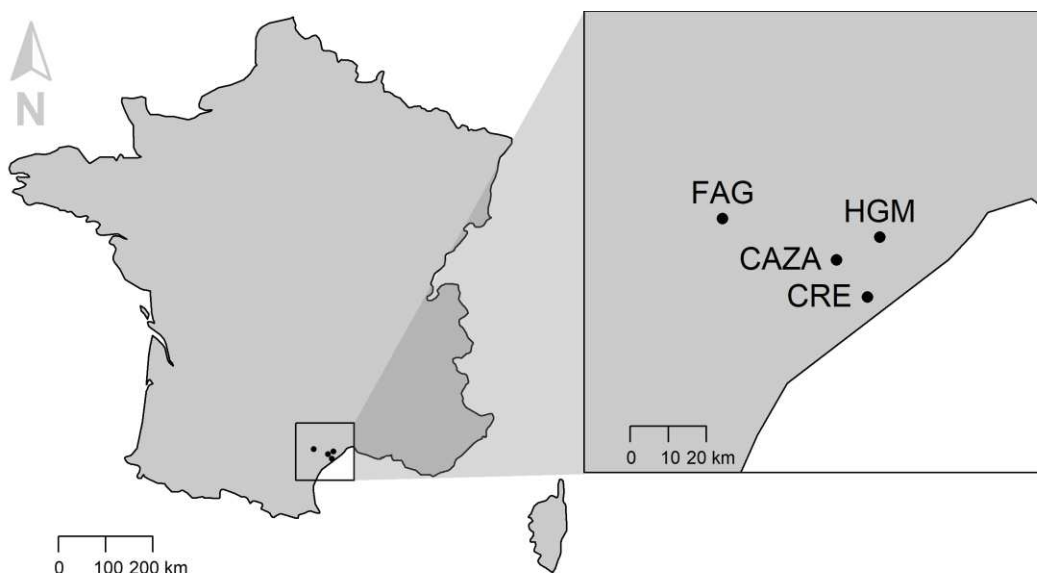


FIGURE 3 | Localisation géographique des sites d'étude. FAG, station expérimentale de la Fage; CAZ, Cazarils; HGM, Hautes Garrigues du Montpelliérais; CRE, Terrain d'expériences de Camp Redon à Montpellier.

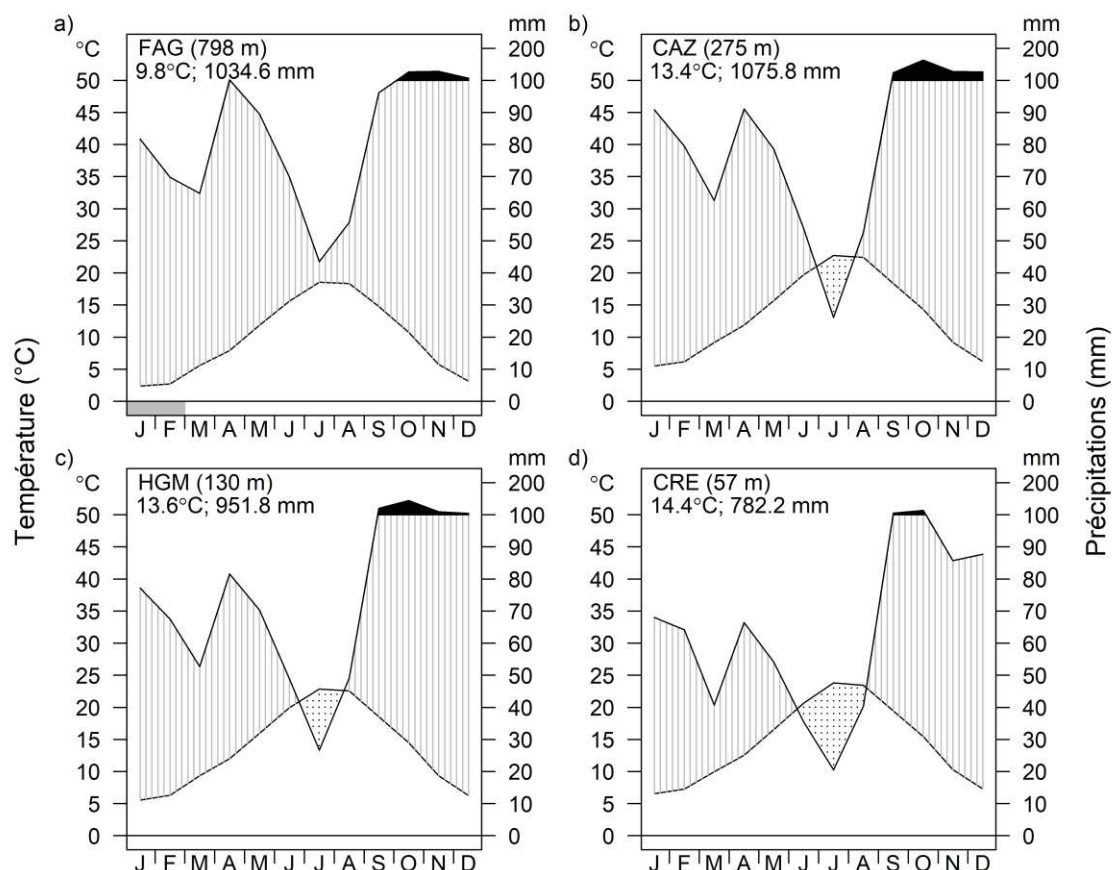


FIGURE 4 | Diagrammes ombrothermiques (cf. Walter, Harnickell & Mueller-Dombois 1975) réalisés à partir des données climatiques mensuelles de quatre sites d'étude pendant la période 1981-2010 : (a) FAG, station expérimentale de la Fage; (b) CAZ, Cazarils; (c) HGM, Hautes Garrigues du Montpelliérais; (d) CRE, Terrain d'expériences de Camp Redon. L'altitude du site, la température moyenne et les précipitations cumulées annuelles sont mentionnées dans chaque panneau. Les zones pointillées représentent les périodes de déficit hydrique (précipitation < 2* température). Une zone grisée en bas de chaque panneau représente les mois pendant lesquels la température minimale moyenne est négative. La zone noire dénote le changement de graduation de l'axe des précipitations.

2.1 Successions secondaires de Cazarils et des hautes garrigues

Cazarils et les hautes garrigues du Montpelliérais sont deux sites relativement proches géographiquement et situés à une trentaine de kilomètres au nord de Montpellier (Fig. 3). Ils ont été sélectionnés pour étudier le processus de succession secondaire de la végétation suite à une modification du régime de perturbation consécutif à une déprise agricole.

A Cazarils (43°46'N, 3°42'E, 275m), le site consiste en une large combe au milieu d'une zone boisée occupée majoritairement par *Quercus pubescens* et *Q. ilex* (Fig. 5). La combe a été cultivée jusqu'au milieu du XX^{ème} siècle et est entourée d'une garrigue dégradée par des taillis

réguliers utilisés pour le bois de chauffage. Pendant les 70 dernières années, les facteurs majeurs de perturbation dans ce site ont été des coupes sélectives, un pâturage extensif par des chèvres et des moutons et des pratiques de chasse récréative (Aronson *et al.* 1998). En 1998, cinq stades de succession secondaire ont été identifiés : le premier (0 à 10 ans après abandon) est dominé par des espèces annuelles alors que le stade deux (10 à 15 ans après abandon) est dominé par des herbacées pérennes et des petits ligneux de la famille des Lamiacées. Le troisième stade (15 à 25 ans après abandon) est dominé par *Brachypodium phoenicoides*, une graminée pérenne. Dans le stade quatre (environs 60 ans après abandon), les petits ligneux deviennent la forme de croissance la plus abondante. Finalement le stade cinq (plus de 100 ans après abandon) est dominé par des arbres avec un sous-bois constitué d'herbacées et de buissons (Navas *et al.* 2010). Les espèces les plus abondantes de chaque stade sont été sélectionnées, formant un total de 41 espèces caractérisées par la mesure de traits fonctionnels.



FIGURE 5 | Succession secondaire (a) du site de Cazarils au pied du pic Saint-Loup et de la montagne Hortus dans (b) un contexte de fermeture du paysage suite à la déprise du pâturage caprin de la garrigue.

Les hautes garrigues du Montpelliérais (43°51'N, 3°56'E, 130m) sont un ensemble de 8 anciennes parcelles agricoles abandonnées situées dans une région de 4 * 4 km aux mêmes caractéristiques de sol (Fig. 6). Il s'agit d'anciennes vignes arrachées entre 5 et 45 ans avant l'étude. L'âge après abandon des parcelles a été estimé notamment grâce à une séquence de photographies aériennes de la zone depuis 1956. Les parcelles représentent donc une succession secondaire de la végétation après l'abandon de parcelles cultivées et n'ont connu aucune perturbation majeure depuis leur abandon (Garnier *et al.* 2004; Vile, Shipley &

Garnier 2006). Elles sont toutes dominées par des espèces herbacées, avec un remplacement des espèces dicotylédones annuelles des premiers stades par des graminées pérennes. En 2000 et 2002, des mesures de traits ont été réalisées sur total de 33 espèces les plus abondantes dans chaque parcelle.

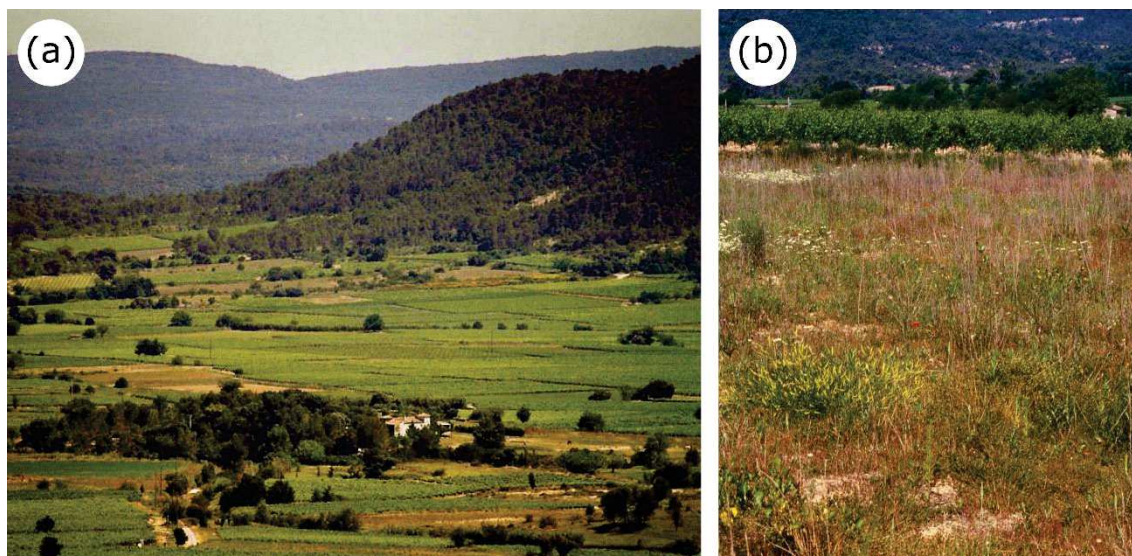


FIGURE 6 | Succession secondaire (a) des hautes garrigues du Montpelliérais de la commune de Claret dans (b) un contexte d'abandon de parcelles de vignes.

2.1 Parcours ovin de la Fage

Le domaine de la Fage (43°55'N, 3°05'E, 798 m), géré par l'INRA, comprend un parcours de 280 ha qui se situe sur le plateau karstique du Larzac (Aveyron) au relief vallonné et peu contrasté, constitués de sols sur calcaires en plaquettes et de rendzines dolomitiques. Ce type de sols, peu profond, est caractérisé par une faible capacité de rétention hydrique, avec un fort drainage en profondeur accentuant le déficit hydrique estival pour la végétation. Le domaine a probablement été cultivé, au moins en partie, jusqu'au XIX^{ème} siècle. Puis il a été pâturé de manière extensive jusqu'en 1972, par des troupeaux de moutons locaux ou transhumants, permettant la recolonisation de la zone par des espèces ligneuses (majoritairement *Buxus sempervirens* et *Q. pubescens*). Depuis 1972, le site a été divisé en parcelles pâturées à faible charge. Depuis 1978, trois parcelles sont fertilisées en azote (65 kg N/ha par an) et en phosphore (40 kg P/ha tous les 3 ans) depuis plus de 35 ans et pâturées de manière plus intensive. Enfin, un parc témoin non pâturé a été mis en place en 1987. Le parcours est peu productif et consiste en une végétation dominée par des graminées herbacées pérennes et des dicotylédones. La part d'espèces ligneuses correspond à environ 20-25% de la surface (Fig. 7, Molénat *et al.* 2005).

Plusieurs études ont été réalisées sur ce site entre 2006 et 2014 autour de deux grandes problématiques : (1) l'effet de l'exclusion du pâturage et du traitement de fertilisation (Chollet *et al.* 2014; Bumb *et al.* 2016) et (2) l'effet d'un gradient de profondeur de sol (Bernard-Verdier *et al.* 2012) sur les traits des espèces et des communautés végétales. Le domaine de la Fage possède une richesse spécifique très élevée puisque plus de 300 espèces de plantes y ont été identifiées. Au total, 86 espèces caractéristiques des différents traitements ont été sélectionnées et caractérisées par la mesure de traits.

En 2015, 24 espèces représentatives des trois traitements du domaine (témoin, pâturé non fertilisé et pâturé fertilisé) ont été sélectionnées pour la mesure de traits foliaires et biomécaniques réalisées au cours de la thèse.

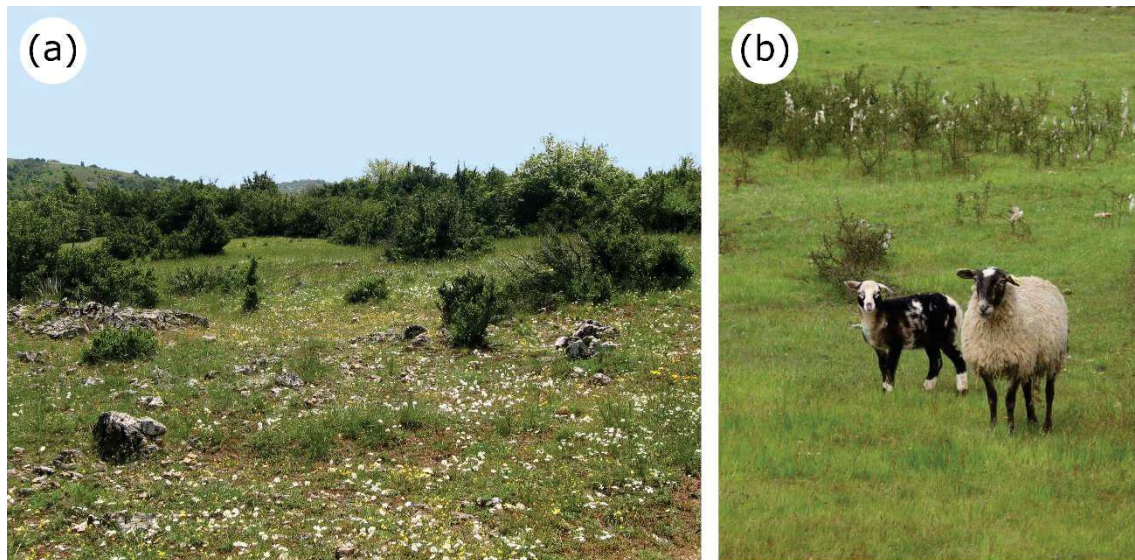


FIGURE 7 | Parcelle (a) de la station expérimentale de la Fage sur le plateau des Grands Causes (b) pâturée par un troupeau ovin.

2.3 Expérimentations en jardin commun

Deux expérimentations ont été réalisées au terrain d'expérience de Camp Redon (43°38'N, 3°52'E, 57m) au CEFÉ de Montpellier.

(1) En 2003, 18 espèces provenant du site des hautes garrigues du Montpelliérais ont été transplantées par graines ou éclats au terrain d'expérience. Quatre monocultures par espèce ont été mises en place en jardin commun, dans des parcelles de 1.2 * 1.2 m et selon deux niveaux d'apport en azote (Kazakou *et al.* 2006; Kazakou *et al.* 2014) (Fig. 8a).

(2) En 2015, les 24 espèces sélectionnées sur le domaine de la Fage (témoin, pâturé non fertilisé et pâturé fertilisé) ont été transplantées au terrain d'expérience. Huit individus par espèces et par traitement ont été mis en culture dans des pots individuels à partir de graines (pour les annuelles) ou d'individus adultes (pour les pérennes) (Fig. 8b).

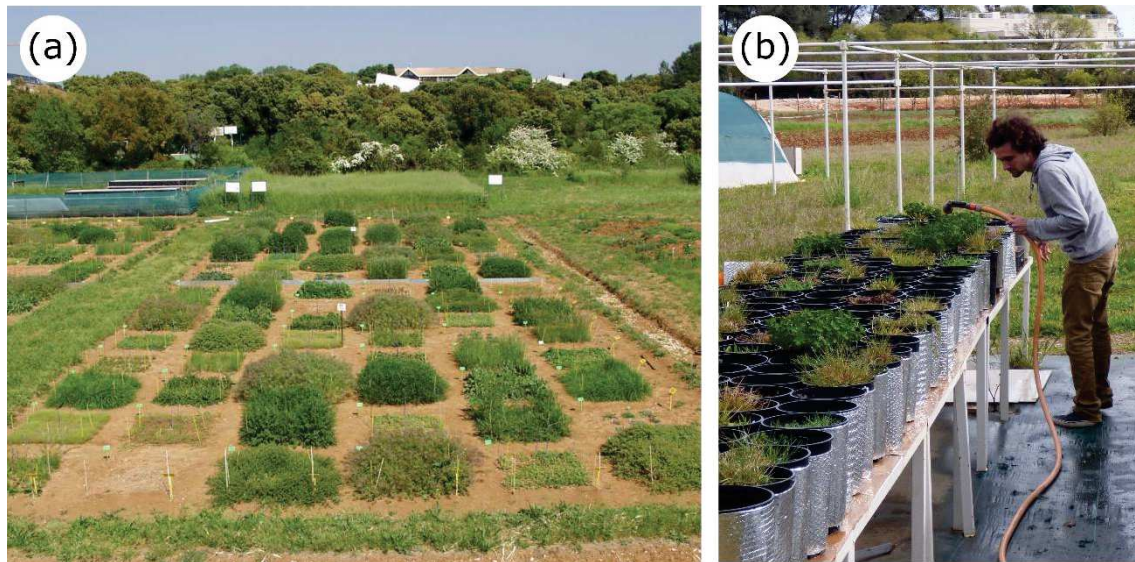


FIGURE 8 | Terrain d'expériences de Camp Redon à Montpellier. (a) Monocultures de 18 espèces provenant de la succession secondaire des hautes garrigues du Montpelliérais et (b) culture en pots de 24 espèces de la station expérimentale de la Fage.

3 RÉFÉRENCES

- Aronson, J., Le Floch, E., David, J.-F., Dhillon, S., Abrams, M., Guillermin, J.-L. & Grossmann, A. (1998) Restoration ecology studies at Cazarils (southern France): biodiversity and ecosystem trajectories in a mediterranean landscape. *Landscape and Urban Planning*, **41**, 273-283.
- Aschmann, H. (1973) Distribution and peculiarity of Mediterranean ecosystems. *Mediterranean type ecosystems - Origin and structure* (eds F. di Castri & H.A. Mooney), pp. 11-19. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Bernard-Verdier, M., Navas, M.-L., Vellend, M., Violle, C., Fayolle, A. & Garnier, E. (2012) Community assembly along a soil depth gradient: contrasting patterns of plant trait convergence and divergence in a Mediterranean rangeland. *Journal of Ecology*, **100**, 1422-1433.
- Bumb, I., Garnier, E., Bastianelli, D., Richarte, J., Bonnal, L. & Kazakou, E. (2016) Influence of management regime and harvest date on the forage quality of rangelands plants: the importance of dry matter content. *AoB Plants*, **8**, plw045.
- Chollet, S., Rambal, S., Fayolle, A., Hubert, D., Foulquié, D. & Garnier, E. (2014) Combined effects of climate, resource availability, and plant traits on biomass produced in a Mediterranean rangeland. *Ecology*, **95**, 737-748.
- Daget, P. (1977) Le bioclimat méditerranéen: caractères généraux, modes de caractérisation. *Vegetatio*, **34**, 1-20.
- Debussche, M., Lepart, J. & Dervieux, A. (1999) Mediterranean landscape changes: evidence from old postcards. *Global Ecology and Biogeography*, **8**, 3-15.
- Garnier, E., Cortez, J., Billès, G., Navas, M.-L., Roumet, C., Debussche, M., Laurent, G., Blanchard, A., Aubry, D. & Bellmann, A. (2004) Plant functional markers capture ecosystem properties during secondary succession. *Ecology*, **85**, 2630-2637.
- Kazakou, E., Vile, D., Shipley, B., Gallet, C. & Garnier, E. (2006) Co-variations in litter decomposition, leaf traits and plant growth in species from a Mediterranean old-field succession. *Functional Ecology*, **20**, 21-30.
- Kazakou, E., Violle, C., Roumet, C., Navas, M.L., Vile, D., Kattge, J. & Garnier, E. (2014) Are trait-based species rankings consistent across data sets and spatial scales? *Journal of Vegetation Science*, **25**, 235-247.
- Médail, F. & Myers, N. (2004) Mediterranean Basin. *Hotspots revisited: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions* (eds R.A. Mittermeier, P. Robles Gil, M. Hoffmann, J. Pilgrim, T. Brooks, C.G. Mittermeier, J. Lamoreaux & G.A.B. da Fonseca), pp. 144-147. CEMEX (Monterrey), Conservation International (Washington) & Agrupación Sierra Madre (Mexico).
- Molénat, G., Foulquié, D., Autran, P., Bouix, J., Hubert, D., Jacquin, M., Bocquier, F. & Bibé, B. (2005) Pour un élevage ovin allaitant performant et durable sur parcours: un système expérimental sur le Causse du Larzac. *INRA Productions animales*, **18**, 323-338.
- Nahal, I. (1981) Mediterranean climate from a biological viewpoint. *Ecosystems of the World XI. Mediterranean-type shrublands* (eds F. Di Castri, D.W. Goodall & R.L. Specht). Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.
- Navas, M.L., Roumet, C., Bellmann, A., Laurent, G. & Garnier, E. (2010) Suites of plant traits in species from different stages of a Mediterranean secondary succession. *Plant Biology*, **12**, 183-196.
- Quézel, P. & Médail, F. (2003) *Ecologie et biogéographie des forêts du bassin méditerranéen*. Elsevier, Paris.
- Sack, L., Ball, M.C., Brodersen, C., Davis, S.D., Des Marais, D.L., Donovan, L.A., Givnish, T.J., Hacke, U.G., Huxman, T. & Jansen, S. (2016) Plant hydraulics as a central hub integrating plant and ecosystem function: meeting report for 'Emerging Frontiers in Plant Hydraulics' (Washington, DC, May 2015). *Plant, cell & environment*, **39**, 2085-2094.
- Thompson, J.D. (2005) *Plant evolution in the Mediterranean*. Oxford University Press.
- Vile, D., Shipley, B. & Garnier, E. (2006) A structural equation model to integrate changes in functional strategies during old-field succession. *Ecology*, **87**, 504-517.

- Volaire, F. (2018) A unified framework of plant adaptive strategies to drought: crossing scales and disciplines. *Global Change Biology*.
- Walter, H., Harnickell, E. & Mueller-Dombois, D. (1975) *Climate-diagram Maps of the Individual Continents and the Ecological Climatic Regions of the Earth*. Springer-Verlag, Berlin.





Chapitre 2

Quelle est la meilleure date pour fleurir et disperser ? Phénologie de la reproduction en Méditerranée



RESEARCH ARTICLE

When is the best time to flower and disperse? A comparative analysis of plant reproductive phenology in the Mediterranean

Jules Segrestin¹  | Maud Bernard-Verdier¹  | Cyrille Violle¹  | Jean Richarte² | Marie-Laure Navas² | Eric Garnier¹ 

¹CEFE, CNRS, University of Montpellier, Université Paul Valéry Montpellier 3, EPHE, IRD, Montpellier Cedex 5, France

²CEFE, Montpellier SupAgro, CNRS, University of Montpellier, Université Paul Valéry Montpellier 3, EPHE, IRD, Montpellier, France

Correspondence

Jules Segrestin

Email: jsegrestin@gmail.com

Present address

Maud Bernard-Verdier, Freie Universität Berlin, Institute of Biology, Königin-Luise Straße 1-3, Berlin 14195, Germany.

Handling Editor: C. E. Timothy Paine

Abstract

1. The phenology of organisms corresponds to the temporal match between the components of their life cycle and the seasonal distribution of resources and hazards. Flowering has been extensively studied to describe the reproductive phenology of plants, but in comparison, other key events for reproductive success such as the seed maturation period and the time of seed dispersal have been considerably less investigated.
2. This study describes the temporal sequence of onset of flowering and seed dispersal, and the time necessary to mature seeds in 138 species growing in the strongly seasonal climate of Mediterranean southern France. Data for the three traits were compiled from several original surveys to characterize the reproductive phenology of 47 annual, 67 perennial herbaceous and 24 low stature woody species. The timing of these three phases was assessed in relation to local climatic conditions, and the degree to which they were coordinated was tested.
3. All three phenological traits spanned a wide range of values from early spring to late summer. Annuals flowered slightly earlier than perennials but the largest difference between these groups was found for the seed maturation period, which was much shorter in annuals. This resulted in earlier dispersal dates in these species, which occurred before periods of high water deficit. Significant positive correlations were found between onset of flowering, onset of seed dispersal and seed maturation period. This suggests a consistent pattern of coordination between the different phases of reproductive phenology across species.
4. Our results show that while the time slot for flowering appears restricted to periods with adequate temperature and water availability for most species, the seed maturation period and dispersal phase can occur during periods of substantial water deficit, at least for perennials. They also suggest that the different species can be arrayed along a fast-slow continuum based on reproductive events, from early flowering species with short seed maturation and early dispersal to late flowering species with long seed maturation and late dispersal. Whether this relates to the postulated fast-slow continuum identified for the functioning of vegetative organs is a promising avenue for future research.

KEYWORDS

comparative ecology, flowering, Mediterranean climate, reproductive phenology, seed dispersal, seed maturation period

1 | INTRODUCTION

The timing of developmental stages in a plant life cycle such as dormancy, onset of vegetative growth, reproduction and senescence is critical to their adaptation to local environment and as such is an important component of ecological strategies (Grime, 1977; Lechowicz, 2002; Wolkovich & Cleland, 2014). The seasonal variations in abiotic and biotic factors such as photoperiod, temperature, resources availability (e.g., water, nutrients and pollinators) and hazards (e.g., frost, disturbances and pathogen abundance) have been identified as major drivers of plant phenology (Primack, 1987; Rathcke & Lacey, 1985). Particular combinations of these factors result in favourable periods for plant development and constrain the range of possible phenological strategies in a given place (Forrest & Miller-Rushing, 2010; Rathcke & Lacey, 1985; Satake, 2010). It has been shown in particular that the predictability of plant phenology increases with the climate seasonality: in temperate environments, plant activity is constrained during frost free and water available periods (Pau et al., 2011) and in tropical environments, while tree species flower all year around in aseasonal climate with unpredictable duration and intensity, they are often synchronized with the dry season in places with annual fluctuation of water availability (Sakai, 2001; van Schaik, Terborgh, & Wright, 1993). Reproductive phenology, which describes the transition from vegetative to reproductive growth, is key for the evolutionary and ecological successes in plants, by affecting both survival and reproduction. The timing of flowering in particular has been shown to be under strong selection, as demonstrated by fast adaptive changes in response to climate changes (Franks, Sim, & Weis, 2007) or pollinator asynchrony (Visser & Holleman, 2001). Much less is known about other aspects of reproductive phenology, however, such as the patterns of seed maturation length and seed dispersal time.

Flowering, seed development and dispersal are events of the reproductive phase which typically follow in sequence. Some degree of coordination among these phases has been shown or postulated: for example, a strong correlation between the time of flowering and the time of seed dispersal is observed across herbaceous species of temperate regions (reviewed in Garnier, Navas, & Grigulis, 2016), while Primack (1987) suggested that in seasonal environments, a long time to mature seeds (and fruits) implies early flowering, in order to have sufficient time for seed maturation before the onset of the unfavourable season. This was further conceptualized into the time-size trade-off hypothesis which states that in herbaceous plants, plants that flower early have little time for maternal plant growth resulting in smaller size at time of reproduction, and thus fewer resources available to produce seeds, but a longer time to mature them. By contrast, plants that flower late grow bigger, but the

time before the unfavourable period is short, leading to potential exposure to stressful conditions during the seed maturation period (Bolmgren & Cowan, 2008; Primack, 1987). Late flowering species can therefore either (1) mature seeds before the unfavourable period, (2) tolerate these conditions during the maturation phase or (3) stop development during the unfavourable period and resume when conditions improve. In the first case, a triangular shape relationship between flowering time and seed maturation period is expected, with early flowering species having short or long seed maturation period (base of the triangle), and late flowering species having a short maturation period only (tip of the triangle). In the two other cases, there might not be any significant correlation between these two phenological events, unless other physiological constraints operate (cf. Primack, 1987). The timing of seed dispersal, which is under strong selection as well (Primack, 1987; Willson & Traveset, 2000 for reviews), will thus modulate the relationship between flowering time and seed maturation period. In particular, if there is more variation in seed dispersal time than in flowering time among species, the seed maturation period will be more tightly controlled by dispersal than by flowering.

Flowering phenology has been intensively studied in recent years, either in relation to climatic changes (e.g., Bock et al., 2014; Fitter & Fitter, 2002) or in the context of community and ecosystem ecology (e.g., Craine, Wolkovich, Gene Towne, & Kembel, 2012; Garnier et al., 2007), but the timing of other phenological events has not been considered in such studies. Yet, reproductive events beyond flowering are also key for plant reproductive success (Chuine, 2010; Primack, 1987; Rathcke & Lacey, 1985) by impacting such important components of life history as seed size at maturity, synchronization with dispersal agents and seedling establishment (Fenner, 1998; Heydel & Tackenberg, 2017 and references therein). Detailed descriptions of vegetative and reproductive stages for a large number of species are available (see Floret, Galan, Le Floc'h, Leprince, & Romane, 1989; Schwartz, 2003 for syntheses), but to our knowledge, these data have not been used to test the various possibilities of coordination among reproductive phases discussed above.

The objective of this study was to compare the temporal sequence of reproductive events and their association with climatic constraints (in particular water deficit) across 138 species differing in growth forms, pollination and dispersal modes, growing in the Mediterranean region of southern France. Mediterranean climate, characterized by a high seasonality in temperature and water availability, with a marked summer drought (Daget, 1977b), places strong constraints on plant phenology. It provides only two favourable windows for plant development: (1) late winter and spring, after the late frosts and before the summer drought, and (2) autumn, after the first rainfalls and before early winter

frosts (Kummerow, 1983). Accordingly, flowering phenology in these Mediterranean plant communities is bimodal (Thompson, 2005). However, since this bimodality is strongly asymmetric with a majority of species reproducing in spring (cf. Thompson, 2005 and references therein), the present study concentrates on the first of these two periods. We address the following questions: (1) How are onset of flowering, onset of seed dispersal and seed maturation period distributed in relation to the seasonal variations of temperature and water availability characteristic of a Mediterranean climate? (2) Is there any coordination among these three phases of reproductive phenology? (3) If yes, what are the relationships among these phases? And (4) how do the distribution of reproductive events and their coordination vary among different groups of species? In particular, we expect differences among (1) annuals, herbaceous and woody perennials, which are likely to cope in different ways with summer drought (Chiariello, 1989; Navas, Roumet, Bellmann, Laurent, & Garnier, 2010; Thompson, 2005); (2) species with different pollination agents: animal-pollinated species depend on animal presence and should be more synchronized in their flowering towards a specific period as compared to wind-pollinated species; and (3) species with different dispersal agents: given that animal-dispersed seeds tend to be larger than wind-dispersed seeds (Moles et al., 2005) and that the size of seeds depends on the time necessary to mature them (Heydel & Tackenberg, 2017; Moles & Westoby, 2003), species with animal-dispersed seeds should have a longer seed maturation period than species with wind-dispersed seeds. Finally, since there is evidence of phylogenetic conservatism for some phenological events (date of appearance of first flower in particular; Davies et al., 2013), we controlled for phylogenetic correlation structure in our analyses.

2 | MATERIALS AND METHODS

This study is based on a dataset which combines data for 138 species (see Table S1 in Supporting Information), collected during several phenological surveys conducted between 1998 and 2010 in four sites located in the Mediterranean region of Southern France (Table 1).

2.1 | Location of study sites and calculation of environmental variables

The climates of study sites are classified as Mediterranean humid to subhumid, with a marked summer drought, frosts in winter and unpredictability of precipitation in timing and amount, with generally frequent heavy rainfall events in autumn (Daget, 1977a) (Figure 1). Daily values of temperature, precipitation and Penman–Monteith evapotranspiration (PET) were taken from meteorological stations closest to the sites, over the 1981 to 2010 period. Values show a temperature and precipitation gradient among the four sites from warmer and dryer coastal sites (Camp Redon) to cooler and wetter inland sites (La Fage). The total annual growing degree days (GDDa) (Bonhomme, 2000), which represents the heat accumulation suitable for plant growth (calculated between a 5°C base temperature and an upper threshold of 18°C: cf. Ansquer et al., 2009) throughout the year, is substantially lower in La Fage as compared to the other three sites (Table 1, Figure S1).

In each site, total available water (TAW) was assessed as the difference between the soil water content at field capacity (FC) and the soil water content at permanent wilting point (PWP) (TAW = FC – PWP). This value, expressed in millimetres, represents the maximal amount of water available for plant growth per soil area.

TABLE 1 Characterization of the four study sites. Climatic data are based on daily climatic measurements averaged over the 1981–2010 period, taken from the meteorological stations closest to the sites (on site for FAG and CRE and at Saint-Martin-de-Londres [43°47′06″N; 3°43′48″E; 194 m] and Vic Le Fesq [43°52′12″N; 4°04′18″E; 45 m] for CAZ and HGM). GDDa (Bonhomme, 2000) is the total annual growing degree days, calculated as the sum of daily mean temperatures higher than a 5°C base temperature and lower than 18°C, for every day of the year. TAW is the total available water in the soil at full capacity. PETa is the annual potential evapotranspiration calculated using the Penman–Monteith equation

	La Fage experimental station (FAG)	Cazarils (CAZ)	Montpelliérais old field succession (HGM)	Camp Redon (CRE)
Longitude	43°55′N	43°46′N	43°51′N	43°38′N
Latitude	3°05′E	3°42′E	3°56′E	3°52′E
Altitudinal range (m)	765–830	240–310	100–160	55–58
Shortest distance to the Mediterranean sea (km)	≈80	≈35	≈35	≈15
Mean annual temperature (°C)	9.8	13.4	13.6	14.4
GDDa (°C days)	1,926	3,095	3,153	3,448
Mean annual precipitations (mm)	1,035	1,076	952	782
TAW range (mm)	26.2–48.2	63.2	55.6–56.0	60
PETa (mm)	814	1,294	1,294	1,261
Reference	Molénat et al. (2005)	Aronson et al. (1998)	Garnier et al. (2004)	Kazakou et al. (2007)

TAW values were computed using the Saxton and Rawls' (2006) method, which takes into account soil depth and texture (Table 1).

2.2 | Collection of phenological data in the study sites

Reproductive phenology was characterized at the population level, defined here as a group of individuals of the same species growing in similar conditions in the same site, during a given year. Onset of flowering ("flowering" hereafter) and dispersal ("dispersal" hereafter) was assessed in the different sites from weekly surveys, either from the monitoring of 10 marked individuals per population (in Cazarils) or from visual assessment of the first flowering and dispersing individuals in the monitored population (in Camp Redon, Montpelliérais old fields and La Fage). The list of species, and number of populations surveyed per species are given in Table S1, and a short description of the experimental sites and design is given in Appendix S1.

Overall, a total of 249 populations were surveyed across the four sites. Of the 138 species measured, 81 species were represented by one population, 55 species were represented by two to five populations and two species by more than five populations (Table S1). *Bromopsis erecta* and *Teucrium chamaedrys* were the two species most represented in the dataset with six populations each. The species surveyed included a variety of growth forms, with 47 annuals, 67 herbaceous perennials and 24 low stature woody perennials (chamaephytes). Data on main vectors of pollination and dispersal were taken from the Baseflor database (Julve, 1998): insect-mediated pollination was the most abundant pollination syndrome (105 species vs. 23 wind-pollinated species and 10 self-pollinated species). About half of the species were animal-dispersed (64 species), while 40 were gravity-dispersed and 34 were wind-dispersed species.

2.3 | Normalization of phenological data and water deficit index

To account for temperature differences between years and sites, onset of flowering and dispersal were expressed on a growing degree day basis (°C days: e.g., Diekmann, 1996) summing daily mean temperatures since 1 January of the year of measurements and using a 5°C base temperature and a 18°C threshold temperature. The length of seed maturation period ("seed maturation" hereafter) was also assessed in degree days (°C days), as the difference between the onset of flowering and the onset of dispersal (seed maturation = dispersal – flowering); it is interpreted as the minimum degree days required to produce at least one seed.

A soil water deficit index was designed to quantify water availability during the different reproductive events. Daily soil water content was estimated using a bucket-type model based on rainfall, PET and soil total available water capacity (TAW) (see Boulant et al., 2008 for model description). The simulated data were used to calculate a relative soil water content (S) as a proportion of TAW on a daily basis. The cumulative soil water deficit during the seed maturation (SWD_{SMP}) was computed for each population as follows:

$$\text{SWD}_{\text{SMP}} = \sum_{d=\text{FLO}}^{\text{DISP}} \max \left(-\ln \left(\frac{S_d}{S_{\text{lim}}} \right); 0 \right) \quad (1)$$

With S_d is the relative soil water content at day d ($d \in [\text{FLO}:\text{DISP}]$), and S_{lim} is the S value under which it is considered that water is limiting for plant growth (fixed here at 50% of the TAW). The log-transformation of the ratio reflects the loglinear relationship between soil water content and soil water potential (Hillel, 1971). The opposite value of this log ratio was used to express SWD_{SMP} in positive values: a low water availability during seed maturation results in high values of the index. SWD_{SMP} takes null (no water deficit during seed maturation) or positive values. It accounts not only for the length of the water deficit period, but also for its intensity.

2.4 | Data analyses: From population to species values

To compare phenological traits values among species, we used a method of estimation of the species mean values that takes into account potential sources of intraspecific variations. Species mean values for each phenological trait were extracted from the linear mixed models described as follows:

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ij} \quad (2)$$

With y_{ij} the phenological trait value (flowering, dispersal or seed maturation) of species i surveyed in site j ; μ : overall mean; α_i : the species i fixed effect ($i \in [1:138]$); β_j the site j random effect ($j \in [1:4]$); ε_{ij} : random error term. The sum of μ and α_i , computed for species i , called best linear unbiased predictor (BLUP: Henderson, 1975), was extracted from these models for each species and used in the analyses. This method allowed us to (1) calculate mean phenological trait values per species accounting for multiple, potentially unknown, sources of variation and (2) compute an associated standard error (SE) per species to compensate for the unbalanced experimental design and perform a global analysis using data from several surveys. Commonly used in quantitative genetic studies to assess the genetic value of plant ecotypes, it appears useful in comparative ecology where sources of variations among situations are rarely taken into account explicitly. For the sake of clarity, we will refer to "BLUPs" as "estimated means" in the following.

We consider that the estimated means can be used reliably to compare species. Indeed, the species factor was highly significant in the three models (type II ANOVA in the R package CAR—Fox & Weisberg, 2011) and the marginal R^2 , interpreted as the variance explained by both fixed and random factors (i.e., the entire model), was high (0.92 for flowering, 0.89 for dispersal and 0.69 for seed maturation). Moreover, the conditional R^2 , representing the variance explained by fixed factors only, was still high (0.79 for flowering, 0.66 for dispersal and 0.51 for seed maturation) meaning that the site factor had a low effect in comparison to the species identity.

Three other potential sources of intraspecific variation were assessed (1) fertilization, (2) grazing treatments and (3) year of measurement. Analyses conducted in FAG and CRE where two fertilization treatments were applied showed that fertilization had no significant effect on flowering, dispersal and seed maturation (Figure S2) on the species present in fertilized and unfertilized plots (cf. Appendix S1). Similarly, in FAG, we did not detect any significant effect of grazing on phenological traits for species found in grazed and ungrazed plots (Figure S3). Comparable results have been found for nitrogen fertilization (Dickinson & Dodd, 1976; Larigauderie & Kummerow, 1991) and grazing (Dickinson & Dodd, 1976). This has been interpreted as the fact that climatic constraints exert major selection pressures on phenology, while nutrient availability and herbivory can impact the intensity of flowering (e.g., number of flowers produced) and the biomass allocated to reproduction (Larigauderie & Kummerow, 1991). Fertilization and grazing were therefore not included in the estimation of the species means. The year of measurement was not included in models either, as it never improved the Akaike information criterion value by more than two points.

The procedure described above to assess species means was not applied to estimate the water deficit index at the species level (SWD_{SMP} ; Equation 1). Rather, for species surveyed several times, we selected the highest calculated SWD_{SMP} , since these were considered to be better indicators of the ability of a plant to cope with drought than average values (cf. Chiariello, 1989; Skelton, West, & Dawson, 2015). SWD_{SMP} values were log-transformed prior to analyses to fulfil normality assumptions and avoid heteroscedasticity.

2.5 | Data analyses: Statistical treatments

In order to take into account the unbalanced experimental design, SEs associated with each species estimated mean were extracted from the models described in the previous section (Equation 2) and were used to calculate a relative quality index (W) to weight the species values according to the representation of the species in the dataset as:

$$W_i = 1 - \frac{SE_i - \min(SE)}{\max(SE) - \min(SE)} \quad (3)$$

Where SE_i is the standard error associated with species i , and $\min(SE)$ and $\max(SE)$ are the minimum and the maximum SE values across all species. W varies between zero (worst estimated mean) and one (best estimated mean). The weighting factor (W) was found to be uncorrelated to their associated mean trait values per species, indicating that the weighting procedure is unbiased and could be used safely in the analyses.

The distribution of the three phenological traits (expressed in Julian days and °C days) and SWD_{SMP} values was represented by density curves computed by weighted kernel density smoothing functions.

Differences in weighted values (cf. Equation 3) of flowering, dispersal and seed maturation between growth forms, pollination and dispersal types were tested using weighted ANOVAs and weighted

post hoc Tukey's tests (R package `MULTCOMP`—Hothorn, Bretz, & Westfall, 2008). Differences in flowering variances between pollination types and in dispersal variances between dispersal types were tested using weighted Fisher tests. For the SWD_{SMP} values, differences between growth forms, pollination and dispersal types were tested using ANOVAs and post hoc Tukey's tests. In order to explain differences between species in their SWD_{SMP} , the relative effects of onset of flowering and seed maturation period were tested using a weighted multivariate ANCOVA.

Finally, correlations between traits were tested using weighted Pearson's correlation coefficients including either the whole set of species, or for species from each group. Weighted standardized major axis analyses (SMA) were performed for the estimations of the slope and intercept of significant relationships. The weighting factor (Equation 3) of the two traits were averaged and used as weightings in the analyses. The significances of the relationships and the comparisons of slopes and intercepts were performed using the R package `SMATR` (Warton, Duursma, Falster, & Taskinen, 2012).

2.6 | Phylogeny

A phylogenetic tree for the 138 species (Figure S4) was extracted from the mega-phylogeny revised by Qian and Jin (2016). All the studied genera were available in the phylogeny, and 27 missing species were branched in polytomy to the youngest common ancestor of the corresponding genus. Pagel's λ were computed to estimate the strength of the phylogenetic conservatism assuming a Brownian evolution of traits for flowering, dispersal and seed maturation using the `PHYTOOLS` R package (Revell, 2012). This estimation takes into account the SEs associated with each species trait value. In order to estimate a confidence interval for the λ estimations, a cross-validation procedure was performed by recalculating λ 1,000 times for subsamples of 90 species selected randomly. The 5% and 95% quantiles of the calculated λ were used as confidence intervals.

The comparisons between groups of species in their phenological traits were also tested accounting for phylogeny. We performed generalized least-squares models (glms) with a correlation structure (phylogeny) and a variance structure (W ; cf. Equation 3) using the R package `NLME` (Pinheiro, Bates, DebRoy, Sarker, & Team, 2012). These models were used in post hoc Tukey's tests for multiple comparisons (R package `MULTCOMP`—Hothorn et al., 2008).

Finally, relationships between phenological traits were assessed accounting for the phylogenetic correlation structure between species. To our knowledge, no tool is currently available to estimate regression coefficients using a SMA method that takes into account both weightings and a phylogenetic correlation structure. However, a pseudo- R^2 and the significance of the relationship can be computed using a glms with a correlation structure (phylogeny) and a variance structure (W) using the R package `NLME` (Pinheiro et al., 2012). In these models, the phylogenetic correlation structure was computed assuming a Brownian evolution of traits using the R package `APE` (Paradis, Claude, & Strimmer, 2004).

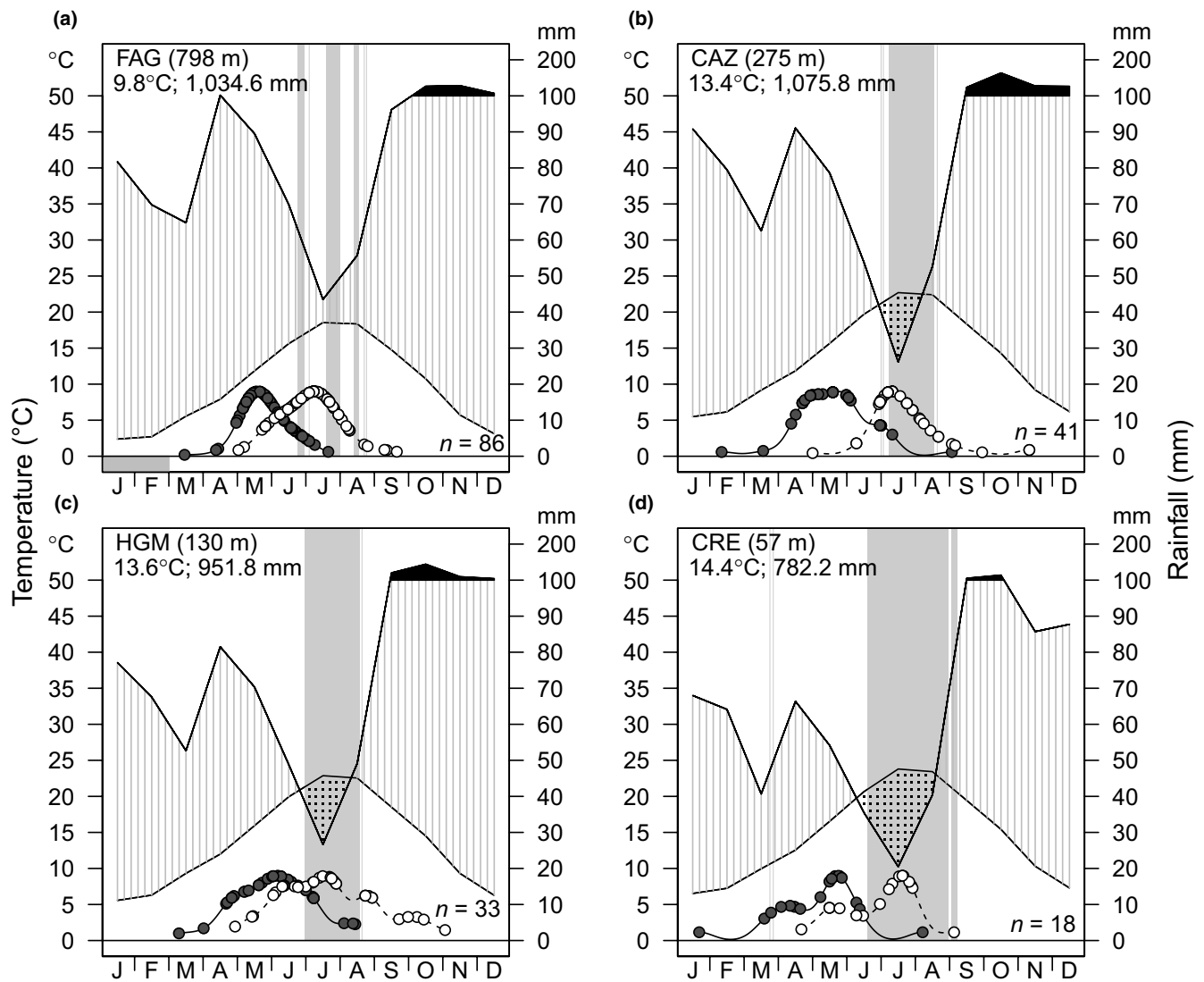


FIGURE 1 Climate diagrams (cf. Walter, Harnickell, & Mueller-Dombois, 1975) and distribution of flowering and dispersal in the four study sites: FAG (a), CAZ (b), HGM (c) and CRE (d). The dotted area identifies drought periods (rainfall < 2 * temperature). Vertical shaded areas represent the periods when the available water stock (S) computed with the one-bucket model is lower than 50% of the total available water ($S < S_{lim}$), averaged between 1981 and 2010. At the bottom of each plot, a grey bar represents months with mean minimum temperatures below 0°C. The density distribution of the onset of flowering (black points, solid lines) and the onset of dispersal (white points, dashed lines) are displayed at the bottom of each panel. n is the number of species surveyed in each site. FAG, La Fage experimental station; CAZ, Cazarils; HGM, Montpelliérais old field succession; CRE, Camp Redon

3 | RESULTS

3.1 | Reproductive phenology, climate and phylogeny

Climate diagrams and water balance models yield comparable results to identify a typical summer drought period (when $S < S_{lim}$) in all four sites (Figure 1). The length and intensity of drought increased from FAG to CRE, in relation with the temperature and precipitation gradient between sites (Table 1). Winter was also harsher in FAG than in the other three sites.

In all sites, flowering took place mainly in spring. All species flowered during frost free and high water availability periods ($S > S_{lim}$), with some exceptions mainly in one site (HGM; Figure 1). The distribution

of flowering was almost symmetrical and unimodal in CAZ and FAG, and more complex in HGM and CRE, but all showed a peak in May. The standard deviation of onset of flowering increased from inland sites to warmer coastal sites (respectively, 20.6, 34.8, 36.6 and 42.6 days for FAG, CAZ, HGM and CRE). Dispersal mainly took place during summer, and most species began to disperse their seeds at the beginning of the drought period ($S < S_{lim}$). In all sites, the distribution of dispersal was a temporal translation of the distribution of flowering and showed a peak in July (Figure 1). The standard deviation of dispersal also increased from inland sites to warmer coastal sites (respectively, 27.8, 36, 46.9 and 35.4 days for FAG, CAZ, HGM and CRE).

When combining phenological data from the four sites, the three phenological traits, expressed in growing degree days, spanned

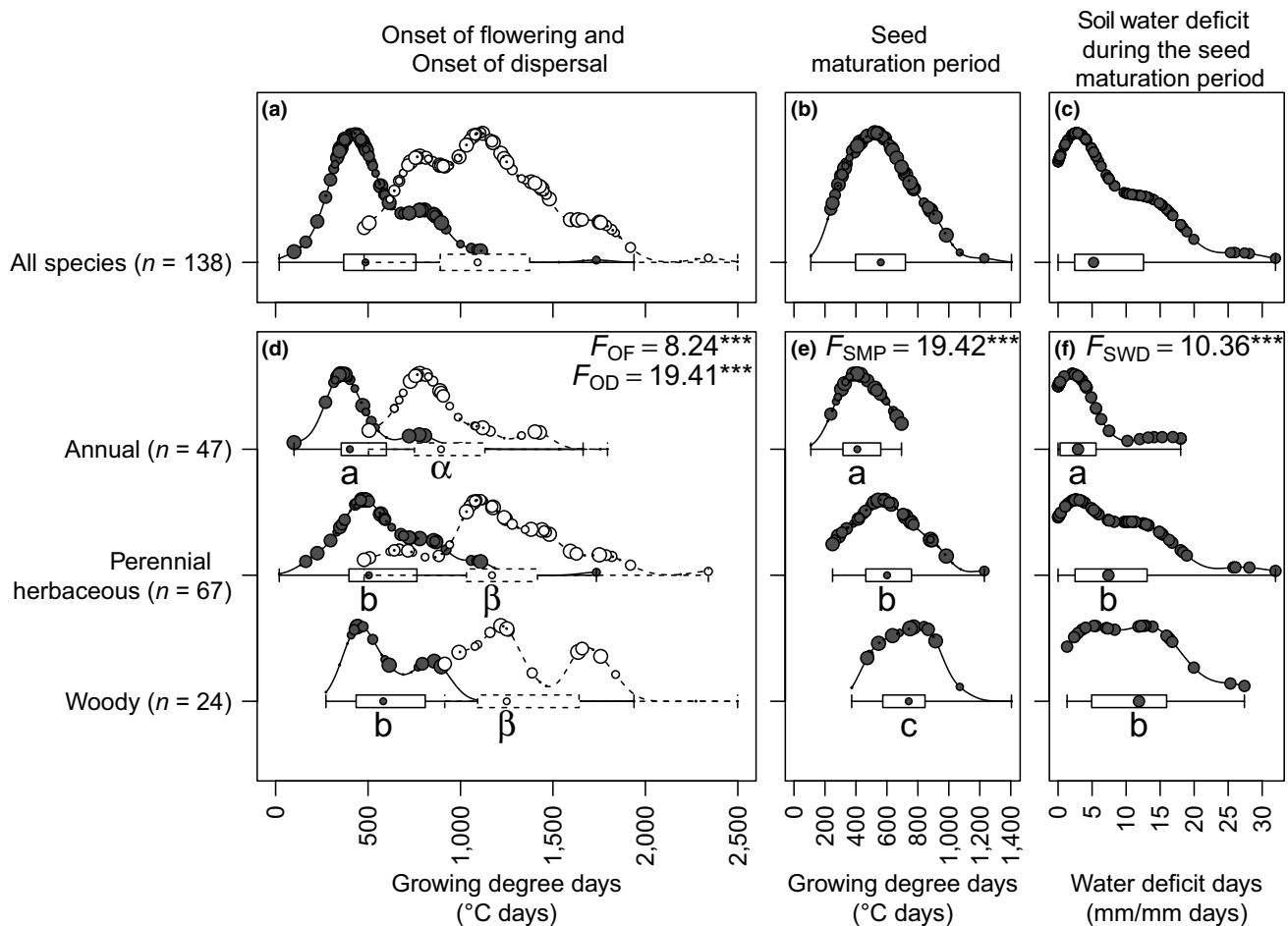


FIGURE 2 Density curves representing the distribution of the onset of flowering (panels a and d, black points, solid lines), the onset of dispersal (panels a and d, white points, dashed lines), the seed maturation period (panels b and e) and the soil water deficit during the seed maturation period (panels c and f) for all species together (panels a, b and c) and split by growth forms (panels d, e and f). On the y-axis, the distributions are represented by relative values varying between zero and one, one being the maximum density curve value. Each point represents a species and its size is proportional to the weighting factor W (Equation 3 in text). The boxplots under each density curve describe the quartiles of the distributions. The F -values of ANOVAs testing for differences between growth forms are shown on each panel (significance levels is: $***: p < .001$). For each trait, growth forms that do not share the same letter are significantly different (Tukey's test with $p < .05$)

a wide range of values across species. Onset of flowering ranged from 19.6°C days (*Viola alba*) to 1,938.3°C days (*Ruscus aculeatus*) which corresponds respectively to February and August, with some variation depending on the site and year (see Figure S1 for the correspondence between degree day values and day of the year in each site). Standard errors for species onset of flowering were reasonably low and ranged from 56.8°C days (*Arenaria serpyllifolia*) to 100.4°C days (*Aegilops geniculata*, *Catananche caerulea*, *Phleum pratense* and *Thymus vulgaris*). The distribution of flowering showed a clear peak around 450°C days, reached in May (Figure 2a). Onset of seed dispersal values ranged from 478.4°C days (*Taraxacum fulvum*) to 2,498.6°C days (*R. aculeatus*), which corresponds, respectively, to May and October. This distribution of dispersal displayed two peaks, respectively, around 800°C days (June) and 1,200°C days (July) (Figure 2a). Finally, seed maturation period values ranged from 108.8°C days (*Erigeron sumatrensis*) to 1,404.4°C days (*Centaurea aspera*), which correspond, respectively, to 12 and 114 days. The

distribution was almost symmetrical with a peak around 500°C days (Figure 2b). Standard errors for dispersal and seed maturation were also reasonably low and ranged from 115.3°C days (*A. serpyllifolia*) to 188°C days (*Betonica officinalis*) and from 73.5°C days (*A. serpyllifolia*) and 174.9°C days (*Echinops ritro*), respectively.

The maximum water deficit index experienced during seed maturation for each species (SWD_{SMP}) ranged from 0 water deficit days (mm/mm days; *Avena barbata*, *Briza media*, *Lolium multiflorum*, *Microthlaspi perfoliatum* and *Poa pratensis*) to 32 mm/mm day (*Eryngium campestre*) (see Figure S5 for interpretation of water deficit values). The distribution of SWD_{SMP} showed a peak around 3 mm/mm day and was right-skewed (Figure 2c). A higher water deficit experienced during seed maturation (weighted multivariate ANCOVA, $F = 57.64$, $df = 2$ and 135, $p \ll .001$, $R^2 = .46$) was mainly explained by longer seed maturation periods (32% of the total variation; $p \ll .01$) and secondly by later flowering (14% of the total variation; $p \ll .01$).

TABLE 2 Effects of growth form, pollination and dispersal type on flowering, dispersal, seed maturation and SWD_{SMP} values. Weighted ANOVAs were performed for flowering, dispersal, and seed maturation and simple ANOVA were performed for SWD_{SMP} (see Section “2”). *F* is the group effect *F*-value, *df* is the number of degrees of freedom for the group effect compared to the residual degrees of freedom, and *p* is the group effect *p*-value

	Onset of flowering (°C days)			Onset of dispersal (°C days)			Seed maturation period (°C days)			Soil water deficit during seed maturation period (mm/ mm days)		
	<i>F</i>	<i>df</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>df</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>df</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>df</i>	<i>p</i>
Growth form	8.24	2; 135	<.001***	19.41	2; 135	<.001***	19.42	2; 135	<.001***	10.36	2; 135	<.001***
Pollination type	4.08	2; 135	.016*	8.53	2; 135	<.001***	7.28	2; 135	<.001***	7.22	2; 135	<.001**
Dispersal type	4.28	2; 135	.016*	6.29	2; 135	.002**	14.51	2; 135	<.001***	5.11	2; 5.46	.005**

SWD_{SMP}, soil water deficit during the seed maturation. Significance levels are **p* < .05, ***p* < .01 and ****p* < .001.

A significant phylogenetic signal was detected for flowering (Pagel's $\lambda = 0.72$, CI = [0.32; 0.92], *p* < .001), while this signal was weaker for dispersal (Pagel's $\lambda = 0.58$, CI = [0.12; 0.76], *p* = .003) and seed maturation (Pagel's $\lambda = 0.32$, CI = [0.08; 0.55], *p* = .04).

3.2 | Variation in reproductive phenology between groups of species

There were significant differences in flowering, dispersal and seed maturation values among growth forms (Figure 2d,e, statistics in Table 2): annual species flowered and dispersed earlier than herbaceous perennials ($\Delta_{\text{flowering}} = -173^\circ\text{C days}$; $\Delta_{\text{dispersal}} = -325^\circ\text{C days}$) and woody species ($\Delta_{\text{flowering}} = -169^\circ\text{C days}$; $\Delta_{\text{dispersal}} = -452^\circ\text{C days}$); they also had shorter seed maturation periods than herbaceous perennial ($\Delta_{\text{maturation}} = -152^\circ\text{C days}$) and woody species ($\Delta_{\text{maturation}} = -282^\circ\text{C days}$) resulting in lower soil water deficit during their seed maturation ($\Delta_{\text{SWD}} = -2.9$ and -6 mm/mm days in comparison with herbaceous and woody perennials, respectively) (Figure 2f, statistics in Table 2). In addition, woody species had longer seed maturation period than herbaceous perennials ($\Delta_{\text{maturation}} = +130^\circ\text{C days}$). Results were qualitatively similar when phylogeny was accounted for (not shown), except for flowering which did not differ among growth forms any longer (*F* = 0.47; *df* = 2 and 135; *p* = .63).

The pollination type also had an effect on flowering, dispersal and seed maturation (Table 2). Self-pollinated species flowered and dispersed earlier than insect-pollinated species ($\Delta_{\text{flowering}} = -215^\circ\text{C days}$; $\Delta_{\text{dispersal}} = -457^\circ\text{C days}$), resulting in shorter seed maturation period ($\Delta_{\text{maturation}} = -247^\circ\text{C days}$) and lower soil water deficit during their seed maturation ($\Delta_{\text{SWD}} = -2.1$ mm/mm days). Wind-pollinated species had intermediate values and were not significantly different from other species in their reproductive phenology. These results remained qualitatively similar when accounting for phylogeny.

Finally, the dispersal type had a significant effect on reproductive phenology (Table 2): animal-dispersed species flowered slightly later than gravity-dispersed species ($\Delta_{\text{flowering}} = 128^\circ\text{C days}$) but the difference was most pronounced for dispersal ($\Delta_{\text{dispersal}} = 211$ and 218°C days later than wind-dispersed and gravity-dispersed species, respectively). Therefore, animal-dispersed species had

the longest seed maturation periods in comparison with gravity-dispersed species ($\Delta_{\text{SMP}} = 95^\circ\text{C days}$) and wind-dispersed species ($\Delta_{\text{SMP}} = 219^\circ\text{C days}$), resulting in higher soil water deficit during this period. Again, these results remained qualitatively unchanged when accounting for phylogeny.

Insect-pollinated species did not show lower variance in flowering than wind-pollinated species (*F* = 3.5, *df* = 104 and 22, *p* = .99) or self-pollinated species (*F* = 8.5, *df* = 104 and 9, *p* = .89), and animal-dispersed species did not show lower variance in dispersal than wind-dispersed (*F* = 0.67, *df* = 63 and 33, *p* = .09) or gravity-dispersed species (*F* = 0.93, *df* = 63 and 39, *p* = .38).

3.3 | Covariations among reproductive phases

Onset of flowering and onset of dispersal was positively correlated across all species (dispersal = $299 + 1.5 \times \text{flowering}$) (Figure 3a, statistics in Table 3). The correlations were conserved for annuals, herbaceous perennials and woody species (Table 3). Their regression lines shared a common slope of 1.4, but had different intercepts (respectively 216.7, 379.9 and 451.5) meaning that the species dispersed in the following order at a given flowering date: annuals < herbaceous perennials < woody perennials (see Figure S6). When phylogeny was accounted for, the relationship was still significant for all species, annuals and herbaceous perennials but not for woody species (Table 3).

Similarly, later onset of flowering was associated with longer seed maturation periods (seed maturation = $110.7 + 0.84 \times \text{flowering}$) (Figure 3b, statistics in Table 3) and the relationship remained significant when accounting for phylogeny. When the analyses were conducted by growth forms, the two traits were not correlated for annuals and herbaceous perennials, but the correlation was significant for woody perennials (see Figure S6). Although very weak, the correlations became significant for herbaceous perennials when considering phylogenetic structure, marginally significant for annuals, and not significant for woody perennials (Table 3).

Finally, longer seed maturation periods were strongly associated to later onsets of dispersal (seed maturation = $-57 + 0.56 \times \text{dispersal}$) (Figure 3c, statistics in Table 3). The correlations were conserved

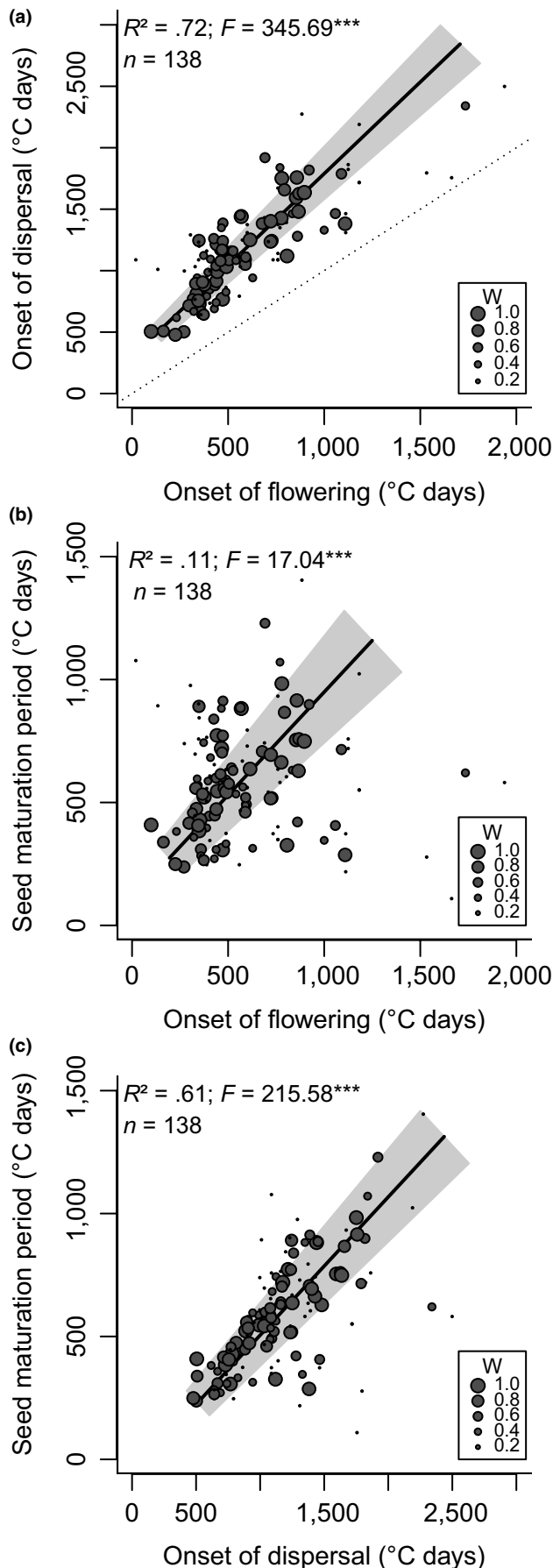


FIGURE 3 Relationships between (a) onset of flowering and onset of dispersal, (b) onset of flowering and seed maturation period and (c) onset of dispersal and seed maturation period for 138 species growing in the Mediterranean region of southern France. The sizes of the points are proportional to the weighting factor W (Equation 3 in text). The dotted line represents the 1:1 line. The F -values and R^2 of weighted SMA testing the correlation are shown on each panel (significance levels is: *** : $p < .001$). The grey area represents the 95% confidence interval of the correlation line (solid line). SMA, standardized major axis

for annuals, herbaceous perennials and woody species (Table 3). Their regression lines shared a common slope of 0.55, but had different intercepts (respectively, -96.5 , -52.2 and -45.8) meaning that annuals had the shortest seed maturation period at a given dispersal date (see Figure S6). When phylogeny was accounted for, the relationship was still significant for all species and also for annuals, herbaceous perennials and woody species taken individually (Table 3).

4 | DISCUSSION

Our study shows that, in the highly seasonal climate of Mediterranean southern France, the onset of flowering was restricted within a narrow window of time favourable for plant growth during spring, while seed maturation and dispersal were less constrained by climatic factors. The timing of reproductive events differed between annuals, herbaceous and woody perennials, for dispersal in particular. We found evidence for coordination among reproductive events, especially between seed maturation and onset of dispersal, which tends to be conserved within these groups. These different points are further discussed below.

4.1 | Constraints on plant phenology under Mediterranean climate conditions

The association between climatic variations and flowering phenology was particularly strong, with a marked synchronicity among species in spring, around 450 °C days, suggesting selection pressures (mainly climatic) towards an optimal date for plant flowering. Higher synchronicity in flowering in the La Fage site where the period favourable for plant development was shorter (due to late frost events) supports this hypothesis. This study concentrates on spring reproduction only since the bimodality of flowering is found strongly asymmetric in the Mediterranean Basin (Orshan et al., 1989; Petanidou, Ellis, Margaris, & Vokou, 1995) confirmed by the fact that of 56 species followed all year round in 2010 at La Fage site, only three perennials (*Potentilla verna*, *T. fulvum* and *Thymus dolomiticus*) also flowered during the fall (Figure S9).

The onset of dispersal was found to be substantially more variable than onset of flowering, suggesting lower climatic constraints on this phenological event. This is consistent with results from

TABLE 3 Statistics of correlation tests performed on all species (All, $n = 138$), annuals (A, $n = 47$), herbaceous perennials (Hp, $n = 67$) and woody perennials (W, $n = 24$) separately, using weights (W, Equation 3 in text) or using weights and accounting for phylogeny. Significant p -values are in bold

Correlation between	Weighted correlation				Weighted correlation accounting for phylogeny			
	F value	df	p	R^2	t Value	df	p	Pseudo- R^2
Flowering and dispersal								
All	345.7	1 and 136	<.001	.72	16.2	1 and 136	<.001	.66
A	128.6	1 and 45	<.001	.74	10.5	1 and 45	<.001	.65
Hp	142.5	1 and 65	<.001	.69	11.6	1 and 65	<.001	.79
W	67	1 and 22	<.001	.75	1.4	1 and 22	.16	.26
Flowering and maturation								
All	17	1 and 136	<.001	.11	3.9	1 and 136	<.001	.10
A	2.8	1 and 45	.10	.06	2.6	1 and 45	.012	.08
Hp	2.7	1 and 65	.11	.04	2	1 and 65	.06	.06
W	6.4	1 and 22	<.001	.23	-1.1	1 and 22	.27	.01
Dispersal and maturation								
All	215	1 and 136	<.001	.61	16.3	1 and 136	<.001	.66
A	43	1 and 45	<.001	.49	7.6	1 and 45	<.001	.55
Hp	67	1 and 65	<.001	.51	10.5	1 and 65	<.001	.63
W	57	1 and 22	<.001	.72	7.8	1 and 22	<.001	.72

agronomical studies showing a stronger sensitivity of the flowering and seed initiation phases to water deficit than the seed maturation phase for barley, wheat and maize (Saini & Westgate, 1999 and references therein). Grain development appears limited mostly by the plant capacity to supply assimilates (Rahman & Yoshida, 1985), and seed maturation can thus occur during periods of water deficit, as long as the plant can tolerate drought periods and maintain photosynthetic activity or reallocate resources to seed filling. In our study, only five species totally avoided soil water deficit during the seed maturation phase reflecting the fact that a number of species can tolerate some degree of water deficit (see also Chiariello, 1989; Navas et al., 2010; Thompson, 2005). However, the skewed distribution of SWD_{SMP} suggests that only a few can withstand very intense and extended droughts during that phase. Our dataset only describes the onset of the reproductive events and more descriptors of the overall distribution of these stages (flowering and dispersal duration) would be necessary to confirm our hypotheses in relation to climatic constraints. For example, we can expect late flowering species to show short flowering periods while early flowering species can have either short or extended flowering period before the onset of the summer drought.

The onset of flowering showed a significant phylogenetic signal, indicating that closely related species tended to flower at similar times. This result is consistent with previous large-scale comparative studies (Davies et al., 2013; Rafferty & Nabity, 2017) and can be interpreted as a consequence of the inheritance of developmental constraints and physiological design within lineages (Davies et al., 2013; Kochmer & Handel, 1986). By contrast, the onset of dispersal and seed maturation period showed only weak phylogenetic signal (but see Heydel & Tackenberg, 2017 for contrasting results), suggesting

that not all reproductive phenological phases may be constrained in a similar way. If this result were to be verified in broader comparative analyses including a larger set of species, it would indicate that, while flowering may be phylogenetically constrained, the timing of other phenological stages crucial for reproductive success may have more scope to respond and adapt to environmental change.

4.2 | Reproductive phenology in different groups of species

As found in other studies conducted in Mediterranean-type climates (Jackson & Roy, 1986; Orshan et al., 1989; Petanidou et al., 1995), annual species tended to flower slightly earlier than perennials. This can be interpreted as a result of (1) germination and growth in autumn allowing early establishment, (2) mild winters allowing plant growth and survival and (3) higher growth rate in spring allowing earlier flowering. Such differences among groups of species were not observed in other climatic regions, where no clear difference in flowering among growth forms was found in temperate settings (Grainger, 1939; Heydel & Tackenberg, 2017) nor in tropical savannas (Sarmiento & Monasterio, 1983); annuals were even found to start their flowering later than perennials in Konza prairies (Craine et al., 2012).

Most studies cited above did not report data for reproductive stages other than flowering. Our study is among the first with that of Heydel & Tackenberg (2017) to analyse data on seed maturation period for a large number of species. It allowed us to show that seed maturation was actually the main stage in the reproductive phenology that discriminates among growth forms: seed maturation was substantially shorter in annuals, which resulted in much earlier

dispersal dates in these species, allowing them to avoid situations of high water deficit during this period. Our results strengthen and generalize (Heydel & Tackenberg, 2017) findings, who also found a shorter seed maturation in annuals compared to herbaceous perennials and shrubs, but with a strongly unbalanced distribution of growth forms (respectively, 8, 89 and 7 species in their dataset); these authors did not analyse relationships between phenological phases and climate either. Plant life-history characteristics, which lead to differential priorities in the vegetative or in the reproductive structure investment, must be considered to explain these phenological patterns (Ehrlén, 2015; Forrest & Miller-Rushing, 2010; Jackson & Bliss, 1984). Indeed, a critical aspect is that annuals must guarantee a substantial seed production every year, while reproduction by seeds is less critical for perennials. Therefore, annuals might have evolved towards short seed maturation periods in order to limit exposure to hazards or damaging conditions. Perennials, by contrast, can perform longer and riskier seed maturation. Because seed maturation period correlates positively with seed mass (Heydel & Tackenberg, 2017; Moles & Westoby, 2003), perennials can thus produce larger seeds, favouring higher seedling survival (Moles & Westoby, 2004; Rees & Westoby, 1997; Smith & Fretwell, 1974). Annuals in seasonal climates are likely to produce as many small seeds as possible before possible unfavourable climatic conditions. The seed mass measured on a subset of the species studied here was indeed found to be significantly lower in annuals than in herbaceous and woody perennials (data not shown).

We found no effect of pollination type on the variance of the flowering date, which suggests a lack of selection pressure by pollinators towards specific flowering dates. A proper understanding of this result would require data about pollinator dynamics in the different sites studied, which are currently not available. However, self-pollinated species flowered significantly earlier than other species. The unbalanced representativeness of this group of species in our dataset and contrasting results found in other ecosystems (Molau, 1993) do not allow to generalize this result. Finally, the length of the seed maturation period was found to increase in the following order: wind-dispersed species < gravity-dispersed species < animal-dispersed species. This can be interpreted as an indirect effect of dispersal type on reproductive phenology through a selection on seed mass. Consistent with other studies (Heydel & Tackenberg, 2017; Leishman, Wright, Moles, & Westoby, 2000; Moles et al., 2005), seed mass on a subset of the species studied here was indeed found to be significantly lower in wind-dispersed than in animal- and gravity-dispersed species (data not shown).

4.3 | A fast-slow phenological continuum in herbaceous species?

We found significant positive relationships between the onset of flowering, onset of dispersal and duration of seed maturation. Two particular combinations of phenological strategies, (1) early flowering and long seed maturation and (2) late dispersal and short seed maturation, were not found in our dataset, suggesting a complex set

of physiological and climatic constraints on the coordination of reproductive events.

First, we did not find the triangular shape relationship expected under the time-size trade-off hypothesis (Bolmgren & Cowan, 2008; Primack, 1987): (1) no early flowering species had long seed maturation and (2) there was no evidence of a time-limitation for the seed maturation in late flowering species. Indeed, the longest seed maturation periods were achieved by late flowering species despite the higher exposure to drought. These results suggest that early flowering species might be particularly sensitive to drought during the seed maturation while later flowering allows longer vegetative growth and potentially more reserves to ensure seed maturation under water deficit conditions. This phenological pattern might thus be related to plant adaptive strategies to drought, describing a transition from drought escapers to drought avoiders or drought-tolerant plant species (Levitt, 1980). Whether these results hold for all groups of species stands as an open question however, since only the correlation for woody species remained significant when data were analysed separately for each group. Conducting experiments in more controlled conditions by following the fate of each flower individually until seed dispersal (cf. Heydel & Tackenberg, 2017) would be necessary to address this issue. Indeed, our approach which consists in combining data taken on different sites, years and environmental conditions on batches of flowers and seeds, although robust to identify broad patterns, might reveal too coarse to detect finer signals.

Second, late dispersal was never achieved with very late flowering and short seed maturation, but only with spring flowering and long seed maturation period. This result is the consequence of flowering being constrained within a narrow window of time during spring. Whether this relationship is only due to climatic constraints on flowering and seed maturation or to more complex physiological and developmental constraints should be more extensively tested in aseasonal climates, where flowering occurs regularly throughout the year. In this context, contrasting results have been found in aseasonal tropical climates: while Hamann (2004) found a positive relationship between flowering time and the duration of fruit development in tree species from a Philippine rainforest, several studies have suggested that the developmental programme of tree species in such environments is flexible enough to allow the uncoupling between flowering and seed dispersal (van Schaik et al., 1993; Wheelwright, 1985). Much less is known about the phenology of dispersal than about the phenology of flowering (Heydel & Tackenberg, 2017; Willson & Traveset, 2000), but it has been argued that the timing of dispersal is not entirely interpretable as adaptations to dispersal, but should account for constraints on earlier phases of reproduction, flowering in particular (e.g., Fenner, 1998; Willson & Traveset, 2000).

Overall, our study suggests that species can be arrayed along a continuum of phenological strategies which runs from fast species associated with early onset flowering, short seed maturation period and early dispersal, to slow species, associated with late flowering, long seed maturation and delayed dispersal. The finding that fast-growing herbaceous species reach their maximum height early in

the growing season and flower rapidly afterwards (Sun & Frelich, 2011) further suggests that the fast-slow continuum of reproductive phenology highlighted in our study might be related to the fast-slow continuum of plant functioning in the vegetative phase (Reich, 2014). Testing this hypothesis would require further studies involving simultaneous assessments of vegetative and reproductive markers of plant developmental rhythms (e.g., relative growth rate, leaf production rate, flowering date, flowering period, seed maturation period).

5 | CONCLUSIONS

Our study is among the first to analyse the temporal sequence of reproductive events and their covariations in a large number of species differing in life cycles, pollination and dispersal modes. There was a clear association between the temporality of these phases and the strong seasonality of climatic conditions in the Mediterranean, especially in relation to water availability. Phenological strategies were also found to differ among species differing in their life cycle and dispersal mode. Our study challenges the time-size trade-off hypothesis of reproduction in herbaceous plants. Instead, it suggests that these species can be arrayed along a fast-slow continuum based on reproductive events. Whether this relates to the postulated fast-slow continuum of plant functioning in the vegetative phase (Reich, 2014) is a promising avenue for future research.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the many students involved in the field work and data collection. We thank the technical staff of the La Fage INRA experimental station and the "Terrain d'expérience" platform at CEFE (technical facilities of the Labex Centre Mediterranean de l'Environnement et de la Biodiversité, CeMEB) for facilities and support to carry out the field work. The datasets used in this study were collected during several projects supported by the EU "VISTA" (Vulnerability of Ecosystem Services to Land Use Change in Traditional Agricultural Landscapes) programme (contract number EVK2-2001-000356), the French national programme PNBC "GEOTRAITS," the French national INRA-EcoGer project DivHerbe (Structure, diversité et fonctionnement: des clés multi-échelles pour la gestion des prairies permanents) and the "ACI Ecologie Quantitative" (French Ministry of Research and Technology) Program: "Interactions entre biodiversité et fonctionnement dans les écosystèmes terrestres: aspects fondamentaux et appliqués."

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

J.S., E.G. and M.-L.N. designed the study. J.R., M.B.-V., M.-L.N., C.V. and E.G. collected the data. J.S. analysed the data. J.S., E.G. and M.-L.N. wrote the article with contributions from C.V. and M.B.-V. All authors contributed critically to the drafts and gave final approval for publication.

DATA ACCESSIBILITY

Data are deposited in the Dryad Digital Repository <https://doi.org/10.5061/dryad.3qp36g8> (Segrestin et al., 2018).

ORCID

Jules Segrestin  <http://orcid.org/0000-0001-7661-6061>

Maud Bernard-Verdier  <http://orcid.org/0000-0003-4240-9560>

Cyrille Violle  <http://orcid.org/0000-0002-2471-9226>

Eric Garnier  <http://orcid.org/0000-0002-9392-5154>

REFERENCES

- Ansquer, P., Al Haj Khaled, R., Cruz, P., Theau, J.-P., Therond, O., & Duru, M. (2009). Characterizing and predicting plant phenology in species-rich grasslands. *Grass and Forage Science*, 64, 57–70. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.2008.00670.x>
- Aronson, J., Le Floch, E., David, J.-F., Dhillon, S., Abrams, M., Guillermin, J.-L., & Grossmann, A. (1998). Restoration ecology studies at Cazarils (southern France): Biodiversity and ecosystem trajectories in a mediterranean landscape. *Landscape and Urban Planning*, 41, 273–283. [https://doi.org/10.1016/S0169-2046\(98\)00065-6](https://doi.org/10.1016/S0169-2046(98)00065-6)
- Bock, A., Sparks, T. H., Estrella, N., Jee, N., Casebow, A., Schunk, C., ... Menzel, A. (2014). Changes in first flowering dates and flowering duration of 232 plant species on the island of Guernsey. *Global Change Biology*, 20, 3508–3519. <https://doi.org/10.1111/gcb.12579>
- Bolmgren, K., & Cowan, P. D. (2008). Time–size tradeoffs: A phylogenetic comparative study of flowering time, plant height and seed mass in a north-temperate flora. *Oikos*, 117, 424–429. <https://doi.org/10.1111/j.2007.0030-1299.16142.x>
- Bonhomme, R. (2000). Bases and limits to using 'degree. day' units. *European Journal of Agronomy*, 13, 1–10. [https://doi.org/10.1016/S1161-0301\(00\)00058-7](https://doi.org/10.1016/S1161-0301(00)00058-7)
- Boulant, N., Kunstler, G., Rambal, S., & Lepart, J. (2008). Seed supply, drought, and grazing determine spatio-temporal patterns of recruitment for native and introduced invasive pines in grasslands. *Diversity and Distributions*, 14, 862–874.
- Chiariello, N. (1989). Phenology of California grasslands. In L. F. Huenneke, & H. A. Mooney (Eds.), *Grassland structure and function* (pp. 47–58). Dordrecht: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-3113-8>
- Chaine, I. (2010). Why does phenology drive species distribution? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 365, 3149–3160. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0142>
- Craine, J. M., Wolkovich, E. M., Gene Towne, E., & Kembel, S. W. (2012). Flowering phenology as a functional trait in a tall-grass prairie. *New Phytologist*, 193, 673–682. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03953.x>
- Daget, P. (1977a). Le bioclimat méditerranéen: analyse des formes climatiques par le système d'Emberger. *Vegetatio*, 34, 87–103. <https://doi.org/10.1007/BF00054477>
- Daget, P. (1977b). Le bioclimat méditerranéen: caractères généraux, modes de caractérisation. *Vegetatio*, 34, 1–20. <https://doi.org/10.1007/BF00119883>
- Davies, T. J., Wolkovich, E. M., Kraft, N. J., Salamin, N., Allen, J. M., Ault, T. R., ... Cook, B. I. (2013). Phylogenetic conservatism in plant phenology. *Journal of Ecology*, 101, 1520–1530. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12154>
- Dickinson, C., & Dodd, J. L. (1976). Phenological pattern in the short-grass prairie. *American Midland Naturalist*, 96, 367–378. <https://doi.org/10.2307/2424076>

- Diekmann, M. (1996). Relationship between flowering phenology of perennial herbs and meteorological data in deciduous forests of Sweden. *Canadian Journal of Botany*, 74, 528–537. <https://doi.org/10.1139/b96-067>
- Ehrlén, J. (2015). Selection on flowering time in a life-cycle context. *Oikos*, 124, 92–101. <https://doi.org/10.1111/oik.01473>
- Fenner, M. (1998). The phenology of growth and reproduction in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 1, 78–91. <https://doi.org/10.1078/1433-8319-00053>
- Fitter, A. H., & Fitter, R. S. R. (2002). Rapid changes in flowering time in British plants. *Science*, 296, 1689–1691. <https://doi.org/10.1126/science.1071617>
- Floret, C., Galan, M. J., Le Floch, E., Leprince, F., & Romane, F. (1989). Description of plant annual cycles (France). In G. Orshan (Ed.), *Plant phenological studies in Mediterranean type ecosystems* (pp. 9–97). Dordrecht: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-3107-7>
- Forrest, J., & Miller-Rushing, A. J. (2010). Toward a synthetic understanding of the role of phenology in ecology and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 365, 3101–3112. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0145>
- Fox, J., & Weisberg, S. (2011). *Car: Companion to applied regression*. Retrieved from <http://CRAN.R-project.org/package=car>.
- Franks, S. J., Sim, S., & Weis, A. E. (2007). Rapid evolution of flowering time by an annual plant in response to a climate fluctuation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 1278–1282. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608379104>
- Garnier, E., Cortez, J., Billès, G., Navas, M.-L., Roumet, C., Debussche, M., ... Bellmann, A. (2004). Plant functional markers capture ecosystem properties during secondary succession. *Ecology*, 85, 2630–2637. <https://doi.org/10.1890/03-0799>
- Garnier, E., Lavorel, S., Ansquer, P., Castro, H., Cruz, P., Dolezal, J., ... Golodets, C. (2007). Assessing the effects of land-use change on plant traits, communities and ecosystem functioning in grasslands: A standardized methodology and lessons from an application to 11 European sites. *Annals of Botany*, 99, 967–985. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl215>
- Garnier, E., Navas, M.-L., & Grigulis, K. (2016). *Plant functional diversity: Organism traits, community structure, and ecosystem properties*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Grainger, J. (1939). Studies upon the time of flowering of plants: Anatomical, floristic and phenological aspects of the problem. *Annals of Applied Biology*, 26, 684–704. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1939.tb06994.x>
- Grime, J. (1977). Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *The American Naturalist*, 111, 1169–1194. <https://doi.org/10.1086/283244>
- Hamann, A. (2004). Flowering and fruiting phenology of a Philippine submontane rain forest: Climatic factors as proximate and ultimate causes. *Journal of Ecology*, 92, 24–31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2004.00845.x>
- Henderson, C. R. (1975). Best linear unbiased estimation and prediction under a selection model. *Biometrics*, 31, 423–447. <https://doi.org/10.2307/2529430>
- Heydel, F., & Tackenberg, O. (2017). How are the phenologies of ripening and seed release affected by species' ecology and evolution? *Oikos*, 126, 738–747. <https://doi.org/10.1111/oik.03442>
- Hillel, D. (1971). *Soil and water: Physical principles and processes*. New York, NY: Academic Press.
- Hothorn, T., Bretz, F., & Westfall, P. (2008). Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical Journal*, 50, 346–363. [https://doi.org/10.1002/\(ISSN\)1521-4036](https://doi.org/10.1002/(ISSN)1521-4036)
- Jackson, L. E., & Bliss, L. (1984). Phenology and water relations of three plant life forms in a dry tree-line meadow. *Ecology*, 65, 1302–1314. <https://doi.org/10.2307/1938335>
- Jackson, L., & Roy, J. (1986). Growth patterns of Mediterranean annual and perennial grasses under simulated rainfall regimes of southern France and California. *Acta Oecologica. Oecologia Plantarum*, 7, 191–212.
- Julve, P. (1998). *Baseflor. Index botanique, écologique et chorologique de la flore de France*. Retrieved from <http://philippe.julve.pagesperso-orange.fr/catminat.htm>.
- Kazakou, E., Garnier, E., Navas, M.-L., Roumet, C., Collin, C., & Laurent, G. (2007). Components of nutrient residence time and the leaf economics spectrum in species from Mediterranean old-fields differing in successional status. *Functional Ecology*, 21, 235–245. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2006.01242.x>
- Kochmer, J. P., & Handel, S. N. (1986). Constraints and competition in the evolution of flowering phenology. *Ecological Monographs*, 56, 303–325. <https://doi.org/10.2307/1942549>
- Kummerow, J. (1983). Comparative phenology of Mediterranean-type plant communities. In F. J. Kruger, D. T. Mitchell & J. U. M. Jarvis (Eds.), *Mediterranean-type ecosystems. The role of nutrients* (pp. 300–317). Berlin: Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-68935-2>
- Larigauderie, A., & Kummerow, J. (1991). The sensitivity of phenological events to changes in nutrient availability for several plant growth forms in the arctic. *Ecography*, 14, 38–44. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.1991.tb00631.x>
- Lechowicz, M. J. (2002). Phenology. In H. A. Mooney & J. G. Canadell (Eds.), *Encyclopedia of Global Environmental Change. In the Earth system: Biological and ecological dimensions of global environmental change* (Vol. 2, pp. 461–465). Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Leishman, M. R., Wright, I. J., Moles, A. T., & Westoby, M. (2000). The evolutionary ecology of seed size. In M. Fenner (Ed.), *Seeds: The ecology of regeneration in plant communities* (pp. 31–57). Wallingford: CAB International. <https://doi.org/10.1079/9780851994321.0000>
- Levitt, J. (1980). *Responses of plants to environmental stresses: Water, radiation, salt, and other stresses*. London: Academic Press.
- Molau, U. (1993). Relationships between flowering phenology and life history strategies in tundra plants. *Arctic and Alpine Research*, 25, 391–402. <https://doi.org/10.2307/1551922>
- Molénat, G., Foulquie, D., Autran, P., Bouix, J., Hubert, D., Jacquin, M., ... Bibé, B. (2005). Pour un élevage ovin allaitant performant et durable sur parcours: un système expérimental sur le Causse du Larzac. *INRA Productions Animales*, 18, 323–338.
- Moles, A. T., Ackerly, D. D., Webb, C. O., Tweddle, J. C., Dickie, J. B., Pitman, A. J., & Westoby, M. (2005). Factors that shape seed mass evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 10540–10544. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501473102>
- Moles, A. T., & Westoby, M. (2003). Latitude, seed predation and seed mass. *Journal of Biogeography*, 30, 105–128. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2003.00781.x>
- Moles, A. T., & Westoby, M. (2004). Seedling survival and seed size: A synthesis of the literature. *Journal of Ecology*, 92, 372–383. <https://doi.org/10.1111/j.0022-0477.2004.00884.x>
- Navas, M. L., Roumet, C., Bellmann, A., Laurent, G., & Garnier, E. (2010). Suites of plant traits in species from different stages of a Mediterranean secondary succession. *Plant Biology*, 12, 183–196. [https://doi.org/10.1111/\(ISSN\)1438-8677](https://doi.org/10.1111/(ISSN)1438-8677)
- Orshan, G., Floret, C., Le Floch, E., Le Roux, A., Montenegro, G., & Romane, F. (1989). General synthesis. In G. Orshan (Ed.), *Plant phenological studies in Mediterranean type ecosystems* (pp. 389–399). Dordrecht: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-3107-7>
- Paradis, E., Claude, J., & Strimmer, K. (2004). APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*, 20, 289–290. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg412>
- Pau, S., Wolkovich, E. M., Cook, B. I., Davies, T. J., Kraft, N. J., Bolmgren, K., ... Cleland, E. E. (2011). Predicting phenology by integrating ecology, evolution and climate science. *Global Change Biology*, 17, 3633–3643. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2011.02515.x>

- Petanidou, T., Ellis, W. N., Margaris, N. S., & Vokou, D. (1995). Constraints on flowering phenology in a phryganic (East Mediterranean shrub) community. *American Journal of Botany*, 82, 607–620. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1995.tb11505.x>
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarker, D., & Team, R. C. (2012). *nlme: Linear and nonlinear mixed effects models*. R package version 31–120. Retrieved from <http://CRAN.R-project.org/package=nlme>.
- Primack, R. B. (1987). Relationships among flowers, fruits, and seeds. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 409–430. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.18.110187.002205>
- Qian, H., & Jin, Y. (2016). An updated megaphylogeny of plants, a tool for generating plant phylogenies and an analysis of phylogenetic community structure. *Journal of Plant Ecology*, 9, 233–239. <https://doi.org/10.1093/jpe/rtv047>
- Rafferty, N. E., & Nability, P. D. (2017). A global test for phylogenetic signal in shifts in flowering time under climate change. *Journal of Ecology*, 105, 627–633. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12701>
- Rahman, M. S., & Yoshida, S. (1985). Effect of water stress on grain filling in rice. *Soil Science and Plant Nutrition*, 31, 497–511. <https://doi.org/10.1080/00380768.1985.10557459>
- Rathcke, B., & Lacey, E. P. (1985). Phenological patterns of terrestrial plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16, 179–214. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.16.110185.001143>
- Rees, M., & Westoby, M. (1997). Game-theoretical evolution of seed mass in multi-species ecological models. *Oikos*, 78, 116–126. <https://doi.org/10.2307/3545807>
- Reich, P. B. (2014). The world-wide ‘fast-slow’ plant economics spectrum: A traits manifesto. *Journal of Ecology*, 102, 275–301. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12211>
- Revell, L. J. (2012). phytools: An R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution*, 3, 217–223. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2011.00169.x>
- Saini, H. S., & Westgate, M. E. (1999). Reproductive development in grain crops during drought. *Advances in Agronomy*, 68, 59–96. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60843-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60843-3)
- Sakai, S. (2001). Phenological diversity in tropical forests. *Population Ecology*, 43, 77–86. <https://doi.org/10.1007/PL00012018>
- Sarmiento, G., & Monasterio, M. (1983). Life forms and phenology. In F. Bourliere (Ed.), *Ecosystems of the World XIII. Tropical savannas* (pp. 79–108). Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Company.
- Satake, A. (2010). Diversity of plant life cycles is generated by dynamic epigenetic regulation in response to vernalization. *Journal of Theoretical Biology*, 266, 595–605. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2010.07.019>
- Saxton, K. E., & Rawls, W. J. (2006). Soil water characteristic estimates by texture and organic matter for hydrologic solutions. *Soil Science Society of America Journal*, 70, 1569–1578. <https://doi.org/10.2136/sssaj2005.0117>
- van Schaik, C. P., Terborgh, J. W., & Wright, S. J. (1993). The phenology of tropical forests: Adaptive significance and consequences for primary consumers. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24, 353–377. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.24.110193.002033>
- Schwartz, M. D. (Ed.) (2003). *Phenology: An integrative environmental science*. Dordrecht, the Netherlands: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-0632-3>
- Segrestin, J., Bernard-Verdier, M., Violle, C., Richarte, J., Navas, M.-L., & Garnier, E. (2018). Data from: When is the best time to flower and disperse? A comparative analysis of plant reproductive phenology in the Mediterranean. *Dryad Digital Repository*, <https://doi.org/10.5061/dryad.3qp36g8>
- Skelton, R. P., West, A. G., & Dawson, T. E. (2015). Predicting plant vulnerability to drought in biodiverse regions using functional traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, 5744–5749. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503376112>
- Smith, C. C., & Fretwell, S. D. (1974). The optimal balance between size and number of offspring. *The American Naturalist*, 108, 499–506. <https://doi.org/10.1086/282929>
- Sun, S., & Frelich, L. E. (2011). Flowering phenology and height growth pattern are associated with maximum plant height, relative growth rate and stem tissue mass density in herbaceous grassland species. *Journal of Ecology*, 99, 991–1000. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2011.01830.x>
- Thompson, J. D. (2005). *Plant evolution in the Mediterranean*. Oxford: Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198515340.001.0001>
- Visser, M. E., & Holleman, L. J. (2001). Warmer springs disrupt the synchrony of oak and winter moth phenology. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 268, 289–294. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1363>
- Walter, H., Harnickell, E., & Mueller-Dombois, D. (1975). *Climate-diagram maps of the individual continents and the ecological climatic regions of the Earth*. Berlin: Springer-Verlag.
- Warton, D. I., Duursma, R. A., Falster, D. S., & Taskinen, S. (2012). smatr 3—An R package for estimation and inference about allometric lines. *Methods in Ecology and Evolution*, 3, 257–259. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2011.00153.x>
- Wheelwright, N. T. (1985). Competition for dispersers, and the timing of flowering and fruiting in a guild of tropical trees. *Oikos*, 44, 465–477.
- Willson, M. F., & Traveset, A. (2000). The ecology of seed dispersal. In M. Fenner (Ed.), *Seeds. The ecology of regeneration in plant communities* (pp. 85–110). Wallingford: CAB International. <https://doi.org/10.1079/9780851994321.0000>
- Wolkovich, E. M., & Cleland, E. E. (2014). Phenological niches and the future of invaded ecosystems with climate change. *AoB Plants*, 6, plu013. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plu013>

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Segrestin J, Bernard-Verdier M, Violle C, et al. When is the best time to flower and disperse? A comparative analysis of plant reproductive phenology in the Mediterranean. *Funct Ecol*. 2018;00:1–14. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13098>

Supplementary material

TABLE S1 | List of the species (using the TAXREF V.10 taxonomic reference) surveyed between 1998 and 2010 in the four sites. CAZ: Cazarils, CRE, Camp Redon, FAG, La Fage, HGM, Hautes Garrigues du Montpelliérans (see Table 1 of main text for further details). Population represents the number of populations surveyed for each species.

Species	Family	Growth form	Pollination type	Dispersal type	Site	Populations
<i>Achillea millefolium</i>	Asteraceae	Herb. peren	Insect	Wind	FAG	2
<i>Aegilops geniculata</i>	Poaceae	Annual	Wind	Animal	CAZ	1
<i>Agrimonia eupatoria</i>	Rosaceae	Herb. peren	Insect	Animal	HGM	1
<i>Alyssum alyssoides</i>	Brassicaceae	Annual	Insect	Wind	FAG	2
<i>Anisantha madritensis</i>	Poaceae	Annual	Wind	Animal	HGM, CRE	4
<i>Anthyllis montana</i>	Fabaceae	Woody	Insect	Animal	FAG	1
<i>Anthyllis vulneraria</i>	Fabaceae	Annual	Insect	Wind	FAG	2
<i>Aphyllanthes monspeliensis</i>	Asparagaceae	Herb. peren	Insect	Gravity	FAG	3
<i>Arenaria aggregata</i>	Caryophyllaceae	Woody	Insect	Animal	FAG	1
<i>Arenaria serpyllifolia</i>	Caryophyllaceae	Annual	Insect	Wind	FAG, CRE	5
<i>Asperula cynanchica</i>	Rubiaceae	Herb. peren	Insect	Gravity	FAG	1
<i>Astragalus monspessulanus</i>	Fabaceae	Herb. peren	Insect	Gravity	FAG	1
<i>Avena barbata</i>	Poaceae	Annual	Wind	Animal	HGM	2
<i>Bellis perennis</i>	Asteraceae	Herb. peren	Insect	Gravity	FAG	1
<i>Betonica officinalis</i>	Lamiaceae	Herb. peren	Insect	Gravity	CAZ	1
<i>Bituminaria bituminosa</i>	Fabaceae	Herb. peren	Insect	Animal	CAZ, CRE	3
<i>Brachypodium distachyon</i>	Poaceae	Annual	Wind	Animal	CAZ	1
<i>Brachypodium phoenicoides</i>	Poaceae	Herb. peren	Wind	Animal	CAZ, HGM, CRE	4
<i>Briza media</i>	Poaceae	Herb. peren	Wind	Gravity	FAG	1
<i>Bromopsis erecta</i>	Poaceae	Herb. peren	Wind	Animal	CAZ, HGM, FAG, CRE	6
<i>Bromus hordeaceus</i>	Poaceae	Annual	Wind	Animal	FAG	1
<i>Bromus lanceolatus</i>	Poaceae	Annual	Wind	Animal	CAZ	1
<i>Bupleurum rigidum</i>	Apiaceae	Herb. peren	Insect	Gravity	CAZ	1
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	Brassicaceae	Annual	Auto	Wind	FAG	1
<i>Cardamine hirsuta</i>	Brassicaceae	Annual	Auto	Wind	FAG	1
<i>Carex flacca</i>	Cyperaceae	Herb. peren	Wind	Gravity	FAG	2
<i>Carex halleriana</i>	Cyperaceae	Herb. peren	Wind	Animal	CAZ	1
<i>Carex humilis</i>	Cyperaceae	Herb. peren	Wind	Gravity	FAG	1
<i>Carthamus mitissimus</i>	Asteraceae	Herb. peren	Insect	Wind	FAG	2
<i>Catananche caerulea</i>	Asteraceae	Herb. peren	Insect	Animal	CAZ	1
<i>Centaurea aspera</i>	Asteraceae	Woody	Insect	Gravity	HGM	1
<i>Centaurea pectinata</i>	Asteraceae	Herb. peren	Insect	Animal	FAG	2
<i>Cerastium glomeratum</i>	Caryophyllaceae	Annual	Auto	Wind	FAG	1
<i>Cerastium pumilum</i>	Caryophyllaceae	Annual	Insect	Wind	FAG	3

<i>Cirsium acaulon</i>	Asteraceae	Herb. peren	Insect	Wind	FAG	1
<i>Clinopodium nepeta</i>	Lamiaceae	Herb. peren	Insect	Animal	CAZ, HGM, CRE	3
<i>Convolvulus arvensis</i>	Convolvulaceae	Herb. peren	Insect	Gravity	CAZ, HGM	2
<i>Coronilla minima</i>	Fabaceae	Woody	Insect	Animal	FAG	3
<i>Crepis foetida</i>	Asteraceae	Annual	Insect	Wind	HGM, CRE	4
<i>Crepis sancta</i>	Asteraceae	Annual	Insect	Wind	CAZ, HGM, FAG	3
<i>Crepis vesicaria</i>	Asteraceae	Herb. peren	Insect	Wind	CAZ, FAG	2
<i>Cynodon dactylon</i>	Poaceae	Herb. peren	Wind	Gravity	HGM	1
<i>Dactylis glomerata</i>	Poaceae	Herb. peren	Wind	Animal	CAZ, HGM, FAG, CRE	5
<i>Daucus carota</i>	Apiaceae	Herb. peren	Insect	Animal	CAZ, HGM, CRE	4
<i>Dipsacus fullonum</i>	Caprifoliaceae	Herb. peren	Insect	Wind	HGM	1
<i>Dorycnium hirsutum</i>	Fabaceae	Woody	Insect	Animal	CAZ	1
<i>Dorycnium pentaphyllum</i>	Fabaceae	Woody	Insect	Gravity	CAZ	1
<i>Draba verna</i>	Brassicaceae	Annual	Auto	Wind	FAG	1
<i>Echinops ritro</i>	Asteraceae	Herb. peren	Insect	Wind	CAZ	1
<i>Erigeron canadensis</i>	Asteraceae	Annual	Insect	Wind	HGM	1
<i>Erigeron sumatrensis</i>	Asteraceae	Annual	Insect	Wind	HGM	1
<i>Erodium ciconium</i>	Geraniaceae	Annual	Insect	Gravity	HGM	2
<i>Erodium cicutarium</i>	Geraniaceae	Annual	Insect	Gravity	FAG	2
<i>Eryngium campestre</i>	Apiaceae	Herb. peren	Insect	Animal	FAG	3
<i>Euphorbia duvalii</i>	Euphorbiaceae	Herb. peren	Insect	Animal	FAG	1
<i>Euphorbia seguieriana</i>	Euphorbiaceae	Herb. peren	Insect	Animal	FAG	1
<i>Festuca christiani-bernardii</i>	Poaceae	Herb. peren	Wind	Animal	FAG	2
<i>Filipendula vulgaris</i>	Rosaceae	Herb. peren	Insect	Animal	FAG	1
<i>Fumana procumbens</i>	Cistaceae	Woody	Insect	Gravity	FAG	1
<i>Galium corrudifolium</i>	Rubiaceae	Herb. peren	Insect	Gravity	FAG	1
<i>Genista hispanica</i>	Fabaceae	Woody	Insect	Animal	FAG	1
<i>Geranium rotundifolium</i>	Geraniaceae	Annual	Insect	Gravity	HGM, FAG, CRE	4
<i>Globularia vulgaris</i>	Plantaginaceae	Herb. peren	Insect	Animal	FAG	2
<i>Helianthemum apenninum</i>	Cistaceae	Woody	Insect	Animal	FAG	3
<i>Helictochloa bromoides</i>	Poaceae	Herb. peren	Wind	Animal	CAZ	1
<i>Helianthemum canum</i>	Cistaceae	Woody	Insect	Gravity	FAG	3
<i>Helianthemum nummularium</i>	Cistaceae	Woody	Insect	Animal	CAZ, FAG	2
<i>Hippocrepis comosa</i>	Fabaceae	Herb. peren	Insect	Animal	FAG	1
<i>Hordeum murinum</i>	Poaceae	Annual	Wind	Animal	FAG	1
<i>Inula conyza</i>	Asteraceae	Herb. peren	Insect	Wind	HGM, CRE	2
<i>Inula montana</i>	Asteraceae	Herb. peren	Insect	Wind	FAG	2
<i>Kickxia spuria</i>	Plantaginaceae	Annual	Insect	Animal	CAZ	1
<i>Koeleria vallesiana</i>	Poaceae	Herb. peren	Wind	Animal	CAZ, FAG	3
<i>Lamium amplexicaule</i>	Lamiaceae	Annual	Insect	Gravity	FAG	1
<i>Lavandula latifolia</i>	Lamiaceae	Woody	Insect	Gravity	CAZ	1

<i>Leucanthemum vulgare</i>	Asteraceae	Herb. peren	Insect	Gravity	FAG	1
<i>Linaria supina</i>	Plantaginaceae	Annual	Insect	Wind	FAG	1
<i>Linum suffruticosum</i>	Linaceae	Woody	Insect	Animal	FAG	1
<i>Linum tenuifolium</i>	Linaceae	Woody	Insect	Animal	FAG	2
<i>Lolium multiflorum</i>	Poaceae	Annual	Wind	Gravity	HGM	1
<i>Lotus corniculatus</i>	Fabaceae	Herb. peren	Insect	Gravity	CAZ, FAG	2
<i>Medicago lupulina</i>	Fabaceae	Annual	Insect	Gravity	HGM	1
<i>Medicago minima</i>	Fabaceae	Annual	Insect	Animal	CAZ, HGM, CRE	5
<i>Microthlaspi perfoliatum</i>	Brassicaceae	Annual	Insect	Wind	FAG	1
<i>Minuartia hybrida</i>	Caryophyllaceae	Annual	Insect	Animal	FAG	1
<i>Myosotis ramosissima</i>	Boraginaceae	Annual	Insect	Animal	FAG	3
<i>Onobrychis viciifolia</i>	Fabaceae	Herb. peren	Insect	Animal	FAG	1
<i>Ononis striata</i>	Fabaceae	Herb. peren	Insect	Animal	FAG	1
<i>Orlaya grandiflora</i>	Apiaceae	Annual	Insect	Animal	HGM	1
<i>Phleum pratense</i>	Poaceae	Herb. peren	Wind	Animal	CAZ	1
<i>Picris hieracioides</i>	Asteraceae	Herb. peren	Insect	Wind	HGM, CRE	3
<i>Pilosella officinarum</i>	Asteraceae	Herb. peren	Auto	Wind	FAG	2
<i>Plantago lanceolata</i>	Plantaginaceae	Herb. peren	Insect	Gravity	CAZ, FAG	2
<i>Plantago media</i>	Plantaginaceae	Herb. peren	Insect	Gravity	FAG	1
<i>Poa bulbosa</i>	Poaceae	Herb. peren	Wind	Gravity	FAG	2
<i>Poa pratensis</i>	Poaceae	Herb. peren	Wind	Gravity	FAG	1
<i>Potentilla crantzii</i>	Rosaceae	Woody	Auto	Gravity	CAZ	1
<i>Poterium sanguisorba</i>	Rosaceae	Herb. peren	Insect	Gravity	CAZ, HGM, FAG	4
<i>Potentilla verna</i>	Rosaceae	Herb. peren	Insect	Gravity	FAG	4
<i>Prunella laciniata</i>	Lamiaceae	Herb. peren	Insect	Gravity	FAG	1
<i>Ranunculus gramineus</i>	Ranunculaceae	Herb. peren	Insect	Gravity	FAG	1
<i>Reseda lutea</i>	Resedaceae	Herb. peren	Insect	Animal	FAG	1
<i>Rhinanthus pumilus</i>	Orobanchaceae	Annual	Insect	Wind	FAG	1
<i>Rubia peregrina</i>	Rubiaceae	Woody	Insect	Animal	CAZ, HGM, CRE	4
<i>Ruscus aculeatus</i>	Asparagaceae	Woody	Insect	Animal	CAZ	1
<i>Salvia pratensis</i>	Lamiaceae	Herb. peren	Insect	Gravity	FAG	3
<i>Scabiosa atropurpurea</i>	Caprifoliaceae	Herb. peren	Insect	Wind	CAZ	1
<i>Scabiosa columbaria</i>	Caprifoliaceae	Herb. peren	Insect	Animal	FAG	1
<i>Scleranthus annuus</i>	Caryophyllaceae	Annual	Insect	Animal	FAG	1
<i>Sedum sediforme</i>	Crassulaceae	Woody	Insect	Wind	HGM	1
<i>Seseli montanum</i>	Apiaceae	Herb. peren	Insect	Gravity	FAG	2
<i>Sherardia arvensis</i>	Rubiaceae	Annual	Insect	Animal	FAG	3
<i>Silene latifolia</i>	Caryophyllaceae	Herb. peren	Insect	Wind	FAG	1
<i>Stachys annua</i>	Lamiaceae	Annual	Insect	Animal	CAZ	1
<i>Stellaria media</i>	Caryophyllaceae	Annual	Insect	Gravity	FAG	1

<i>Stipa pennata</i>	Poaceae	Herb. peren	Wind	Wind	FAG	1
<i>Taraxacum erythrospermum</i>	Asteraceae	Herb. peren	Auto	Wind	FAG	2
<i>Taraxacum fulvum</i>	Asteraceae	Herb. peren	Auto	Wind	FAG	1
<i>Taraxacum officinale</i>	Asteraceae	Herb. peren	Auto	Wind	FAG	1
<i>Teucrium chamaedrys</i>	Lamiaceae	Woody	Insect	Animal	CAZ, FAG, CRE	6
<i>Teucrium montanum</i>	Lamiaceae	Woody	Insect	Gravity	FAG	2
<i>Teucrium polium</i>	Lamiaceae	Woody	Insect	Animal	FAG	1
<i>Thesium humifusum</i>	Santalaceae	Herb. peren	Insect	Animal	FAG	1
<i>Thymus dolomiticus</i>	Lamiaceae	Woody	Insect	Animal	FAG	1
<i>Thymus serpyllum</i>	Lamiaceae	Woody	Insect	Animal	FAG	1
<i>Thymus vulgaris</i>	Lamiaceae	Woody	Insect	Animal	CAZ	1
<i>Tordylium maximum</i>	Apiaceae	Annual	Insect	Wind	HGM, CRE	3
<i>Torilis japonica</i>	Apiaceae	Annual	Insect	Animal	HGM	2
<i>Trifolium angustifolium</i>	Fabaceae	Annual	Insect	Animal	CAZ, HGM, CRE	5
<i>Trifolium scabrum</i>	Fabaceae	Annual	Insect	Animal	CAZ	1
<i>Urospermum dalechampii</i>	Asteraceae	Herb. peren	Insect	Wind	CAZ	1
<i>Veronica arvensis</i>	Plantaginaceae	Annual	Insect	Gravity	FAG	3
<i>Veronica persica</i>	Plantaginaceae	Annual	Insect	Animal	HGM, CRE	4
<i>Vicia hybrida</i>	Fabaceae	Annual	Insect	Animal	HGM	1
<i>Vicia sativa</i>	Fabaceae	Annual	Insect	Gravity	HGM	2
<i>Viola alba</i>	Violaceae	Herb. peren	Insect	Animal	CAZ	1
<i>Vulpia myuros</i>	Poaceae	Annual	Auto	Animal	FAG	1
<i>Xeranthemum inapertum</i>	Asteraceae	Annual	Insect	Animal	CAZ	1

APPENDIX S1 |

Experimental design on the four study sites

In Cazarils (CAZ) and in the Montpelliérais old field succession (HGM), two successional sequences from recent field abandonment to advanced stages were studied in 1998 (Navas *et al.* 2003; Navas *et al.* 2010) and in 2000 and 2002 (Garnier *et al.* 2004; Vile, Shipley & Garnier 2006) respectively. Five to fourteen abundant species were selected from representative communities of the different successional stages recognized (cf. Navas *et al.* 2003; Garnier *et al.* 2004 for details). In CAZ, OF and OD were assessed by the average value of 10 selected healthy individuals of these different species, considered as replicates. In HGM, OF and OD were assessed by a visual detection of the first flowering, respectively dispersing, individuals. A total of 41 and 33 species were followed in CAZ and HGM, respectively.

In Camp Redon (CRE), a common garden experiment was conducted in 2004. Eighteen species originating from the HGM site described above were transplanted as seedlings or ramets in 2003. Four replicated monocultures per species were established in 1.2 x 1.2 meter plots at each of two levels of nitrogen supply (Kazakou *et al.* 2007). OF and OD were assessed in each of the 144 plots of this experiment.

In La Fage (FAG), an experimental station of the French national institute for agronomic research (INRA), surveys were performed in 2006 in paddocks characterized by three management regimes: no grazing, moderate grazing and intense grazing with fertilization (Molénat *et al.* 2005). In each paddock, the most abundant species were selected (see Chollet *et al.* 2014 for details), leading to a total of 55 species being surveyed. In 2010, a second study was conducted in the moderately-grazed and unfertilized paddocks (Bernard-Verdier *et al.* 2012), in which a total of 56 abundant species were surveyed. Combining these different surveys, reproductive phenology in this site was assessed for 131 populations of 86 species.

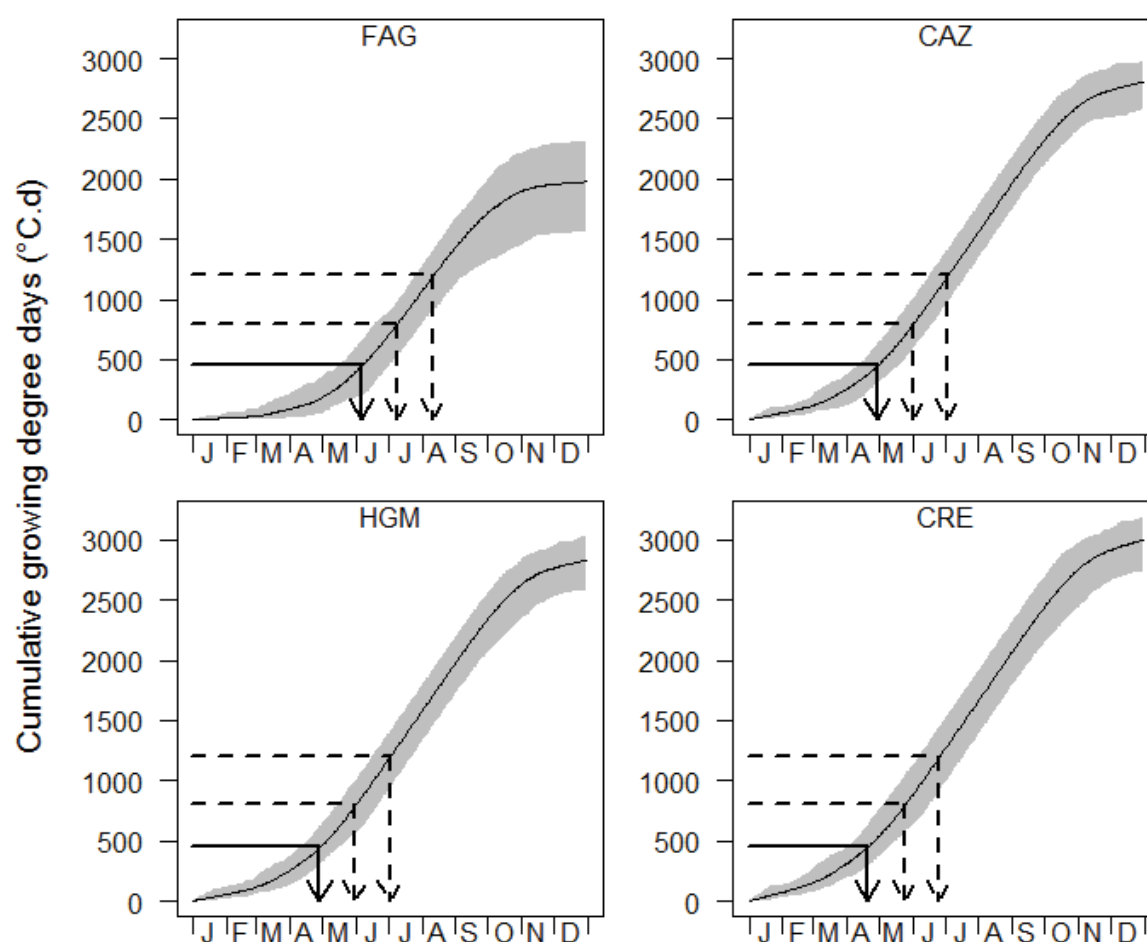


FIGURE S1 | Cumulative growing degree days (DD; base temperature = 5°C and threshold temperature = 18°C) in the four study sites based on daily climatic measurements averaged over the 1981 – 2010 period. The grey area represents the variability across years and the curve is the average cumulative DD. The flowering distribution showed a clear peak at 450 DD (see results section in the main text) which can be expressed in day of the year for each site using a projection on these curves (solid arrows). Similarly, the projection of the two peaks found for the dispersal phenology at 800 and 1200 DD are represented by the two dashed arrows.

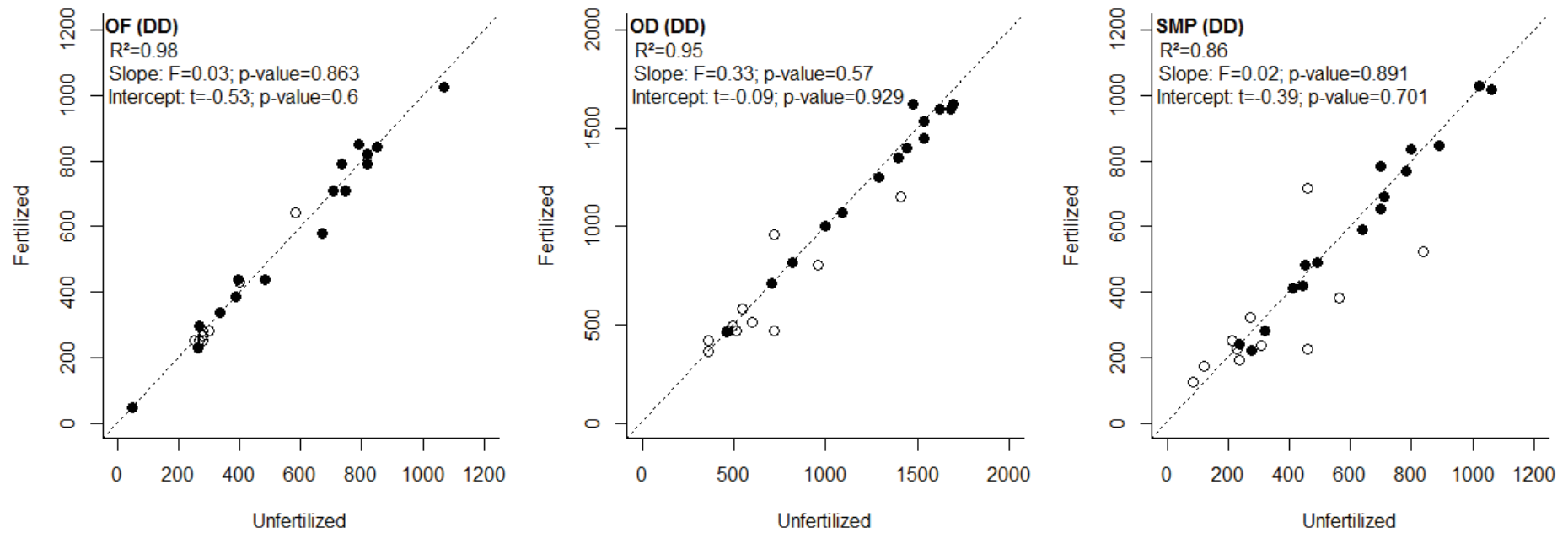


FIGURE S2 | Intra-specific variation of reproductive phenological traits for species growing in unfertilized and fertilized situations in Camp Redon (black points; 16 species surveyed in 2004) and La Fage (white points, 11 species surveyed in 2006). OF is onset of flowering, OD is onset of dispersal and SMP is the seed maturation period. Values are given in degree-days (DD). The dotted lines represent the 1:1 lines. We performed slope (H_0 : slope is not different from 1) and intercept (H_0 : intercept is not different from 0) tests using SMA regression coefficients (high p-values mean H_0 is not rejected). The test value (F or t depending on the test) and p-value are reported.

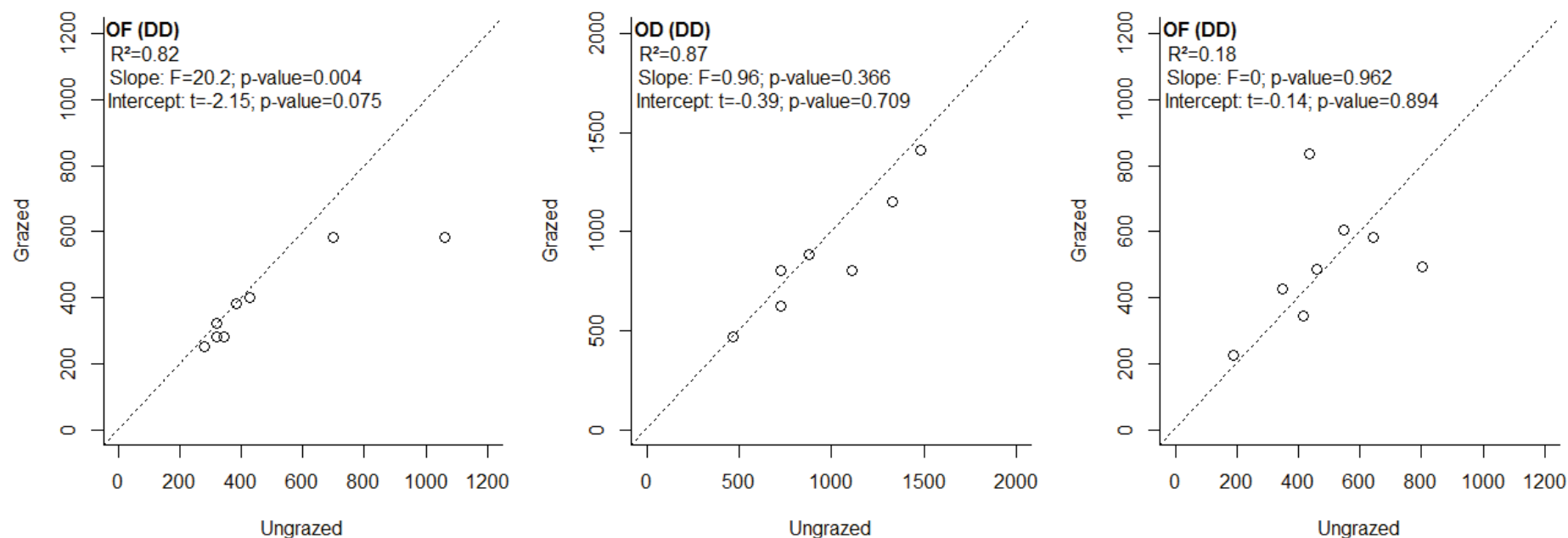


FIGURE S3 | Intra-specific variation of reproductive phenological traits for species growing in ungrazed and grazed situations in La Fage (7 species surveyed in 2006). OF is onset of flowering, OD is onset of dispersal and SMP is the seed maturation period. Values are given in degree-days (DD). The dotted lines represent the 1:1 lines. We performed slope (H0: slope is not different from 1) and intercept (H0: intercept is not different from 0) tests using SMA regression coefficients (high p-values mean H0 is not rejected). The test value (F or t depending on the test) and p-value are reported.

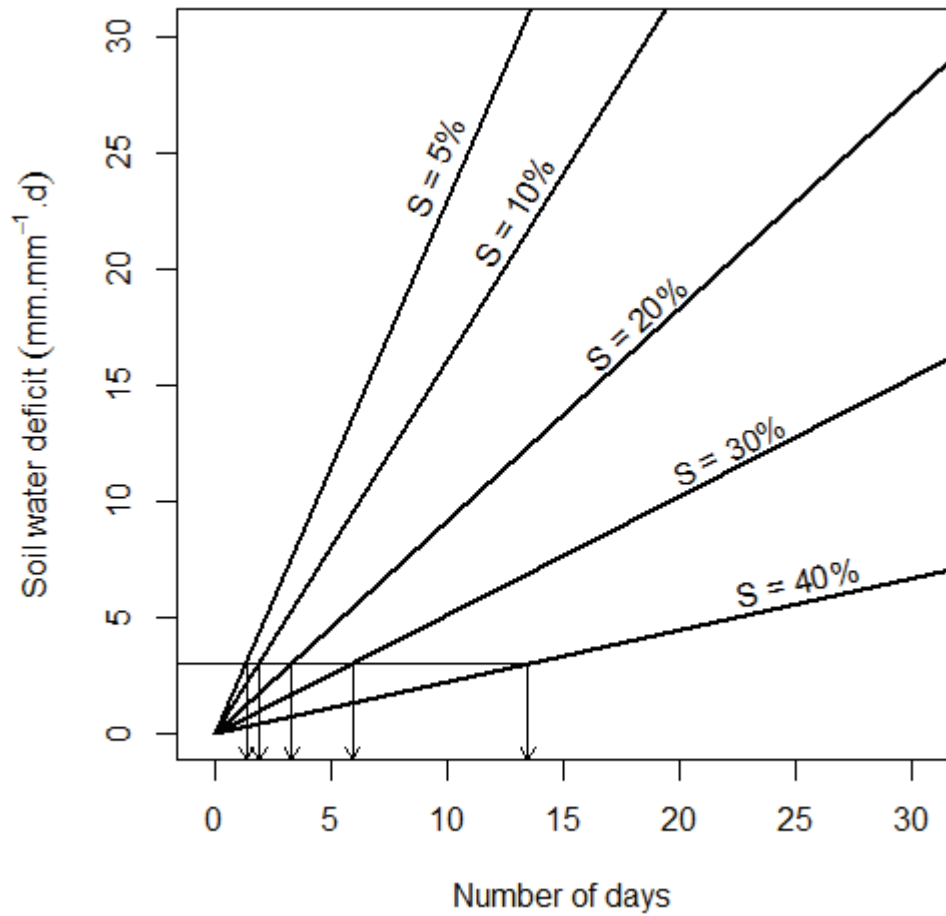


FIGURE S5 | The soil water deficit computed by equation 1 in the main text can be converted in numbers of days under a given soil water content (S). For example, a soil water deficit of 3 WDD (peak of the SWD_{SMP} distribution in the main text) is equivalent to 1.3 days at S = 5% of the total available water, 1.8 days at S = 10% and 13.4 days at S = 40%.

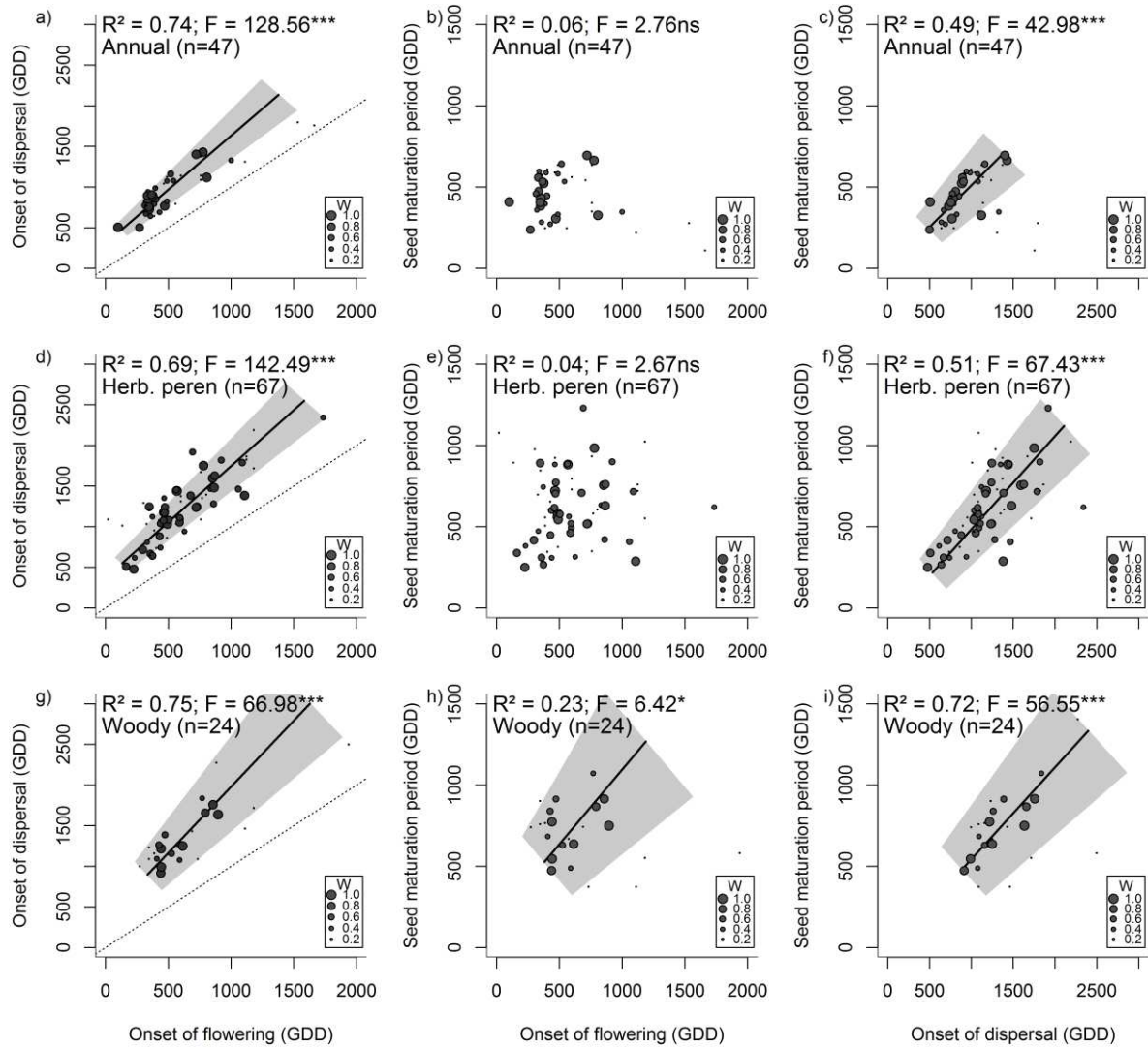


FIGURE S6 | Relationships between onset of flowering and onset of dispersal (panels a, d and g), onset of flowering and seed maturation period (panels b, e and h), and onset of dispersal and seed maturation period (panels c, f and h) for annuals (panels a, b and c), herbaceous perennials (panels d, e and f) and woody species (panels g, h and i). The sizes of the points are proportional to the weighting factor represent W (Equation 2 in main text). The dashed line represents the 1:1 line. The F-values and R^2 of weighted SMA testing the correlation are shown on each panel (significance levels are: *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$). The grey area corresponds to the 95% confidence interval of the correlation line (solid line).

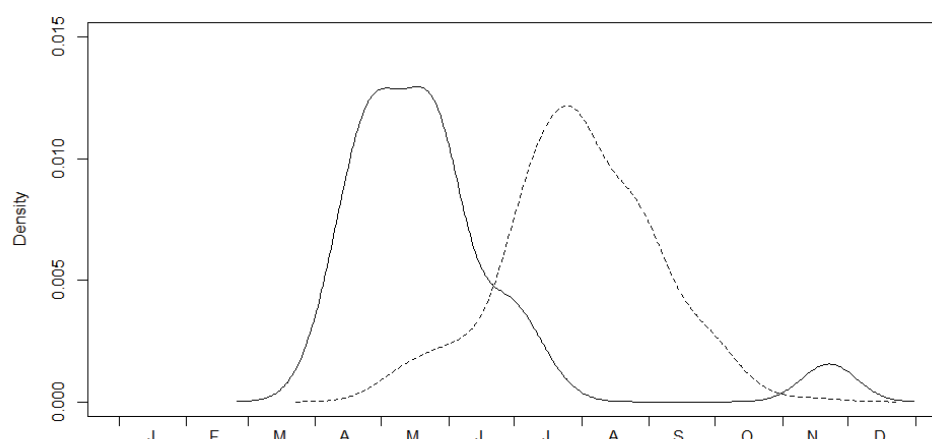


FIGURE S7 | Density curves of flowering (solid line) and dispersing (dashed line) species computed from weakly surveys of 56 species in La Fage in 2010. The flowering and dispersal status of the 56 species was recorded at each date. Most of the species flowered only in spring and early summer and only three species showed a second flowering period in late November (*Potentilla verna*, *Thymus dolomiticus* and *Taraxacum fulvum*). The seed dispersal occurred during summer and no species dispersed in late autumn nor winter.

REFERENCES

- Bernard-Verdier, M., Navas, M.-L., Vellend, M., Violle, C., Fayolle, A. & Garnier, E. (2012) Community assembly along a soil depth gradient: contrasting patterns of plant trait convergence and divergence in a Mediterranean rangeland. *Journal of Ecology*, **100**, 1422-1433.
- Chollet, S., Rambal, S., Fayolle, A., Hubert, D., Foulquié, D. & Garnier, E. (2014) Combined effects of climate, resource availability, and plant traits on biomass produced in a Mediterranean rangeland. *Ecology*, **95**, 737-748.
- Garnier, E., Cortez, J., Billès, G., Navas, M.-L., Roumet, C., Debussche, M., Laurent, G., Blanchard, A., Aubry, D. & Bellmann, A. (2004) Plant functional markers capture ecosystem properties during secondary succession. *Ecology*, **85**, 2630-2637.
- Kazakou, E., Garnier, E., Navas, M.-L., Roumet, C., Collin, C. & Laurent, G. (2007) Components of nutrient residence time and the leaf economics spectrum in species from Mediterranean old-fields differing in successional status. *Functional Ecology*, **21**, 235-245.
- Molénat, G., Foulquie, D., Autran, P., Bouix, J., Hubert, D., Jacquin, M., Bocquier, F. & Bibé, B. (2005) Pour un élevage ovin allaitant performant et durable sur parcours: un système expérimental sur le Causse du Larzac. *INRA Productions animales*, **18**, 323-338.
- Navas, M.L., Ducout, B., Roumet, C., Richarte, J., Garnier, J. & Garnier, E. (2003) Leaf life span, dynamics and construction cost of species from Mediterranean old-fields differing in successional status. *New Phytologist*, **159**, 213-228.
- Navas, M.L., Roumet, C., Bellmann, A., Laurent, G. & Garnier, E. (2010) Suites of plant traits in species from different stages of a Mediterranean secondary succession. *Plant Biology*, **12**, 183-196.
- Vile, D., Shipley, B. & Garnier, E. (2006) A structural equation model to integrate changes in functional strategies during old-field succession. *Ecology*, **87**, 504-517.

Chapitre 3

Coordination entre phases phénologiques chez 23 espèces de parcours méditerranéens

**COORDINATION ENTRE PHASES PHÉNOLOGIQUES CHEZ 23 ESPÈCES DE
PARCOURS MÉDITERRANÉEN**

J. Segrestin* ^a, S. Martin Blangy^a, A. de Haldat^a, J. Richarte ^b, M.-L. Navas ^b & E. Garnier ^a

^a CEFÉ UMR 5175, Université de Montpellier – Université Paul Valéry – EPHE, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France

^b Montpellier SupAgro, CEFÉ UMR 5175, Université de Montpellier – Université Paul Valéry 5 – EPHE, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France

* Corresponding author: jsegrestin@gmail.com

1 INTRODUCTION

La phénologie, définie comme l'étude de la temporalité des événements périodiques du cycle de vie des organismes (Schwartz 2003), est une dimension fondamentale du fonctionnement des plantes. Elle décrit notamment l'adéquation entre les phases de développement des plantes et les conditions du milieu (Rathcke & Lacey 1985). Deux types de contraintes majeures ont été identifiés pour expliquer les patrons phénologiques des espèces végétales : (1) les contraintes environnementales et (2) les contraintes développementales ou physiologiques.

Les premières sont sans doute celles qui ont été le plus largement étudiées. La saisonnalité des conditions climatiques, de la disponibilité en ressources ou encore de la présence de pathogènes ou d'herbivores créent des fenêtres temporelles plus ou moins courtes favorables à la croissance ou à la reproduction (Forrest & Miller-Rushing 2010; Pau *et al.* 2011). Ainsi, de nombreuses études ont montré l'effet des variations temporelles et spatiales de la photopériode, la température, la disponibilité en eau ou encore du gel sur la phénologie des espèces végétales (Fitter & Fitter 2002; Franks, Sim & Weis 2007; Inouye 2008; Crimmins, Crimmins & Bertelsen 2011; Segrestin *et al.* in press).

Cependant, la phénologie doit également être considérée dans un contexte global du cycle de vie des individus (Forrest & Miller-Rushing 2010; Ehrlén 2015). En effet, les phases de développement (croissance des organes végétatifs, floraison, maturation puis dispersion des graines) se suivent généralement selon une séquence temporelle (Grainger 1939) et un certain degré de coordination entre ces phases peut être attendu. Par exemple, la production de graines dépend complètement du succès de la floraison. La temporalité de la maturation des graines, puis de leur dispersion peut donc être indirectement influencée par des contraintes spécifiques à la floraison et inversement (Ehrlén 2015). Ainsi, une forte corrélation entre la date de floraison et la date de dispersion des graines est observée chez les plantes herbacées des régions tempérées (revue dans Garnier, Navas & Grigulis 2016). Dans une étude récente, nous avons montré des corrélations positives entre la date de floraison, la période de maturation des graines et leur date de dispersion chez les espèces méditerranéennes (Segrestin *et al.* in press). Nous avons alors proposé l'existence d'un continuum de stratégies de la phénologie de la reproduction allant d'espèces rapides (à floraison précoce, maturation des graines rapide et dispersion des graines précoce) à des espèces plus lentes (à floraison tardives, maturation des graines plus longues et dispersion tardives). L'origine de ce continuum reste cependant peu élucidé puisque les relations observées peuvent être le résultat

de contraintes climatiques et/ou développementales et physiologiques (voir Segrestin *et al.* in press). Par ailleurs, Sun et Frelich (2011) ont montré que les plantes herbacées à vitesse de croissance végétative rapide fleurissaient plus tôt que les espèces à croissance lente, ne profitant pas d'une longue période de croissance pour accumuler davantage de ressources. Ces résultats suggèrent que le continuum mis en évidence pour la phénologie de la reproduction pourrait être lié au continuum rapide-lent décrit pour le fonctionnement végétatif des plantes (Reich 2014).

Nous proposons d'explorer en détail les relations entre (i) traits de la phénologie reproductive d'une part, et (ii) traits de la phénologie reproductive et végétative d'autre part, à partir d'un jeu d'espèces mis en culture en jardin expérimental. Des individus de 23 espèces provenant de parcours méditerranéens ont été cultivés dans des conditions standardisées afin de suivre leur phénologie. Les espèces étudiées ont des cycles de vie annuel ou pérenne, et appartiennent à des groupes taxonomiques différents (monocotylédone ou dicotylédone). Ces facteurs sont particulièrement importants à prendre en compte dans l'étude des traits phénologiques puisque des stratégies contrastées peuvent émerger du fait de contraintes spécifiques aux traits d'histoire de vie (Johnson 1992; Forrest & Miller-Rushing 2010) ou à l'appartenance à un groupe phylogénétique restreint (Davies *et al.* 2013). Des suivis réguliers de la production de feuilles, de fleurs et de la dispersion des fruits de 192 individus ont été réalisés à une fréquence hebdomadaire, voire bihebdomadaire afin d'obtenir une description détaillée des stades reproductifs ainsi qu'une estimation du rythme de production des feuilles.

Pour éviter toute confusion, nous définissons ici plusieurs caractéristiques de la phénologie de la reproduction (Fig.1 et Tableau 2). La floraison et la dispersion des graines sont des événements phénologiques qui peuvent être décrits par une date de début, une période et une asymétrie. Le temps qui sépare l'anthèse d'une fleur et la dispersion de son fruit est appelé la période de maturation d'une graine et peut être appréhendée par l'écart entre les courbes de floraison et de dispersion (Fig. 1b). La période reproductive correspond à la période d'allocation de ressources à la croissance reproductive (de l'initiation de la floraison à la fin de la dispersion des graines) et peut être décrite comme la somme de la période de floraison et de la période de maturation d'une graine (Fig. 1c).

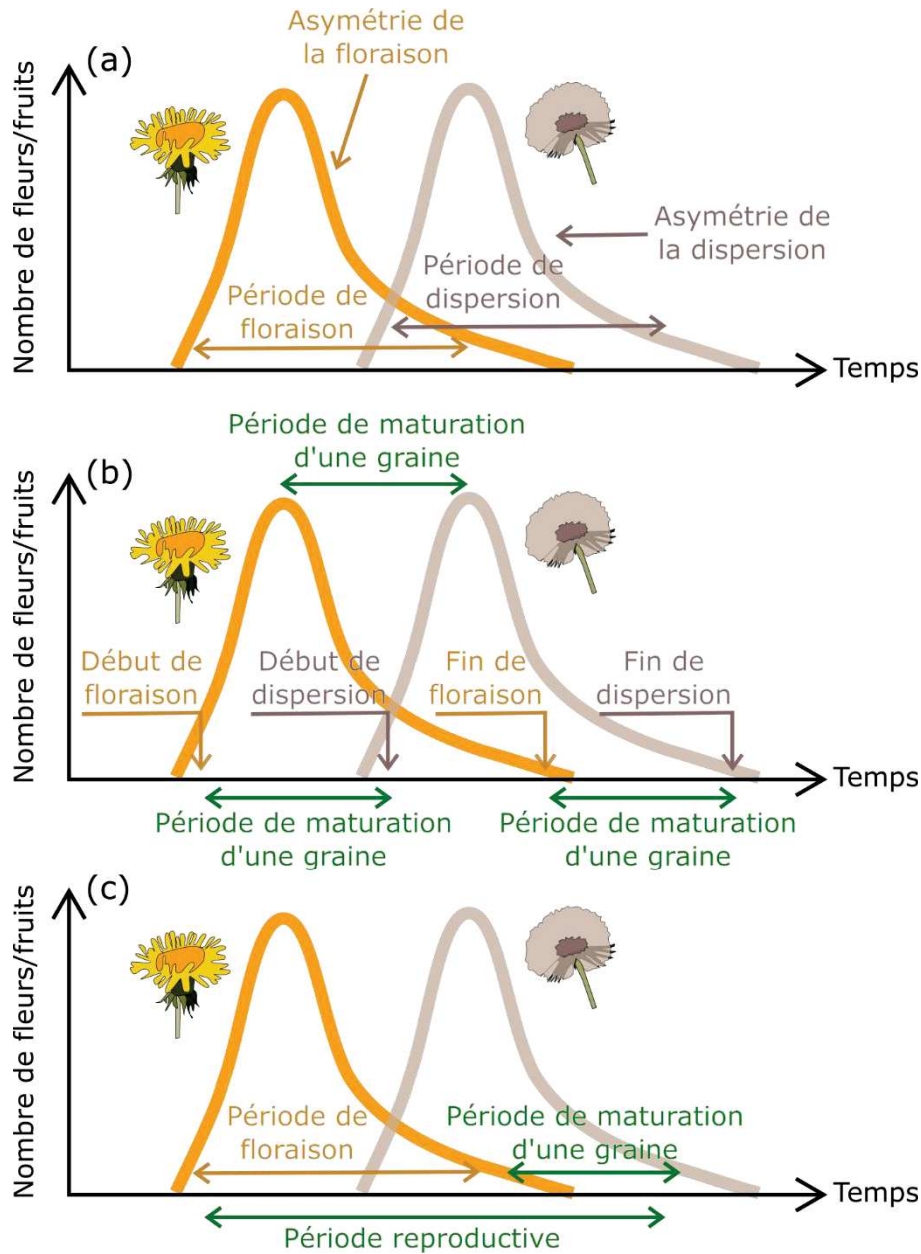


FIGURE 1 | Schémas représentant les distributions du nombre de fleurs (courbe jaune) et de fruits en dispersion (courbes grises) mesurés à l'échelle d'un individu au cours du temps. (a) Les périodes et asymétries des courbes peuvent être utilisées pour comparer les formes des distributions de floraison et de dispersion. (b) La période de maturation d'une graine peut être estimée par l'écart entre la courbe de floraison et la courbe de dispersion des graines. (c) La période reproductive correspond à la somme de la période de floraison et de la période de maturation d'une graine.

Le premier objectif de cette étude consiste à décrire les distributions de production de fleurs et de dispersion des graines au cours du temps pour les 23 espèces étudiées. Le degré de synchronisation entre individus de la même espèce est observé. Puis, les formes des distributions de floraison et de dispersion des graines sont comparées. Nous testons notamment les relations entre (1) la période de floraison et la période de dispersion des

graines et entre (2) l'asymétrie de la floraison et l'asymétrie de la dispersion des graines. De fortes corrélations entre ces caractéristiques suggéreraient que les graines produites par un individu se développent au même rythme jusqu'à la dispersion, sans effet de la date à laquelle elles sont initiées.

Dans un second temps, nous définissons la période reproductive comme la période d'allocation de ressources à la croissance reproductive (de l'initiation de la floraison à la fin de la dispersion des graines). Deux hypothèses contradictoires existent au sujet de la coordination entre la date de début de floraison et la période reproductive des espèces en climat saisonnier :

- (1) D'après la théorie du compromis temps-taille (« time-size tradeoff »), il est attendu qu'une floraison tardive implique une période reproductive courte afin d'éviter les conditions défavorables pendant la production de graines (Primack 1987; Bolmgren & Cowan 2008). À l'opposé, un passage à la reproduction précoce relâche la contrainte temporelle et permet une période reproductive courte ou longue. Dans ce cas, on s'attend à observer une période reproductive courte chez les espèces à floraison tardive.
- (2) en contradiction avec cette hypothèse, nos récents résultats suggèrent que les espèces végétales peuvent être classées selon un axe de variation traduisant leur vitesse de développement (Segrestin *et al.* in press) : les espèces à floraison tardive ont un rythme de développement lent associé à des périodes reproductives plus longues, tolérant les conditions défavorables pendant la production de graines.

À notre connaissance, aucune étude n'a testé la relation entre la date de floraison et la période reproductive dans son ensemble. En effet, la mesure de la période reproductive est particulièrement contraignante et la plupart des études n'utilisent que des mesures, parfois indirectes, de composantes de cette période : certaines utilisent la période de floraison (Bawa, Kang & Grayum 2003; Thompson 2005; Laughlin *et al.* 2010; Jia *et al.* 2011) et d'autres la période de maturation d'une graine (Heydel & Tackenberg 2017; Segrestin *et al.* in press), le plus souvent estimée par masse d'une graine à maturité (Primack 1985; Vile, Shipley & Garnier 2006; Bolmgren & Cowan 2008; Laughlin *et al.* 2010; Jia *et al.* 2011). Notre étude est donc la première à notre connaissance à caractériser directement la période reproductive de plusieurs espèces dans le but de tester sa relation avec la date de floraison. Afin d'étudier

plus en détail les processus à l'origine de la relation observée, les relations entre la date de floraison, la période de floraison et la période de maturation d'une graine sont testées.

Enfin, nous proposons d'utiliser le phyllochrone (temps entre la production de deux feuilles successives, Wilhelm & McMaster 1995) afin d'avoir une description du rythme de développement végétatifs. Nous testons alors la relation entre le phyllochrone et la date de floraison des espèces afin de généraliser les résultats de Sun and Frelich (2011) pour des espèces herbacées méditerranéennes. Une relation positive entre ces traits renforcerait l'idée d'un continuum rapide-lent décrivant les stratégies phénologiques des espèces végétales.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Sélection des espèces et design expérimental

Afin de permettre des suivis réguliers, 23 espèces herbacées et ligneuses de petite stature (Tableau 1), provenant d'un parcours ovin situé sur le Causse du Larzac en Aveyron (domaine expérimental de La Fage, 43°55'N, 3°05'E), ont été mises en culture au terrain d'expérience du centre d'écologie fonctionnelle et évolutive à Montpellier (43°38'N, 3°51'E). Le climat du site d'origine est classé comme Méditerranéen humide, caractérisé par une forte saisonnalité des températures et de la disponibilité en eau (Daget 1977). La liste d'espèces étudiées comprend 8 annuelles et 15 pérennes réparties en 8 monocotylédones et 15 dicotylédones (Tableau 1). Ces espèces ont été sélectionnées selon leur abondance dans des milieux caractérisés par des modes de gestion contrastés (différences d'intensité du pâturage et de fertilisation) afin de maximiser la diversité phénotypique des espèces.

Pour chaque espèce pérenne, huit individus matures et sains ont été sélectionnés *in-situ* puis transplantés dans des pots individuels de 8L contenant un substrat standardisé entre novembre 2014 et mai 2015 (Fig. 2). Les plantes ont profité d'une phase d'acclimatation de 8 à 13 mois au terrain d'expérience avant le début des suivis. Pour les espèces annuelles, des graines ont été récoltées *in-situ* tout au long de l'année 2015. Elles ont été semées en février 2016 dans les mêmes conditions que les espèces pérennes. Les 192 pots ont été séparés en deux groupes identiques positionnés aléatoirement sur deux tables en extérieur. Un arrosage spécifique à chaque individu (par estimation visuelle des besoins en eau) a été réalisé tout au long de l'expérience afin de décrire le cycle des plantes dans des conditions hydriques non stressantes.

TABEAU 1 | Liste des 23 espèces étudiées associée à leur famille botanique, cycle de vie (Ann : Annuel, Per : Pérenne), groupe (M : monocotylédone, D : dicotylédone), type de pollinisation (ent : entomogame, ané : anémogame, aut : autogame) et type de dissémination (ané : anémochore, zoo : zoochore, baro : barochore, auto : autochore). L'origine correspond aux pratiques de gestion conduites sur les parcelles du parcours où l'espèce est la plus abondante et a été récoltée (P+/F+ : régime pâturé et fertilisé ; P+/F- : régime pâturé non fertilisé ; P-/F- : régime non pâturé non fertilisé).

Espèce	Famille botanique	Cycle de vie	Groupe	Pollinisation	Dissémination	Origine
<i>Anisantha sterilis</i>	Poaceae	Ann	M	ané	Zoo	P+/F+
<i>Anthyllis vulneraria</i>	Fabaceae	Ann	D	ent	Ané	P+/F-
<i>Brachypodium pinnatum</i>	Poaceae	Per	M	ané	Zoo	P+/F-
<i>Bromopsis erecta</i>	Poaceae	Per	M	ané	Zoo	P+/F-
<i>Bromus hordeaceus</i>	Poaceae	Ann	M	ané, aut	Zoo	P+/F+
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	Brassicaceae	Ann	D	aut	Ané	P+/F+
<i>Carex humilis</i>	Cyperaceae	Per	M	ané	Baro	P-/F-
<i>Coronilla minima</i>	Fabaceae	Per	D	ent	Zoo	P+/F-
<i>Erodium cicutarium</i>	Geraniaceae	Ann	D	ent, aut	Auto	P+/F+
<i>Festuca christiani-bernardii</i>	Poaceae	Per	M	ané	Zoo	P-/F-
<i>Geranium molle</i>	Geraniaceae	Ann	D	ent, aut	Auto	P+/F+
<i>Helianthemum apenninum</i>	Cistaceae	Per	D	ent	Zoo	P+/F-
<i>Helianthemum canum</i>	Cistaceae	Per	D	ent	Baro	P-/F-
<i>Hippocrepis comosa</i>	Fabaceae	Per	D	ent	Zoo	P+/F-
<i>Lotus corniculatus</i>	Fabaceae	Per	D	ent	Baro	P+/F-
<i>Pilosella officinarum</i>	Asteraceae	Per	D	aut	Ané	P+/F-
<i>Plantago lanceolata</i>	Plantaginaceae	Per	D	ent, ané	Baro	P+/F+
<i>Potentilla verna</i>	Rosaceae	Per	D	ent	Baro	P-/F-
<i>Poterium sanguisorba</i>	Rosaceae	Per	D	ent	Baro	P-/F-
<i>Stipa pennata</i>	Poaceae	Per	M	ané	Ané	P-/F-
<i>Trifolium repens</i>	Fabaceae	Per	D	ent	Zoo	P+/F+
<i>Veronica arvensis</i>	Plantaginaceae	Ann	D	ent, aut	Baro	P+/F+
<i>Vulpia myuros</i>	Poaceae	Ann	M	aut	Zoo	P+/F+

2.2 Production de feuilles

Début avril 2016, un rameau par individu a été sélectionné et marqué à l'aide d'une bague. La plus jeune feuille apparente du rameau (feuille zéro) est marquée puis des suivis hebdomadaires de chaque individu ont été réalisés entre avril et septembre 2016. À chaque passage, le nombre de nouvelles feuilles apparues est noté. La date d'apparition de chaque feuille est estimée en considérant une production de feuille régulière entre deux passages. Ainsi, les dates d'apparition de 2 à 20 feuilles produites à la suite de la feuille zéro ont été estimées pour chaque individu correspondant à un total de 1107 feuilles suivies.



FIGURE 2 | Design expérimental des 192 pots suivis au terrain d'expérience à Montpellier (a) pour le suivi de la production de feuilles (b) et le comptage de fleurs et de fruits en dispersion (c).

2.3 Phénologie de la reproduction

Des suivis de la phénologie de la reproduction ont été réalisés deux fois par semaine entre février et novembre 2016. À chaque passage, le nombre de fleurs (ou inflorescences) à l'anthèse et le nombre de fruits (ou infrutescences) en dispersion est noté. Ces mesures permettent une caractérisation fine de la dynamique temporelle de la floraison et de la production de graines à l'échelle individuelle (Fig. 1 et 3).

En 2016, la plupart des individus de 14 espèces pérennes ont fleuri et produit des graines. Cependant, pour 9 espèces (*Brachypodium pinnatum* chez les pérennes et toutes les espèces annuelles) peu d'individus, voire aucun, n'ont fleuri. De nouveaux individus ont donc été transplantés pour les huit espèces annuelles (plantules récoltées *in-situ* en novembre 2016) et les individus de quatre espèces pérennes (*Carex humilis*, *Brachypodium pinnatum*, *Bromopsis erecta* et *Potentilla verna*) ont été suivis de nouveau selon le même protocole entre février et juillet 2017 afin de tester la répétabilité des mesures par rapport à 2016. L'absence de différences significatives entre les courbes de production de fleurs et de graines des individus

suivis les deux années (résultats non montrés) nous a permis de combiner les données issues des deux années d'observation.

2.4 Estimation des durées des phases, de leur asymétrie et des rythmes de développement

Le tableau 2 résume les traits phénologiques utilisés, la façon dont ils ont été estimés et leur unité d'expression. Afin d'éviter les biais liés à des floraisons éparées, les dates de début et de fin des stades reproductifs sont estimées par les 10 et 90% de l'aire sous les courbes de distribution du nombre de fleurs ou de fruits au cours du temps (Fig. 3). Pour chaque individu, la date de début de floraison est calculée comme la somme de degrés jours ($^{\circ}\text{C.j}$; Bonhomme 2000) entre le 1^{er} janvier de l'année de mesure et la date des 10% de la floraison. La période reproductive correspond à la somme de degrés jours entre la date de début de floraison et la date de fin de dispersion des graines. La période de floraison, respectivement de dispersion, correspond la durée entre les 10 et 90% de fleurs à l'anthèse, respectivement des fruits en dispersion, exprimée en degrés jours. La période de maturation d'une graine correspond à la durée entre les 10% de floraison et les 10% de dispersion des graines exprimée en degrés jours.

L'asymétrie de la floraison et de la dispersion sont calculées selon l'équation du moment de troisième ordre d'une distribution :

$$S = \frac{1}{\sigma^3 \sum w} \sum d w (d - \mu)^3 \quad (1)$$

avec S le coefficient d'asymétrie, w le nombre de fleurs/fruits observés à la date d (d parcourant l'ensemble des dates de passage), μ et σ la date moyenne et l'écart type de la distribution. Une valeur de S positive indique une queue de distribution étalée vers la droite alors qu'une valeur négative indique une queue de distribution étalée vers la gauche.

Le phyllochrone correspond à la période, exprimée en degrés jours, entre l'initiation de deux feuilles successives et décrit le rythme de développement végétatif (Wilhelm & McMaster 1995). Le phyllochrone par individu est estimée par le rapport suivant :

$$PHYL = \frac{{}^{\circ}J_n - {}^{\circ}J_1}{n-1} \quad (2)$$

Avec n le nombre de feuilles apparues et ${}^{\circ}J_1$ et ${}^{\circ}J_n$ les dates d'apparitions des feuilles 1 et n exprimées en degrés jours.

TABEAU 2 | Liste des traits phénologiques utilisés associés à leur abréviation, méthode d'estimation et unité d'expression

Trait	Abréviation	Estimation	Unité
Début de floraison	Flo	Date des 10% de la floraison	°C jours
Début de dispersion	Disp	Date des 10% de la dispersion des graines	°C jours
Période de floraison	PerFlo	Durée entre les 10 et 90% de floraison	°C jours
Période de dispersion	PerDisp	Durée entre les 10 et 90% de dispersion des graines	°C jours
Période reproductive	PerRep	Durée entre les 10% de floraison et les 90% de dispersion des graines	°C jours
Période de maturation d'une graine	PerMat	Durée entre les 10% de floraison et les 10% de dispersion des graines	°C jours
Phyllochrone	Phyl	Période moyenne entre la production de deux feuilles successives	°C jours

2.5 Analyses statistiques

Les analyses ont été réalisées au niveau de l'espèce, à partir des moyennes obtenues pour les 8 individus de chaque espèce. Des tests de corrélations de Pearson ont été réalisés entre les mesures phénologiques pour toutes les espèces ($n = 23$) ou pour chaque groupe d'espèce séparément. Pour chaque relation significative ($p\text{-value} < 0.05$) une estimation des coefficients d'une fonction affine ($Y = a + b * X$) et leur comparaison entre groupe sont réalisées selon la méthode d'axe majeur standardisé (SMA, package R 'smatr' - Warton *et al.* 2012). Ainsi, le choix de l'attribution d'une variable en X ou en Y n'intègre pas de biais dans l'estimation des coefficients. Lorsque les relations impliquent des rythmes de développement, nous testons également l'ajustement d'une fonction de puissance ($Y = aX^b$) à partir du test de la corrélation entre le logarithme des variables. De même, les coefficients de cette fonction sont estimés par une régression linéaire sur les logarithmes des variables ($\log(Y) = \log(a) + b * \log(X)$) selon la méthode de SMA (package R 'smatr' - Warton *et al.* 2012).

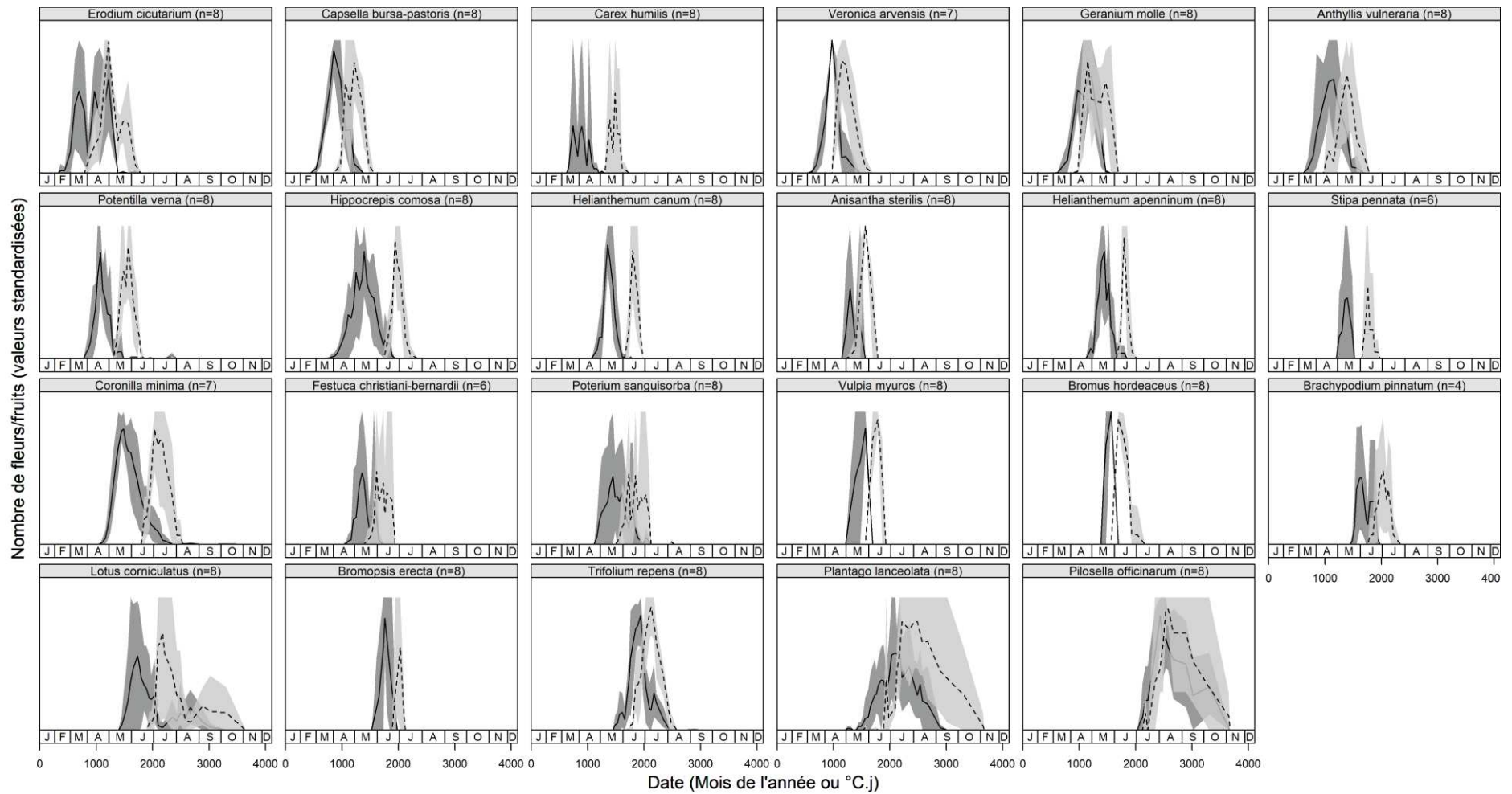


FIGURE 3 | Nombre de fleurs ou inflorescences à l'anthèse (courbes noires) et de fruits ou infrutescences en dispersion (courbes discontinues) en fonction de la date de l'année pour les 23 espèces suivies. Sur l'axe des ordonnées, les valeurs des courbes sont représentées par des valeurs relatives variant de 0 à 1, 1 étant la valeur maximale. Les surfaces (foncées pour la floraison et claires pour la dispersion) représentent la variation observée entre les n individus suivis par espèces. Les espèces sont ordonnées selon leur date de début de floraison.

3 RÉSULTATS

3.1 Couplage entre la floraison et la dispersion de graines

On observe une grande variabilité entre espèces sur la date de début de floraison allant de 666°C.j (19 mars) pour *Erodium cicutarium* à 2318°C.j (24 juillet) pour *Pilosella officinarum* (Fig. 3). Les espèces annuelles ont débuté leur floraison significativement plus tôt que les espèces pérennes ($\Delta_{\text{FLO}} = -429^{\circ}\text{C.j}$, test $t : t = -2.9$, ddl = 16.6, P-val = 0.01) alors qu'aucune différence n'est observée entre les monocotylédones et les dicotylédones ($t = 0.65$, ddl = 20.6, P-val = 0.52).

Les formes des courbes du nombre de fleurs à l'anthèse et de graines en dispersion au cours du temps sont très similaires au sein de chaque espèce suggérant une forte coordination entre ces phases (Fig. 3). On observe que les périodes de floraison et de dispersion des graines sont comparables au sein de chaque espèce : elles sont positivement corrélées (Fig. 4a et b, $r = 0.93$, $t = 11.5$, ddl = 21, P-val $\ll 0.001$) et la pente de la droite de régression n'est pas significativement différente de 1 ($r = 0.002$, ddl = 21, P-val = 0.99). Le type de cycle de vie ne semble pas affecter cette relation (Fig. 4a). On note cependant la faible variabilité au sein des espèces monocotylédones qui présentent toutes des floraisons et dispersions très courtes (Fig. 4b).

On observe également une forte corrélation entre l'asymétrie de la floraison et celle de la dispersion (Fig. 4c et d, $r = 0.81$, $t = 2.65$, ddl = 21, P-val $\ll 0.001$). Les valeurs d'asymétrie sont majoritairement nulles ou positives, correspondant à des distributions proches de la symétrie (réalisées par les espèces annuelles et les monocotylédones) ou asymétrique vers la droite (chez certaines dicotylédones pérennes). La pente de la droite de régression est significativement inférieure à 1 (pente = 0.73, $r = -0.47$, ddl = 21, P-val = 0.02) ce qui signifie que les floraisons asymétriques sont associées à des dispersions de graines également asymétriques mais de plus faible intensité.

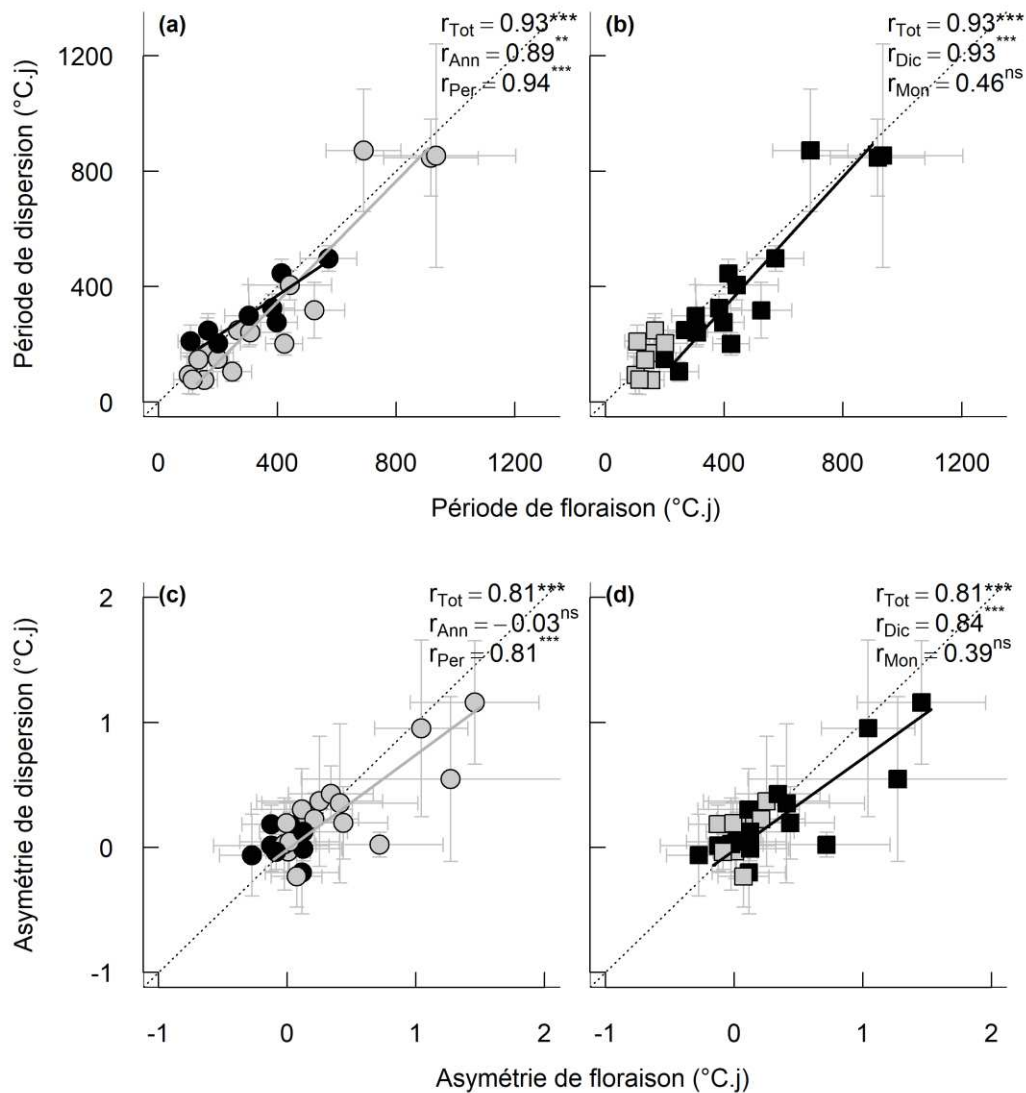


FIGURE 4 | Relations entre la période de floraison et la période de dispersion des graines (panneaux a et b) et entre l'asymétrie de la floraison et l'asymétrie de la dispersion (panneaux c et d) selon le type de cycle de vie (a et c, cercles noirs pour les annuelles et gris pour les pérennes) ou le groupe taxonomique (b et d, carrés noirs pour les dicotylédones et gris pour les monocotylédones). La droite 1:1 est représentée en pointillé. Les coefficients de Pearson pour l'ensemble des espèces (r_{Tot}) ou pour chaque groupe d'espèce (r_{Ann} : annuelles, r_{Per} : pérennes, r_{Dic} : dicotylédones, r_{Mon} : monocotylédones), ainsi que leur significativité sont mentionnés dans chaque panneau (ns : P-val > 0.1 ; ** : P-val < 0.01 ; *** : P-val < 0.001). Lorsque la corrélation est significative, la droite de régression est représentée (P-val < 0.05).

3.2 Effets de la date de début de floraison sur la période reproductive

Globalement, on n'observe pas de relation entre la date de début de floraison et la longueur de la période reproductive des espèces (Fig. 5, $r = 0.21$, $t = 0.96$, $ddl = 21$, P-val = 0.34). Trois espèces à floraison tardives ont les plus longues périodes reproductives du jeu de données (*Lotus corniculatus*, *Plantago lanceolata* et *Pilosella officinarum*) faisant apparaître une relation positive marginalement significative chez les dicotylédones. Lorsque l'on considère

les annuelles (Fig. 5a) ou les monocotylédones (Fig. 5b) séparément, on observe des périodes reproductives plus courtes chez les espèces qui débute leur floraison tardivement. À noter que la relation négative formée par les espèces annuelles (Fig. 5a) est essentiellement structurée par les groupes taxonomiques : les annuelles dicotylédones ont une floraison précoce et une période reproductive longue alors que les annuelles monocotylédones ont une floraison plus tardive et une période reproductive courte. De même la relation négative trouvée chez les monocotylédones (Fig. 4b) est tirée par une seule espèce (*Carex humilis*).

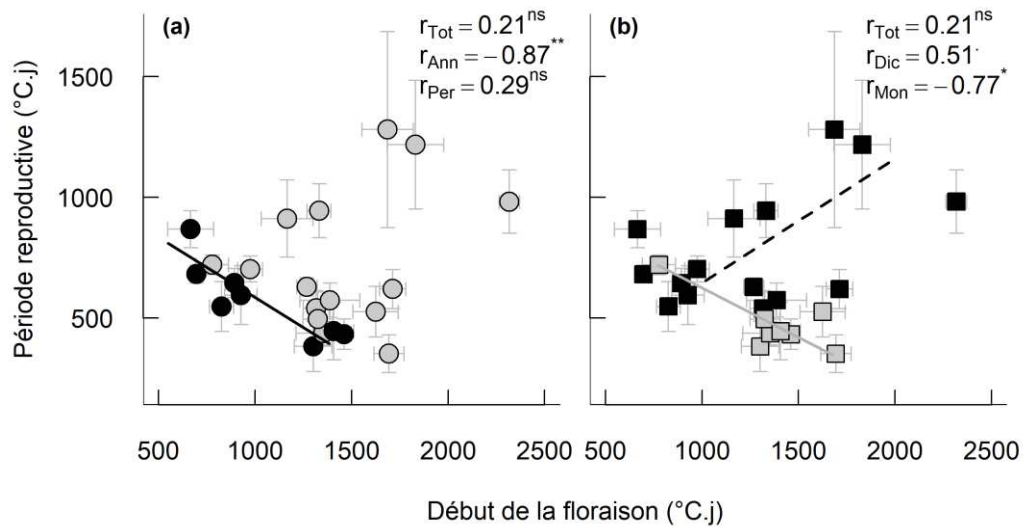


FIGURE 5 | Relations entre la date de floraison et la période reproductive selon le cycle de vie (a, cercles noirs pour les annuelles et gris pour les pérennes) ou le groupe taxonomique (b, carrés noirs pour les dicotylédones et gris pour les monocotylédones) des espèces. Les barres grises représentent les écart-types pour chaque espèce. Les coefficients de Pearson pour l'ensemble des espèces (r_{Tot}) ou pour chaque groupe d'espèce (r_{Ann} : annuelles, r_{Per} : pérennes, r_{Dic} : dicotylédones, r_{Mon} : monocotylédones), ainsi que leur significativité sont mentionnés dans chaque panneau (ns : P-val > 0.1 ; . : P-val < 0.1 ; * : P-val < 0.05 ; ** : P-val < 0.01). Lorsque la corrélation est significative, la droite de régression est représentée (droite continue : P-val < 0.05, droite discontinue : P-val < 0.1).

Les paragraphes suivants examinent les relations entre la date de début de floraison et les trois caractéristiques suivantes de la période reproductive : (1) la période de floraison, (2) la durée de maturation d'une graine mais aussi (3) l'asymétrie de la dispersion des graines.

On trouve une relation positive, marginalement significative, entre la date de début de floraison et la durée de la floraison (Fig. 6ab, $r = 0.37$, $t = 1.8$, $ddl = 21$, P-val = 0.09). La relation négative trouvée chez les annuelles (Fig. 6a) est de nouveau majoritairement structurée par les groupes taxonomiques. La relation positive trouvée pour l'ensemble des espèces est maintenue chez les espèces dicotylédones mais pas chez les monocotylédones qui présentent peu de variation sur leur durée de floraison (Fig. 6b).

On n'observe pas de relation entre la date de début de floraison et la durée de maturation d'une graine lorsque l'on considère l'ensemble des espèces (Fig. 6cd, $r = -0.32$, $t = -1.54$, $ddl = 21$, $P\text{-val} = 0.14$). Cependant, une relation en forme de triangle semble émerger, traduisant une diminution de la durée de maturation maximale pour des floraisons tardives : les espèces à floraison précoce ont des durées de maturation d'une graine courtes ou longues, alors que les espèces à floraison tardives ont des durées de maturation d'une graine courtes uniquement (Fig. 6cd). L'analyse de cette relation par groupe d'espèces montre une structuration de ce triangle par type de cycle de vie (Fig. 6c) : les espèces annuelles ont toujours une durée de maturation d'une graine plus courte que les espèces pérennes pour une date de début de floraison donnée.

Enfin, on observe une relation positive entre la date de début de floraison et l'asymétrie de la dispersion des graines (Fig. 6ef, $r = 0.55$, $t = 2.98$, $ddl = 21$, $P\text{-val} = 0.007$). Les espèces à floraison précoce ont une distribution de dispersion des graines proches de la symétrie ($S \approx 0$) alors que pour les espèces à floraison tardives, cette distribution présente une queue vers la droite ($S > 0$). Cette relation est majoritairement structurée par les espèces dicotylédones (Fig. 6f), qui forment le groupe d'espèce le plus variable concernant l'asymétrie de la dispersion des graines.

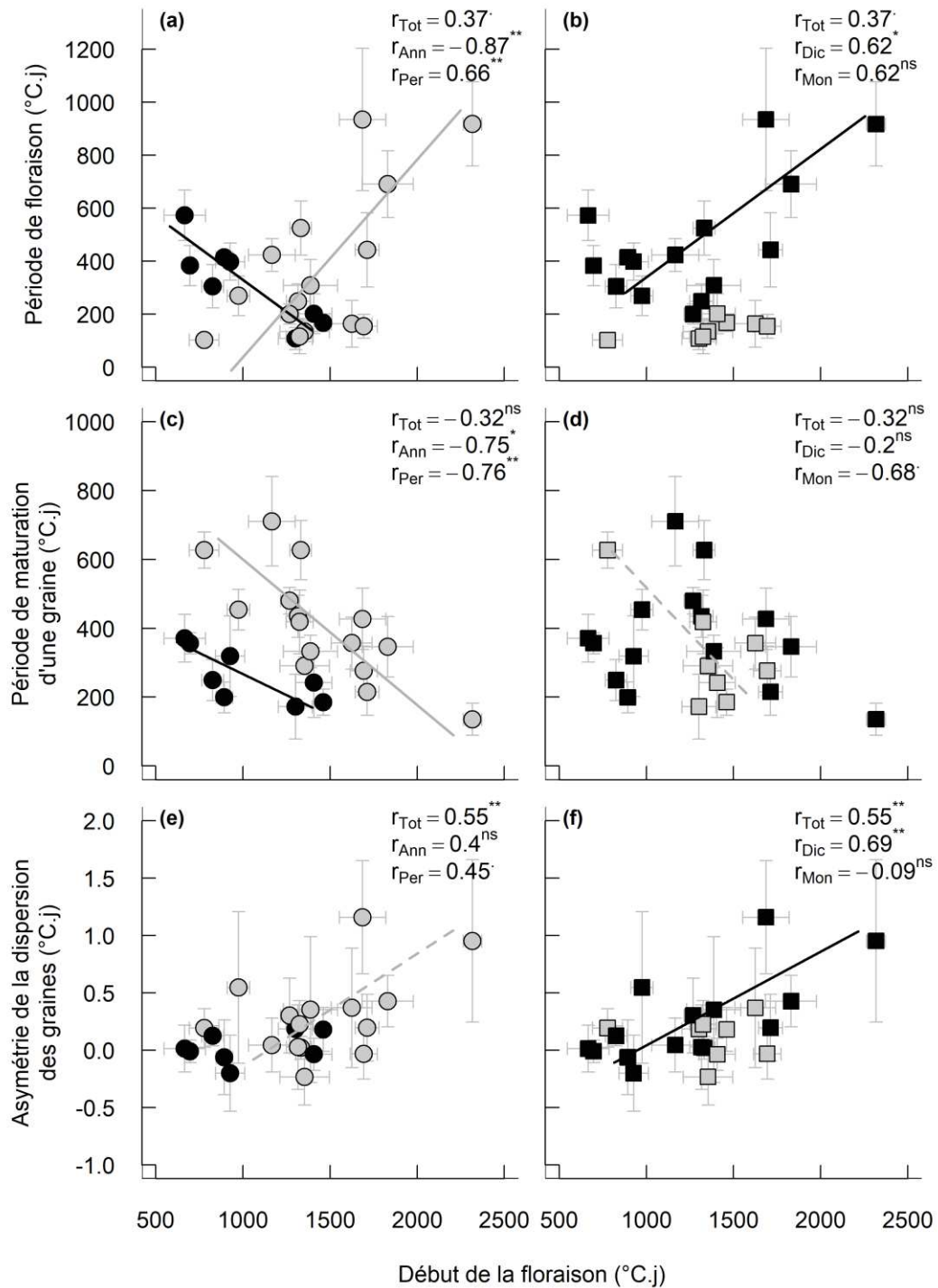


FIGURE 6 | Relations entre la date de floraison et la période de floraison (a, b), la période de maturation d'une graine (b, c) et l'asymétrie de la dispersion des graines (e, f) selon le cycle de vie (a, c et e, cercles noirs pour les annuelles et gris pour les pérennes) ou le groupe taxonomique (b, d et f, carrés noirs pour les dicotylédones et gris pour les monocotylédones) des espèces. Les barres grises représentent les écart-types pour chaque espèce. Les coefficients de Pearson pour l'ensemble des espèces (r_{Tot}) ou pour chaque groupe d'espèce (r_{Ann} : annuelles, r_{Per} : pérennes, r_{Dic} : dicotylédones, r_{Mon} : monocotylédones), ainsi que leur significativité sont mentionnés dans chaque panneau (ns : P-val > 0.1 ; . : P-val < 0.1 ; * : P-val < 0.05; ** : P-val < 0.01). Lorsque la corrélation est significative, la droite de régression est représentée (droite continue : P-val < 0.05, droite discontinue : P-val < 0.1).

3.3 Relation entre le phyllochrone et la date de floraison

On trouve une relation positive entre le phyllochrone et la date début de floraison chez les espèces annuelles et chez les dicotylédones (Fig. 7). Cette relation n'est pas maintenue chez les monocotylédones (Fig. 7b). Pour les relations significatives, la comparaison des r^2 montre un meilleur ajustement d'une loi de puissance entre ces deux traits par rapport à une relation linéaire.

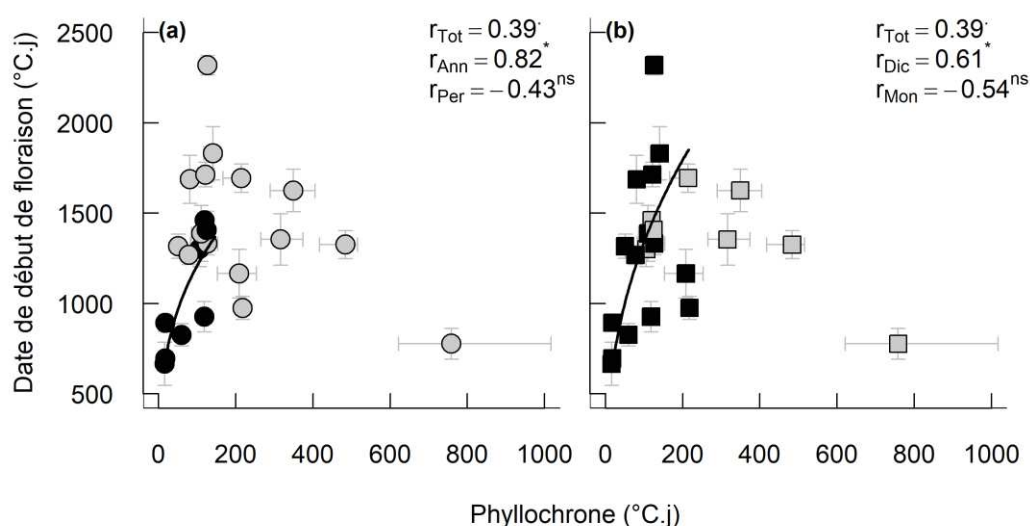


FIGURE 7 | Relations entre le phyllochrone et la date de début de floraison selon le cycle de vie (a, cercles noirs pour les annuelles et gris pour les pérennes) ou le groupe taxonomique (b, carrés noirs pour les dicotylédones et gris pour les monocotylédones) des espèces. Les barres grises représentent les écart-types pour chaque espèce. Les coefficients de Pearson pour l'ensemble des espèces (r_{Tot}) ou pour chaque groupe d'espèce (r_{Ann} : annuelles, r_{Per} : pérennes, r_{Dic} : dicotylédones, r_{Mon} : monocotylédones), ainsi que leur significativité sont mentionnés dans chaque panneau (ns : P-val > 0.1 ; . : P-val < 0.1 ; * : P-val < 0.05). Lorsque la corrélation est significative, la droite de régression est représentée (P-val < 0.05).

4 DISCUSSION

4.1 Une forte coordination entre la floraison et la dispersion des graines

Toutes les espèces étudiées ont des courbes de floraisons et de dispersion des graines de formes identiques. Le temps de développement d'une graine (Heydel & Tackenberg 2017) ne semble pas être affecté par la date à laquelle la graine est produite. Le nombre de graines en dispersion peut donc être prédit par le nombre de fleurs mesurés k jours avant (k étant la période de maturation d'une graine). Bien que souvent considéré comme trivial, ce résultat semble varier selon le type d'espèces ou le biome. Wheelwright (1985) trouve notamment un

découplage entre la durée de la floraison et de la dispersion des graines chez 22 espèces de Lauracées de forêt tropicale du Costa Rica : des fruits produits à partir de fleurs ouvertes au même moment se développent à des rythmes différents et certaines espèces ont des périodes de floraison brèves associées à des périodes de dispersion des graines longues. Ainsi, il est considéré que le programme développemental des arbres tropicaux est suffisamment souple pour découpler la floraison et la dispersion des graines (van Schaik, Terborgh & Wright 1993) permettant une meilleure adaptations aux contraintes spécifiques à chacun de ces stades (présence du pollinisateur pour la floraison et période de mousson pour la dispersion des graines par exemple). D'après nos résultats, ce découplage ne semble pas possible dans le cas des espèces herbacées en milieu méditerranéen.

Ces résultats, bien que peu testés dans des études comparatives, ont des conséquences importantes dans la compréhension des patrons phénologiques. En effet, la floraison et la dispersion des graines sont généralement soumises à des pressions de sélection différentes (synchronisation avec la présence des pollinisateurs et des agents de dispersion, différences de sensibilité aux pathogènes ou aux risques climatiques, etc...) mais leur éventuelle coordination peut empêcher l'expression du phénotype le plus adapté (Ehrlén 2015). Dans le cas d'une forte coordination entre ces phases (comme trouvée dans cette étude), la sélection n'agit pas sur chaque stade indépendamment mais sur l'ensemble des phases de la reproduction. La prise en compte du niveau de coordination entre les phases permettrait donc d'expliquer des décalages potentiels entre les dates optimales pour chaque stade et les observations, typiquement dans le cas de l'étude des adaptations aux changements climatiques. À notre connaissance, aucune étude n'a étudié la coordination de ces phases pour une large gamme d'espèces et dans des biomes différents afin d'identifier les facteurs déterminants et les processus biologiques à son origine.

4.2 Compromis temps-taille ou continuum rapide-lent ?

Nous n'avons pas trouvé de relation entre la date de floraison et la période reproductive et ne pouvons donc pas conclure clairement quant à la validité des hypothèses proposées. Cependant, les trois espèces ayant les floraisons les plus tardives sont également celles qui ont les plus longues périodes reproductives dans notre jeu de données. Nous n'avons donc pas mis en évidence de sélection pour des périodes reproductives plus courtes en fin de saison contrairement à ce que prédit le compromis temps-taille (Primack 1987; Bolmgren & Cowan 2008).

Afin d'étudier plus en détail l'effet de la date de floraison sur la période reproductive, on peut décomposer cette dernière en deux caractéristiques majeures : (1) la synchronisation de la production de graines et (2) la période de maturation d'une graine. Par exemple, une période reproductive longue peut être le résultat (1) d'une forte synchronisation de la production de graines à temps de développement long ou (2) d'une désynchronisation de la production de graines à temps de développement rapide. Ces deux composantes sont généralement estimées respectivement par (1) la période de floraison, qui correspond à la période pendant laquelle les graines sont initiées (Dickinson & Dodd 1976; Grime *et al.* 1997) et (2) la masse d'une graine, qui est supposée proportionnelle au temps de maturation (Wheelwright 1985; Moles & Westoby 2003; Heydel & Tackenberg 2017). Dans notre étude, nous avons montré une augmentation de la période de floraison pour les espèces tardives. Ce résultat est cohérent avec ce qui a pu être trouvé par ailleurs en Méditerranée (Herrera 1986; Petanidou *et al.* 1995) mais ne semble pas être généralisable car d'autres études ont montré la relation inverse (Bawa, Kang & Grayum 2003; Thompson 2005; Laughlin *et al.* 2010; Jia *et al.* 2011). Aussi, nous avons montré une diminution de la période de maturation d'une graine pour les espèces tardives. Ce résultat est cohérent avec plusieurs études pour plusieurs formes de croissance et de biomes (Primack 1985; Vile, Shipley & Garnier 2006; Bolmgren & Cowan 2008; Laughlin *et al.* 2010; Jia *et al.* 2011) mais va à l'encontre de ce que l'on trouve pour 138 espèces dans des conditions naturelles de la partie méditerranéenne du sud de la France (Segrestin *et al.* in press).

Enfin, nous avons caractérisé la synchronisation de la production de graine en intégrant, en plus de la période de floraison, un indice d'asymétrie de la dispersion des graines comme proposé par Primack (1985) et Thomson (1980). En effet, la période reproductive peut être significativement allongée par la présence d'une queue de distribution de la production de graine. Dans ce cas, on observe un pic de production de graines fortement synchronisée suivi d'une faible production de graine étalée dans le temps. Ce type de stratégie peut être avantageux notamment pour les espèces tardives, comme observé dans cette étude, leur permettant de profiter des variations interannuelles du démarrage de la mauvaise saison (Herrera 1986).

Pour conclure, et malgré le faible nombre d'espèces étudiées dans cette analyse, quelques tendances semblent émerger et encouragent la réalisation d'études supplémentaires sur ce sujet :

(1) Chez les espèces dicotylédones, on observe des périodes reproductives plus longues chez les espèces à floraison tardive. Ces espèces produisent leurs graines rapidement en comparaison aux espèces précoces mais de manière plus désynchronisée. Cette désynchronisation est couplée à une asymétrie de la production de graines constituée d'un pic de production précoce suivi d'une queue de distribution. L'ensemble de ces caractéristiques peuvent être interprétées comme le résultat d'une sélection pour une production massive de graines rapides à produire, pour assurer la maturation de la plupart des graines avant le démarrage de la mauvaise saison, suivie d'une plus faible production de graines pour profiter des variations interannuelles du démarrage de la mauvaise saison (Herrera 1986). D'autre part, les dicotylédones à floraison précoce et intermédiaire, sont associées à des temps de développement des graines courts (chez les annuelles) ou longs (chez les pérennes) et présentent une plus forte synchronisation de leur production de graines qui apparaît proche de la symétrie.

(2) les espèces monocotylédones étudiées sont beaucoup moins variables sur leur phénologie de la reproduction. Elles fleurissent au milieu de la saison favorable, sans distinction entre les annuelles et les pérennes et ont des périodes reproductives particulièrement courtes, en raison d'une forte synchronisation de la production de graine. Ce résultat est probablement lié au caractère déterminé de la croissance des talles des graminoides. La position apicale des bourgeons floraux sur l'axe végétatif impose un développement plus synchronisé des organes reproductifs en comparaison aux espèces dont les axes ont une croissance indéterminées et qui fleurissent à partir de bourgeons latéraux (Jackson & Bliss 1984; Kochmer & Handel 1986). De plus, toutes les monocotylédones étudiées sont des graminoides et sept des huit espèces étudiées appartiennent à la famille des Poacées. Or, il a été montré que les traits phénologiques, et particulièrement les traits de la floraison, présentent un fort signal phylogénétique (Kochmer & Handel 1986; Johnson 1992; Davies *et al.* 2013) suggérant la conservation de contraintes développementales sur la phénologie de la reproduction au sein des lignées. Les faibles gammes de variation obtenues ne permettent pas de tester les relations étudiées avec suffisamment de puissance statistique et davantage de diversité phylogénétique serait nécessaire pour tester ces relations dans de futures études.

4.3 Impact de la phénologie végétative sur la date de floraison

Le phyllochrone correspond à la période, exprimée en degré jours, séparant l'apparition de deux feuilles successives (Wilhelm & McMaster 1995). Cette mesure est utilisée dans certains modèles agronomiques en association avec le nombre de feuilles à la floraison pour prédire la date de floraison (Truong & Duthion 1993 chez le petit pois; Roche, Jeuffroy & Ney 1999 chez le blé). Dans notre étude, on observe que les espèces dicotylédones ayant un rythme de développement des feuilles lent (associé à un phyllochrone élevé) ont une floraison tardive. Ce résultat concorde avec l'analyse de Sun and Frelich (2011) qui trouvent une relation négative entre la vitesse de croissance relative en hauteur et la date de floraison de 25 espèces herbacées majoritairement dicotylédones. Cependant, la relation trouvée dans notre étude est relativement faible et elle n'est pas conservée chez les monocotylédones. Par exemple, *Carex humilis* a une floraison précoce tout en ayant un phyllochrone très élevé. En effet, la floraison de cette espèce intervient en mars avant la reprise de croissance végétative (en avril) et correspond donc au passage à la reproduction de talles produites l'année précédente. Ainsi, une meilleure prédiction de la date de floraison nécessiterait la mesure de paramètres supplémentaires sur le cycle végétatif pour le reste des espèces étudiées.

Diggle (1999) propose de prédire la date de floraison à partir de trois composantes : (1) la date de démarrage de végétation, (2) le rythme de développement végétatif et (3) le stade de développement au passage à la reproduction. Sola and Ehrlén (2007) ont testé cette décomposition chez *Lathyrus vernus* et expliquent les différences de floraison observées entre populations à partir de mesures (1) du démarrage de la croissance végétative, (2) du temps de croissance de la tige et (3) de la position du premier bourgeon floral sur l'axe végétatif. Cependant, aucune étude n'a encore évalué l'effet relatif de ces composantes à une échelle interspécifique et plus d'études sur ce sujet semblent nécessaires. Dans notre cas, toutes les espèces annuelles ont germé à la même date, ce qui suggère que la variation de date de floraison pour une même vitesse de développement végétatif dépend uniquement des différences ontogéniques entre espèces. De plus, on trouve la même relation pour les espèces dicotylédones, ce qui suggère peu de variabilité sur le démarrage de végétation de ces espèces contrairement aux espèces monocotylédones. La validation de ces hypothèses nécessite davantage donc de mesures afin de caractériser plus précisément la croissance des plantes et tester le modèle de Diggle (1999) pour une large gamme d'espèces.

5 CONCLUSIONS

Cette étude analyse la coordination entre plusieurs stades de la phénologie végétative et reproductive pour une vingtaine d'espèces de petite stature. Nous n'avons pas détecté de sélection pour des périodes reproductives courtes en fin de saison, ne permettant pas de valider les hypothèses du compromis temps-taille. Le programme développemental des espèces semble être particulièrement contraint par une séquence de stades phénologiques. Ainsi, la date de floraison dépend du rythme de développement végétatif, notamment chez les dicotylédones et la période de maturation d'une graine semble être particulièrement conservée au sein d'une espèce, contraignant la période de dispersion des graines. Nos résultats suggèrent donc que les stades phénologiques des espèces de petite stature en Méditerranée sont le résultat du programme développemental des espèces et ne sont pas déclenchés indépendamment par des facteurs externes (Rathcke & Lacey 1985). La comparaison des cycles phénologiques des mêmes génotypes dans différents contextes climatiques permettrait de confirmer cette hypothèse de manière plus explicite.

6 RÉFÉRENCES

- Bawa, K.S., Kang, H. & Grayum, M.H. (2003) Relationships among time, frequency, and duration of flowering in tropical rain forest trees. *American Journal of Botany*, **90**, 877-887.
- Bolmgren, K. & Cowan, P.D. (2008) Time – size tradeoffs: a phylogenetic comparative study of flowering time, plant height and seed mass in a north-temperate flora. *Oikos*, **117**, 424-429.
- Bonhomme, R. (2000) Bases and limits to using 'degree. day' units. *European journal of agronomy*, **13**, 1-10.
- Crimmins, T.M., Crimmins, M.A. & Bertelsen, C.D. (2011) Onset of summer flowering in a 'Sky Island' is driven by monsoon moisture. *New Phytologist*, **191**, 468-479.
- Daget, P. (1977) Le bioclimat méditerranéen: analyse des formes climatiques par le système d'Emberger. *Vegetatio*, **34**, 87-103.
- Davies, T.J., Wolkovich, E.M., Kraft, N.J., Salamin, N., Allen, J.M., Ault, T.R., Betancourt, J.L., Bolmgren, K., Cleland, E.E. & Cook, B.I. (2013) Phylogenetic conservatism in plant phenology. *Journal of Ecology*, **101**, 1520-1530.
- Dickinson, C. & Dodd, J.L. (1976) Phenological pattern in the shortgrass prairie. *American Midland Naturalist*, **96**, 367-378.
- Diggle, P.K. (1999) Heteroblasty and the evolution of flowering phenologies. *International Journal of Plant Sciences*, **160**, S123-S134.
- Ehrlén, J. (2015) Selection on flowering time in a life-cycle context. *Oikos*, **124**, 92-101.
- Fitter, A.H. & Fitter, R.S.R. (2002) Rapid changes in flowering time in British plants. *Science*, **296**, 1689-1691.
- Forrest, J. & Miller-Rushing, A.J. (2010) Toward a synthetic understanding of the role of phenology in ecology and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **365**, 3101-3112.
- Franks, S.J., Sim, S. & Weis, A.E. (2007) Rapid evolution of flowering time by an annual plant in response to a climate fluctuation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 1278-1282.
- Garnier, E., Navas, M.-L. & Grigulis, K. (2016) *Plant functional diversity: organism traits, community structure, and ecosystem properties*. Oxford University Press, Oxford.

- Grainger, J. (1939) Studies upon the time of flowering of plants: anatomical, floristic and phenological aspects of the problem. *Annals of Applied Biology*, **26**, 684-704.
- Grime, J., Thompson, K., Hunt, R., Hodgson, J., Cornelissen, J., Rorison, I., Hendry, G., Ashenden, T., Askew, A. & Band, S. (1997) Integrated screening validates primary axes of specialisation in plants. *Oikos*, 259-281.
- Herrera, J. (1986) Flowering and fruiting phenology in the coastal shrublands of Doñana, south Spain. *Vegetatio*, **68**, 91-98.
- Heydel, F. & Tackenberg, O. (2017) How are the phenologies of ripening and seed release affected by species' ecology and evolution? *Oikos*, **126**, 738-747.
- Inouye, D.W. (2008) Effects of climate change on phenology, frost damage, and floral abundance of montane wildflowers. *Ecology*, **89**, 353-362.
- Jackson, L.E. & Bliss, L. (1984) Phenology and water relations of three plant life forms in a dry tree-line meadow. *Ecology*, **65**, 1302-1314.
- Jia, P., Bayaerta, T., Li, X. & Du, G. (2011) Relationships between flowering phenology and functional traits in eastern Tibet alpine meadow. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, **43**, 585-592.
- Johnson, S.D. (1992) Climatic and Phylogenetic Determinants of Flowering Seasonality in the Cape Flora. *Journal of Ecology*, **81**, 567-572.
- Kochmer, J.P. & Handel, S.N. (1986) Constraints and competition in the evolution of flowering phenology. *Ecological Monographs*, **56**, 303-325.
- Laughlin, D.C., Leppert, J.J., Moore, M.M. & Sieg, C.H. (2010) A multi-trait test of the leaf-height-seed plant strategy scheme with 133 species from a pine forest flora. *Functional Ecology*, **24**, 493-501.
- Moles, A.T. & Westoby, M. (2003) Latitude, seed predation and seed mass. *Journal of Biogeography*, **30**, 105-128.
- Pau, S., Wolkovich, E.M., Cook, B.I., Davies, T.J., Kraft, N.J., Bolmgren, K., Betancourt, J.L. & Cleland, E.E. (2011) Predicting phenology by integrating ecology, evolution and climate science. *Global Change Biology*, **17**, 3633-3643.
- Petanidou, T., Ellis, W.N., Margaritis, N.S. & Vokou, D. (1995) Constraints on flowering phenology in a phrygane (East Mediterranean shrub) community. *American Journal of Botany*, 607-620.
- Primack, R.B. (1985) Patterns of Flowering Phenology in Communities, Populations, Individuals, and Single Flowers. *The Population Structure of Vegetation. Handbook of Vegetation Science* (ed. W. J.). Springer, Dordrecht.
- Primack, R.B. (1987) Relationships among flowers, fruits, and seeds. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, 409-430.
- Rathcke, B. & Lacey, E.P. (1985) Phenological patterns of terrestrial plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **16**, 179-214.
- Reich, P.B. (2014) The world-wide 'fast-slow' plant economics spectrum: a traits manifesto. *Journal of Ecology*, **102**, 275-301.
- Roche, R., Jeuffroy, M.-H. & Ney, B. (1999) Comparison of different models predicting the date of beginning of flowering in pea (*Pisum sativum* L.). *Ecological Modelling*, **118**, 213-226.
- Schwartz, M.D. (2003) Phenology: An integrative environmental science. Springer, Dordrecht.
- Segrestin, J., Bernard-Verdier, M., Violle, C., Richarte, J., Navas, M.-L. & Garnier, E. (in press) When is the best time to flower and disperse? A comparative analysis of plant reproductive phenology in the Mediterranean. *Functional Ecology*.
- Sola, A.J. & Ehrlén, J. (2007) Vegetative phenology constrains the onset of flowering in the perennial herb *Lathyrus vernus*. *Journal of Ecology*, **95**, 208-216.
- Sun, S. & Frelich, L.E. (2011) Flowering phenology and height growth pattern are associated with maximum plant height, relative growth rate and stem tissue mass density in herbaceous grassland species. *Journal of Ecology*, **99**, 991-1000.
- Thompson, J.D. (2005) *Plant evolution in the Mediterranean*. Oxford University Press.
- Thomson, J.D. (1980) Skewed flowering distributions and pollinator attraction. *Ecology*, **61**, 572-579.
- Truong, H. & Duthion, C. (1993) Time of flowering of pea (*Pisum sativum* L.) as a function of leaf appearance rate and node of first flower. *Annals of botany*, **72**, 133-142.

- van Schaik, C.P., Terborgh, J.W. & Wright, S.J. (1993) The Phenology of Tropical Forests: Adaptive Significance and Consequences for Primary Consumers. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **24**, 353-377.
- Vile, D., Shipley, B. & Garnier, E. (2006) A structural equation model to integrate changes in functional strategies during old-field succession. *Ecology*, **87**, 504-517.
- Warton, D.I., Duursma, R.A., Falster, D.S. & Taskinen, S. (2012) smatr 3—an R package for estimation and inference about allometric lines. *Methods in Ecology and Evolution*, **3**, 257-259.
- Wheelwright, N.T. (1985) Competition for dispersers, and the timing of flowering and fruiting in a guild of tropical trees. *Oikos*, 465-477.
- Wilhelm, W. & McMaster, G.S. (1995) Importance of the phyllochron in studying development and growth in grasses. *Crop Science*, **35**, 1-3.

Chapitre 4

La phénologie de la reproduction comme axe de variation fonctionnelle : intégrer le facteur temporel dans l'espace phénotypique



**REPRODUCTIVE PHENOLOGY AS A FUNCTIONAL DIMENSION:
INTEGRATING THE TIME FACTOR IN PLANT PHENOTYPIC SPACE**

J. Segrestin* ^a, M.-L. Navas ^b & E. Garnier ^a

in prep for a submission to New Phytologist

^a CEFÉ UMR 5175, Université de Montpellier – Université Paul Valéry – EPHE, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France

^b Montpellier SupAgro, CEFÉ UMR 5175, Université de Montpellier – Université Paul Valéry 5 – EPHE, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France

* Corresponding author: jules.segrestin@cefe.cnrs.fr

Running Headline: Reproductive phenology in the phenotypic space

1 INTRODUCTION

Reproductive phenology describes the temporality of key events in organism life cycles (Lechowicz 2002; Schwartz 2003). It corresponds to a period when resource allocation is diverted towards reproduction at the expense of parental growth and survival (Cohen 1976). The timing of reproductive events has long been known to play a key role in the matching between organisms and their environment (Rathcke & Lacey 1985). As such, it is an important component of ecology strategies (Wolkovich & Cleland 2014) and represents a critical dimension of plant functioning that has been largely understudied in trait based studies (Grime 1977; Weiher *et al.* 1999; Laughlin 2014; Wolkovich & Ettinger 2014). How reproductive events relate to other plants functional dimensions - defined as groups of correlated phenotypic traits reflecting constraints and trade-offs that structure the plant phenotype (Westoby *et al.* 2002; Laughlin 2014) - and integrate into the whole phenotype thus remains to be established (Table 1 and see Wolkovich & Cleland 2014).

At least three major functional dimensions are recognized in plants (Westoby 1998): (1) a dimension pertaining to plant regeneration, which describes a trade-off between the production of few large seeds (favoring establishment) or of many small seeds (favoring dispersion) (Leishman *et al.* 2000), (2) a size dimension, which describes plant stature and competitive abilities and (3) a dimension of resource use by leaves, which represents a trade-off between the rate of resource acquisition and the efficiency of resource conservation (the “leaf economics spectrum”: Wright *et al.* 2004). In a recent study, Díaz *et al.* (2016) show the range of variation and the covariation among six traits for more than 2,200 species from all terrestrial biomes. They found that three quarters of trait variation is captured by a two-dimensional global spectrum of plant form and function with the regeneration and the size axes were correlated to the first dimension and the leaf economic spectrum to the second. The major purpose of this study is to test whether reproductive phenology correlates to these two dimensions or represents an independent axis in the plant phenotypic space. Two major hypotheses of relationships between reproductive phenology and these dimensions have been proposed in the literature. First, Primack (1987) postulated a triangular-shaped relationship between the period necessary to mature seeds and the mass of the seed at maturity. Indeed, we can expect some variability in seed mass at maturity at a given seed maturation period due to differences between species in rate of the seed development. However, this rate may be limited to a maximum value by physiological constraint, preventing to exceed a maximal seed mass at a given seed maturation period. The plant phenotype is therefore constrained by this

physiological limit and the combinations of large seed mass and short seed maturation period appear impossible. Only few studies confirmed this hypothesis by showing positive relationship between the two traits on a limited number of species (Table 1). The second hypothesis, which applies to herbaceous plants growing under a seasonal climate, states that plants that flower early have little time for maternal plant growth resulting in smaller size at time of reproduction, while plants that flower late can grow bigger (Primack 1987; Bolmgren & Cowan 2008). Thus, we expect a positive relationship between the onset of the flowering and maximum plant height, which is indeed the most frequent relationship found in the literature (Table 1). So far, no clear hypotheses have been postulated to link leaf traits and reproductive phenology. Only few weak correlations have been found for herbaceous species between the reproductive phenology and the leaf dry mater content or the leaf nitrogen concentration (Table 1). These relationships are generally interpreted as an indirect effect of leaf traits on reproductive phenology through growth patterns. Low values of leaf dry mater content and high values of leaf nitrogen concentration are generally associated to fast growing species that tend to flower earlier.

Table 1 shows that trait-based studies that account for reproductive phenology have mainly focused on flowering. Besides being one of the most conspicuous stage, onset of flowering is indeed a good descriptor of the beginning of the reproductive period and is known to be strongly under selection (Ehrlén 2015). Much less is known about other aspects of reproductive phenology however, such as the patterns of seed maturation length and seed dispersal time (cf. Willson & Traveset 2000; Heydel & Tackenberg 2017), and to our knowledge, no study has tested simultaneously all the hypotheses mentioned above using data collected simultaneously on the same set of species.

The objective of this study is to test the relationships between four markers of plant reproductive phenology (one describing the flowering, two for the seed maturation and one for the seed dispersal temporality), several traits related to the major functional dimensions described above, and one trait related to plant water economy. To do so, we used trait data for 117 species belonging to three growth forms (herbaceous annuals, herbaceous perennials and perennial woody species of low stature) growing in the Mediterranean region of southern France. First, the covariations between all traits were observed to study the structure of the phenotypic space occupied by the plant species in our dataset and the role of reproductive phenology in this space. Then, a particular attention was paid on the following questions: (1) can we observe a triangular-shaped relationship between seed mass at maturity and the seed

maturation period? If so, are different growth forms in specific regions of the triangle? (2) Do we find the expected correlation between plant reproductive height and the onset of the reproductive period only for herbaceous species? Can this relationship still be found with other size-related traits (i.e. area of leaf)? And (3) what are the relationships between leaf traits and reproductive phenology? Finally, since patterns of trait covariations can be influenced by the phylogenetic relationships among the species studied (Felsenstein 1985), we tested the effects of accounting for phylogeny on the outcomes of the analyses.

TABLE 1 | Relationships between reproductive phenology traits and other functional traits found in different studies. ↗ and ↘ indicate respectively a positive and a negative correlation between the two traits considered, while ↔ indicates a tested but not significant correlation. Each arrow is based on a different number of studies specified in brackets. (↗) indicates that a positive relationship has been hypothesized in the literature, but that it has not been tested. Empty cells indicate that, to our knowledge, the relationship has not been tested. This table builds upon Wolkovich and Cleland (2014), further accounting for results found in Mooney *et al.* (1986); Primack (1987); Chiariello (1989); Mazer (1989); Eriksson and Ehrlén (1991); Smith-Ramírez, Armesto and Figueroa (1998); Moles and Westoby (2003); Louault *et al.* (2005); Vile, Shipley and Garnier (2006); Bolmgren and Cowan (2008); Ansquer *et al.* (2009); Duru *et al.* (2009); Du and Qi (2010); Laughlin *et al.* (2010); Jia *et al.* (2011); Sun and Frelich (2011); Catorci *et al.* (2012); Craine *et al.* (2012); Heydel and Tackenberg (2017).

	Reproductive plant height	Leaf area	Seed mass	Leaf mass per area	Leaf dry matter content	Leaf nitrogen concentration	δ ¹³ C
Onset of flowering	↗ (9)	↔ (1)	↘ (6) or ↗ (2) or ↔ (1)	↔ (4)	↗ (4) or ↔ (1)	↘ (1) or ↔ (1)	(↗)
Onset of dispersal	(↗)				↗ (1)		
Seed maturation period			↗ (4)				

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Location of study sites and environmental conditions

This study is based on a dataset which combines data for 117 species, collected during several surveys conducted between 1998 and 2010 in four sites located in the Mediterranean region of Southern France (Table 2). The climates of these sites are classified as Mediterranean humid to sub-humid, with a marked summer drought, frosts in winter and unpredictability of

precipitation in timing and amount, with generally frequent heavy rainfall events in autumn (Daget 1977a). Daily values of temperature, precipitation and Penman-Monteith evapotranspiration (PET) were taken from meteorological stations closest to the sites.

The plant species were monitored in three different treatments in La Fage (ungrazed and unfertilized, grazed and unfertilized, grazed and fertilized) and two treatments in Camp Redon (unfertilized and fertilized). See (Segrestin *et al.* in press) for a more detailed description of the experimental designs.

TABLE 2 | Characterization of the studied sites. Climatic data are based on daily measurements averaged over the 1981 – 2010 period, taken from the meteorological stations closest to the sites (on site for FAG and CRE and at Saint-Martin-de-Londres (43°47'06"N; 3°43'48"E; 194m) and Vic Le Fesq (43°52'12"N; 4°04'18"E; 45m) for CAZ and HGM). GDDa (Bonhomme 2000) is the total annual growing degree days is the sum of daily mean temperatures higher than a 5°C base temperature and lower to 18°C, for every day of the year. TAW is the total soil available water at full capacity.

	La Fage experimental station (FAG)	Cazarils (CAZ)	Montpelliérais old field succession (HGM)	Camp Redon (CRE)
Longitude	43°55'N	43°46' N	43°51' N	43°38' N
Latitude	3°05'E	3°42'E	3°56' E	3°52' E
Altitudinal range (m)	765-830	240-310	100-160	55-58
Mean annual temperature (°C)	9.8	13.4	13.6	14.4
GDDa (°C days)	1,926	3,095	3,153	3,448
Mean annual precipitations (mm)	1035	1076	952	782
PETa (mm)	814	1,294	1,294	1,261
TAW range (mm)	26.2-48.2	63.2	55.6-56.0	60
Reference	Molénat <i>et al.</i> (2005)	Aronson <i>et al.</i> (1998)	Garnier <i>et al.</i> (2004)	Kazakou <i>et al.</i> (2007)

2.2 Collection of trait data in the study sites

Reproductive phenology was characterized at the population level, defined here as a group of individuals of the same species growing in similar conditions in the same site, during a given year. Onset of flowering (flowering hereafter) and dispersal (dispersal hereafter) were assessed in the different sites from weekly surveys, either from the monitoring of 10 marked individuals per population (in Cazarils) or from visual assessment of the first flowering and dispersing individuals in different plots per population (in Camp Redon, Montpelliérais old-fields, and La Fage).

Seven other traits were measured on selected individuals from the same populations (Table 3). The reproductive plant height (HRep hereafter) and the area of leaf (LA hereafter) were used as markers of the plant stature dimension; the seed mass (SM hereafter) was used for the plant regeneration dimension; the leaf mass per area (LMA hereafter), the leaf dry matter content (LDMC hereafter) and the mass based leaf nitrogen concentration (N_{mass} hereafter) were used for the “leaf economic spectrum” dimension; and the leaf carbon isotope ratio $^{13}\text{C}: ^{12}\text{C}$ ($\delta^{13}\text{C}$ hereafter) was used to describe the plant water economy dimension. All traits were measured according to standardized protocols described in Pérez-Harguindeguy *et al.* (2013).

Overall, a total of 272 populations were surveyed across the four sites. Of the 117 species measured, 51 species were represented by one population, 56 species were represented by 2 to 5 populations, and 10 species by more than 5 populations. *Bromopsis erecta* was the most represented species in the dataset with 9 populations. The 117 species could be allocated to three growth forms: 43 annuals, 50 herbaceous perennials and 24 low stature woody perennials (chamaephytes).

TABLE 3 | The 11 traits used as functional markers of different plant functions, including phenology, resource management, competitive abilities and reproduction. Their abbreviation, unit of expression and number of replicates used per population are given. The column with number of replicates contains the median values for all sites and years. The traits used in the global spectrum of plant form and function (Díaz *et al.* 2016) are preceded by an asterisk

Trait	Plant function	Abbreviation	Unit	Replicates per population
Onset of flowering	Beginning of the reproductive period	OF	°C days	2
Onset of dispersal	First reproductive success in the reproductive period	OD	°C days	2
Seed maturation period	Shortest reproductive period allowing reproductive success	SMP	°C days	2
Water deficit during SMP	Temporal match between the reproductive period and the summer drought period	SWD _{SMP}	mm/mm days	2
*Reproductive plant height	Plant stature, competitive abilities, flower exposure, dispersal capacities	Hrep	m	18
*Leaf area	Organ size, competition for light, transpiration	LA	mm ²	10
*Seed mass	Organ size, colonization dispersal tradeoff	SM	mg	5
*Leaf mass per area	Light capture per unit of biomass, photosynthetic capacities	LMA	kg.m ⁻²	10
Leaf dry matter content	Tissue density, light transmission, photosynthetic capacities	LDMC	mg.g ⁻¹	10
*Leaf nitrogen concentration	Protein concentration, photosynthetic capacities	Nmass	mg.g ⁻¹	4
Leaf carbon isotope ratio $^{13}\text{C}: ^{12}\text{C}$	Water use efficiency	$\delta^{13}\text{C}$	‰	3

2.3 Normalization of phenological data and water deficit index

To account for temperature differences between years and sites, onset of flowering and dispersal were expressed on a growing degree day basis ($^{\circ}\text{C d}$) (DD: e.g. Diekmann 1996) summing daily mean temperatures since January 1st of the year of measurements and using a 5°C base temperature and a 18°C threshold temperature. The length of seed maturation period (seed maturation hereafter) was also assessed in degree days ($^{\circ}\text{C days}$), as the difference between the onset of flowering and the onset of dispersal ($\text{SMP} = \text{OD} - \text{OF}$); it is interpreted as the minimum degree days required to produce at least one seed.

The temporal match between the reproductive period and the summer drought was assessed by a soil water deficit index. Daily soil water content was estimated using a bucket-type model based on rainfall, potential ETP, and soil total available water capacity (TAW hereafter) (see Boulant et al. 2008 for model description). The simulated data were used to calculate a relative soil water content (S) as a proportion of TAW on a daily basis. The cumulated soil water deficit during the seed maturation (SWD_{SMP}) was computed for each population as follows:

$$\text{SWD}_{\text{SMP}} = \sum_{d=\text{OF}}^{\text{OD}} \max\left(-\ln\left(\frac{S_d}{S_{\text{lim}}}\right); 0\right) \quad (1)$$

With S_d the relative soil water content at day d ($d \in [\text{FLO}:\text{DISP}]$), and S_{lim} is the S value under which it is considered that water is limiting for plant growth (fixed here at 50% of the TAW). The log-transformation of the ratio reflects the log-linear relationship between soil water content and soil water potential (Hillel, 1971). The opposite value of this log ratio was used to express SWD_{SMP} in positive values: a low water availability during seed maturation results in high values of the index. SWD_{SMP} takes null (no water deficit during seed maturation) or positive values. It accounts not only for the length of the water deficit period, but also for its intensity (see Segrestin *et al.* in press).

2.4 From population to species values

To study patterns of trait covariations at the inter-specific level, we estimated mean values for each species that account for potential sources of intra-specific variations. The effects of (1) differences among sites, (2) years, and (3) fertilization treatments on intra-specific trait variation were studied. A linear mixed model was used to estimate the best linear unbiased predictors (BLUPs: Henderson 1975) of trait value for each species. Species identity was considered as a fixed factor and the site, year of measurement and fertilization treatment as

random factors. The relevance of each random factor was assessed by a model selection based on Akaike information criterion (AIC) comparisons. Overall, height models were tested for each trait corresponding to every combination of random factors (1: no random factor; 2: year only; 3: site only; 4: fertilization only; 5: year and site; 6: year and fertilization; 7: site and fertilization; 8: year, site and fertilization factors). A random factor was selected if it improved the AIC value at least by two points. When no random factor was selected, the BLUPs were equivalent to the arithmetic means per species. Raw values of HRep, LA, SM, LMA, LDMC and N_{mass} were log10 transformed before applying these models to fulfill normality assumptions. For the sake of clarity, we will refer to “BLUPs” as “estimated means” in the following.

The quality of the selected models was tested. First, the significance of the species factor was tested using a type II ANOVA (R package “car” – Fox & Weisberg 2011). Then, parameters equivalent to the R^2 for linear mixed models were computed using the R package “MuMIn” (Bartoń 2013): (1) the conditional R^2 (R^2_c), interpreted as the variance explained by both fixed and random factors (i.e. the entire model) and (2) the marginal R^2 (R^2_m), representing the variance explained by fixed factors only. The closer to 1, the better the quality of the model. Moreover, the lower the difference between the two R^2 values, the lower the effects of random factors, meaning lower intra-specific compared to inter-specific variability.

Maximum values of SWD_{SMP} were considered to be better indicators of the ability of a plant to cope with drought than average values (cf. Chiariello 1989; Skelton, West & Dawson 2015). Therefore, the procedure described above was not applied to estimate the water deficit index at the species level (SWD_{SMP} ; Eq. 1). Rather, for species surveyed several times, we selected the highest calculated SWD_{SMP} . SWD_{SMP} values were log-transformed prior to analyses to reach normality.

2.5 Phylogeny

A phylogenetic tree for the 117 species was extracted from the mega-phylogeny revised by Qian and Jin (2016). All the studied genus were available in the phylogeny and 21 missing species were branched in polytomy to the youngest common ancestor of the corresponding genera.

2.6 Statistical analyses

The trait distributions were represented by violin plots computed with kernel density smoothing functions. The trait distributions found in our dataset were compared to large datasets representing the worldwide trait distribution. We used trait data from Díaz *et al.* (2016) for HRep, LA, SM, LMA and N_{mass} ; Flores *et al.* (2014) for LDMC, and Cornwell *et al.* (2017) for $\delta^{13}C$. Differences in trait values between growth forms were tested using ANOVAs and post-hoc Tukey's tests (R package "multcomp" – Hothorn, Bretz & Westfall 2008).

We performed a principal component analysis on the 11 traits (Table 3) which were previously centered and scaled. The species loadings in the three first principal components were extracted and differences in their values between growth forms were tested using ANOVAs and post-hoc Tukey's tests (R package "multcomp" – Hothorn, Bretz & Westfall 2008). A phylogenetic principal component analysis (PHYPCA) were also computed on the same dataset using the 'phytools' R package (Revell 2012).

The correlations between traits were estimated using Pearson correlation coefficient (r) for all species and for each group of species independently. The P value of the correlation were computed using the typical t statistic from the Pearson correlation coefficient ($t = r \sqrt{\frac{n-2}{1-r^2}}$) and a Student's t-distribution with degrees of freedom $n - 2$; where n is the number of species. When the P value was lower than 0.05, we computed estimators of the slope and the intercept of the relationship using a standardized major axis method (SMA) with the R package "smatr" (Warton *et al.* 2012). As all relationship were tested on a similar number of species, a critical r value (above which the correlation is significant) can be computed as $r_{critical} = \frac{t}{\sqrt{n-2+t^2}}$ where t is the critical t value in a Student's t-distribution with degrees of freedom $n - 2$ and the P value = 0.05.

In addition, we accounted for a potential bias in the r estimation due to the phylogenetic correlation structure between species. We computed a phylogenetic trait variance-covariance matrix between the two traits, assuming a Brownian evolution of traits, using the *phyl.vcv* function in the 'phytools' R package (Revell 2012). These phylogenetic values were used to compute a phylogenetic Pearson correlation coefficient (r_p) between trait x and trait y as:

$$r_p(x, y) = \frac{cov_p(x, y)}{\sqrt{var_p(x) * var_p(y)}} \quad (2)$$

where $cov_p(x, y)$ is the phylogenetic covariance between x and y , $var_p(x)$, respectively $var_p(y)$, the phylogenetic variance of x , y .

3 RESULTS

3.1 Estimated trait means

The random factors included in the computation of the estimated means per species depended on the trait considered (Table 4). Mean values of onset of flowering (OF) and reproductive plant height (Hrep) were estimated by mixed models including both a year and a site factors while the models estimating the means of onset of dispersal (OD) and seed maturation period (SMP) values included only a year random factor. Species mean values of leaf area (LA), leaf dry matter content (LDMC) and leaf nitrogen concentration (Nmass) were estimated by mixed models including both a year and a fertilization treatment factors. Finally, no random factor was selected for the computation of seed mass (SM), leaf mass per area (LMA) and leaf carbon isotope ratio ($\delta^{13}C$) mean values. All models showed a highly significant species identity effect and their R^2 ranged from 0.65 (SMP) to 0.95 (SM). Random factors accounted for a small proportion of the total variance explained by the models for OF, OD, SMP, LA and LDMC estimations (conditional R^2 – marginal $R^2 < 20\%$) while they had larger effect in the models used for Hrep and Nmass (conditional R^2 – marginal $R^2 \geq 40\%$) (Table 3).

TABLE 4 | Selected models for the computation of the best estimated means (see Material and Methods section). The selected model can include a fertilization (F), year (Y) and/or a site (S) random effects. When at least one random effect was selected, the Chi square (χ^2), number of degree of freedom (df) and the P value (P) of a type II ANOVAs estimating the effect of species identity are given as well as the marginal and conditional R^2 of the model. When no random effect was selected, F, df and P are the F statistic, number of degree of freedom and P values of type I ANOVA estimating the effect of species identity and R^2 is the coefficient of determination of the model.

	Selected random effects	χ^2 or F value	df	P	Marginal R^2	Conditional R^2 or R^2
Onset of flowering (°C days)	Y, S	$\chi^2 = 5234.6$	140	$<< 0.001^{***}$	0.79	0.90
Onset of dispersal (°C days)	Y	$\chi^2 = 2532.7$	133	$<< 0.001^{***}$	0.71	0.87
Seed maturation period (°C days)	Y	$\chi^2 = 798.6$	133	$<< 0.001^{***}$	0.56	0.65
Reproductive height (cm)	Y, S	$\chi^2 = 23614.6$	115	$<< 0.001^{***}$	0.48	0.88
Leaf area (mm ²)	F, Y	$\chi^2 = 32192.3$	116	$<< 0.001^{***}$	0.82	0.92
Seed mass (mg)	-	F = 1057.845	113	$<< 0.001^{***}$	-	0.95
Leaf mass per area (g.m ⁻²)	-	F = 93.7	116	$<< 0.001^{***}$	-	0.75
Leaf dry matter content (mg.g ⁻¹)	F, Y	$\chi^2 = 12794.1$	116	$<< 0.001^{***}$	0.71	0.82
Leaf nitrogen concentration (mg.g ⁻¹)	F, Y	$\chi^2 = 2002.2$	116	$<< 0.001^{***}$	0.37	0.78
Leaf carbon isotope ratio	-	F = 18.8	113	$<< 0.001^{***}$	-	0.68

3.2 Distribution of trait values

At the species level, OF ranged from 57 °C days (*Viola alba*) to 1976 °C days (*Ruscus aculeatus*), OD ranged from 450 °C days (*Carex humilis*) to 2496 °C days (*Ruscus aculeatus*), SMP ranged from 147 °C days (*Erigeron sumatrensis*) to 1443 °C days (*Centaurea aspera*) and SWD_{SMP} ranged from 0 mm/mm days (*Anisantha diandra*, *Avena barbata*, *Briza media*, *Filago pyramidata*, *Genista sagittalis*, *Hordeum murinum* and *Lolium multiflorum*) to 30.9 mm/mm days (*Eryngium campestre*) (Fig. 1). No difference was observed between growth forms in their flowering date but annuals showed shorter seed maturation period than herbaceous and woody perennials, resulting in earlier dispersal dates and lower water deficit experienced during the seed maturation for this group of species (Fig. 1).

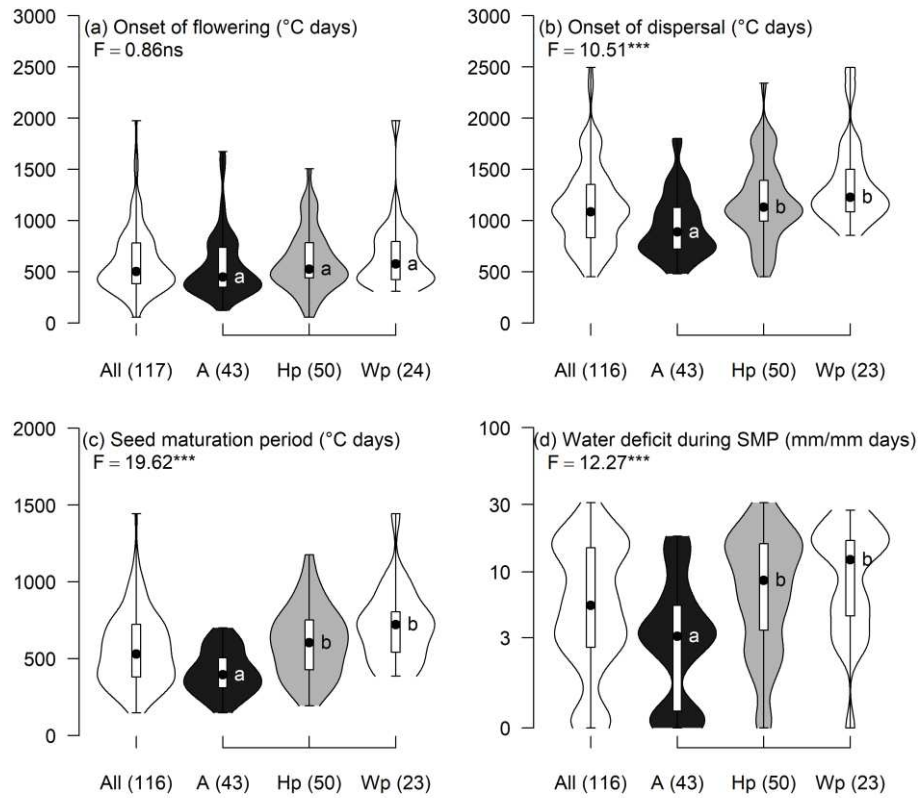


FIGURE 1 | Violin plots showing the distribution of phenological trait values for all species (All, white violins on the left of each panel), annuals (A, black violins), herbaceous perennials (Hp, grey violins) and woody perennials (Wp, white violins on the right of each panel). The number of species in each case is specified in brackets. Boxplots, representing the quantiles of the distributions (0%, 25%, 50%, 75% and 100%) are added to each violin. Post-hoc Tukey's tests were performed between growth forms (F value and significance are reported in each panel) and violins that share the same letter are not significantly different.

Hrep ranged from 3.5 cm (*Teucrium montanum*) to 88 cm (*Dipsacus fullonum*) and LA ranged from 4.1 mm² (*Arenaria aggregata*) to 110.1 cm² (*Dipsacus fullonum*). Woody species appeared to be slightly shorter at reproduction and to have smaller leaves than herbaceous species. Herbaceous perennials had the largest leaves while annuals had intermediate leaf size. When comparing to global databases, the range of values of size-related traits in our dataset covers a large proportion of that displayed by small stature plants (Fig 2). SM ranged from 0.02 mg (*Draba verna*) to 208.3 mg (*Ruscus aculeatus*). No difference in seed mass was detected between growth forms (Fig. 2). SM values in our dataset covered a large range of the values found in global databases but their median was slightly below the latter's.

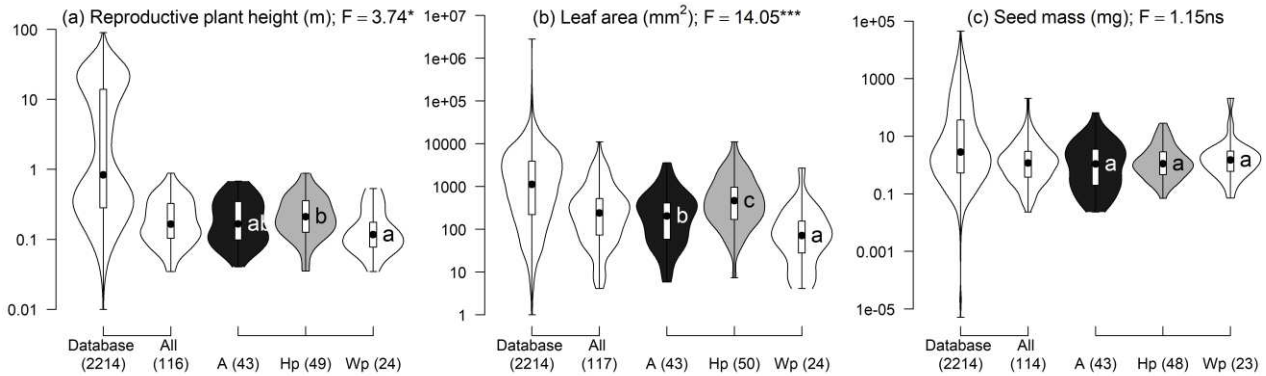


FIGURE 2a | Violin plots representing the distribution of (a) size trait and seed mass values and (b) leaf trait values. Each panel is divided in two parts. The left part represents a comparison between the trait distribution for all species (All) and for worldwide databases (Database, from Díaz *et al.* 2016). The right part represents the trait distribution for annuals (A, black violins), herbaceous perennials (Hp, grey violins) and woody perennials (Wp, white violons) in the present dataset. The number of species in each case is specified in brackets. Boxplots, representing the quantiles of the distributions (0%, 25%, 50%, 75% and 100%) are added to each violin. Post-hoc Tukey's tests were performed between growth forms (F value and significance are reported in each panel) and violins that share the same letter are not significantly different.

LMA ranged from 27.3 g.m⁻² (*Filago pyramidata*) to 180.1 g.m⁻² (*Aphyllanthes monspeliensis*) and LDMC from 118.3 mg.g⁻¹ (*Urospermum dalechampii*) to 528.1 mg.g⁻¹ (*Stipa pennata*). N_{mass} values were relatively high and ranged from 12.7 mg.g⁻¹ (*Orlaya grandiflora*) to 74 mg.g⁻¹ (*Vicia hybrida*). Finally, the $\delta^{13}\text{C}$ values in our dataset covered a smaller proportion of the variation found in global databases and ranged from -31.1 (*Bellis perennis*) to -25.8 (*Cerastium glomeratum*) which are typical values for C₃ species. We found significant differences between growth forms in their LMA and LDMC with annual species having the lower LMA and LDMC values (Fig. 2) than perennials. Leaf trait values cover a large range of values compared to those compiled in global databases (Fig. 2).

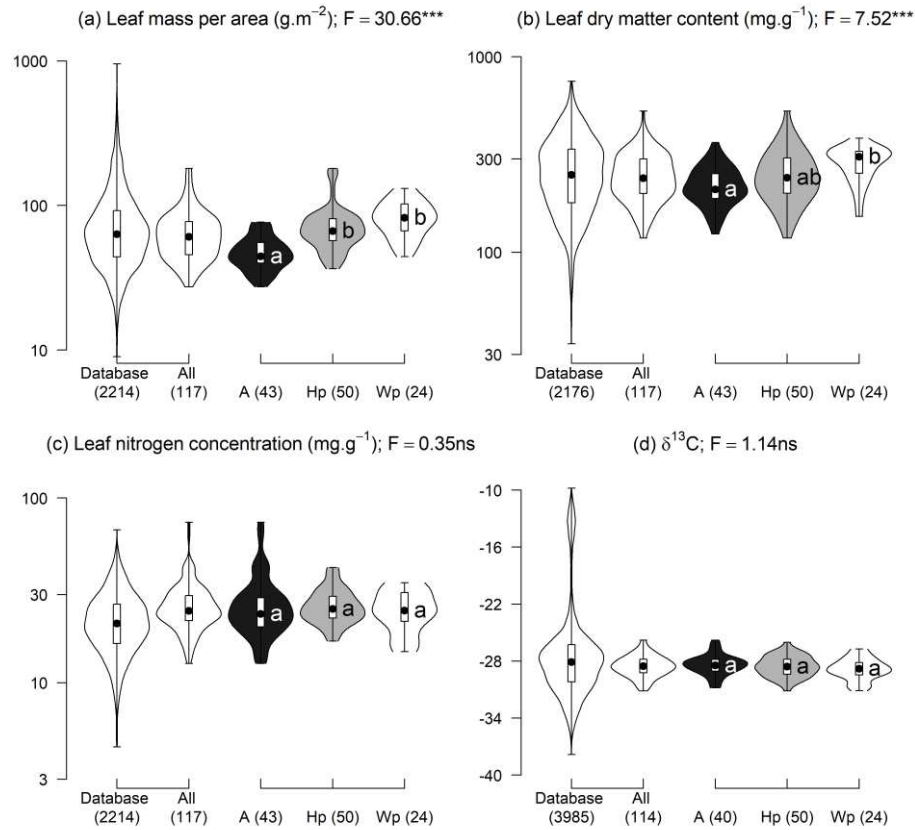


FIGURE 2b | continued. Database from Díaz *et al.* (2016) for (panel a) the leaf mass per area and (panel b) leaf nitrogen concentration values, Flores *et al.* (2014) for (panel c) the leaf dry matter content values and Cornwell *et al.* (2017) for (panel d) $\delta^{13}\text{C}$ values.

3.3 Patterns of trait co-variations

A principal component analysis was performed on the 11 traits for 109 species (Fig. 3). The three first principal components (PC1, PC2 and PC3) accounted respectively for 27.7%, 19.9% and 12.9% of the total variability. Phenological traits (particularly OD but also OF and SMP) strongly contributed to the first principal component in association with size traits (LA, Hrep and SM) (Fig. 3a), which thus described an axis of variation from small-sized species with early flowering and fast seed maturation (negative values in the axis), to large-sized species with late flowering and longer seed maturation (positive values in the axis). Growth forms were discriminated along this axis with annual species showing significantly lower values than herbaceous and woody perennial species (tukey test, $F = 17.88$, $df = 2$ and 106 , P value $\ll 0.001$). SWD_{SMP} was positively correlated to the second principal component in association with LMA and LDMC, while N_{mass} was negatively correlated to this axis (Fig. 3). This axis thus describes the leaf economic spectrum (Wright *et al.* 2004): conservative species had positive values in this axis (high LMA and LDMC) while species with a more acquisitive

strategy had negative values (high Nmass). Growth forms were also discriminated along this axis and the three groups were significantly different from each other (tukey test, $F = 12.73$, $df = 2$ and 106 , P value < 0.001): annuals had the lowest values, herbaceous perennials had intermediates values and woody perennials had the highest values. Phenological traits contributed little to the third principal component, which could not be clearly associated to any plant functioning dimension (Fig. 3b). PCAs computed for each growth form separately yielded comparable results (see Fig. S1. Supplementary material).

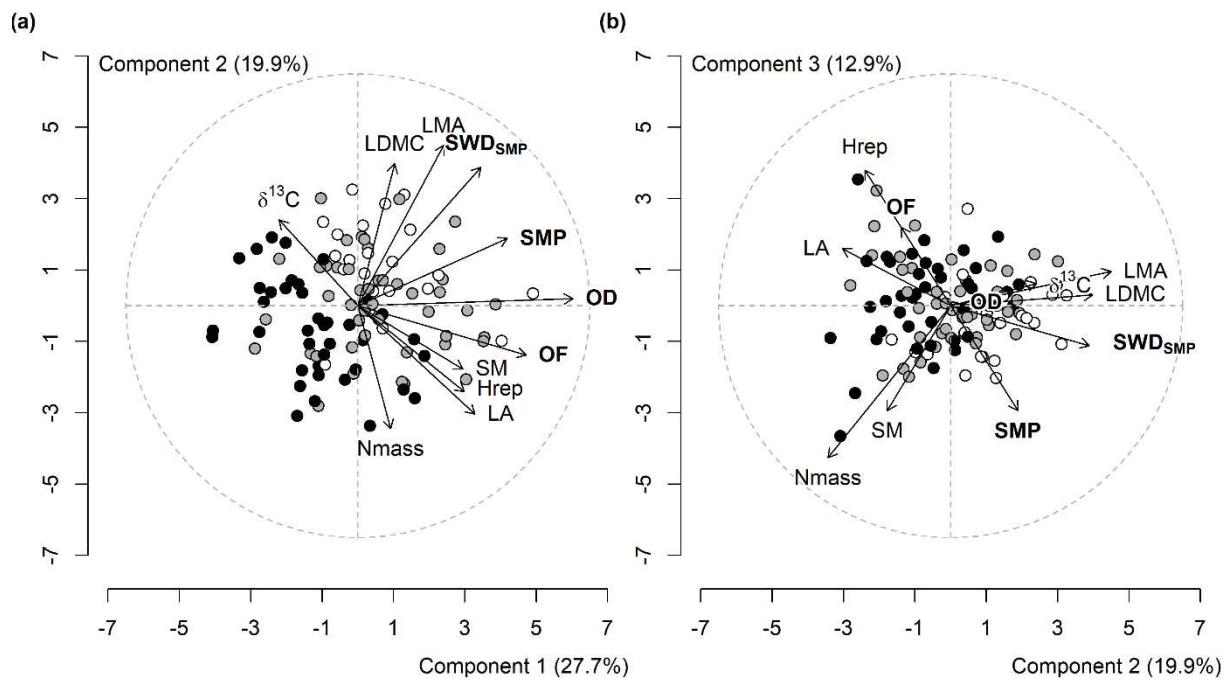


FIGURE 3 | Principal component analysis (PCA) computed for 40 annual species (black points), 47 herbaceous perennials (grey points) and 22 woody perennials (white points) projected in the plan of components 1 and 2 (panel a) and the plan of components 2 and 3 (panel b). This PCA includes (i) four phenological traits: onset of flowering (OF), onset of dispersal (OD), seed maturation period (SMP) and water deficit during seed maturation period (SWD_{SMP}); (ii) three size traits: plant reproductive height (Hrep), leaf area (LA) and seed mass (SM) and (iii) three ‘leaf economic’ traits: leaf mass per area (LMA), leaf dry matter content (LDMC), leaf nitrogen concentration (Nmass) and (iv) leaf carbon isotopic ratio ($\delta^{13}C$).

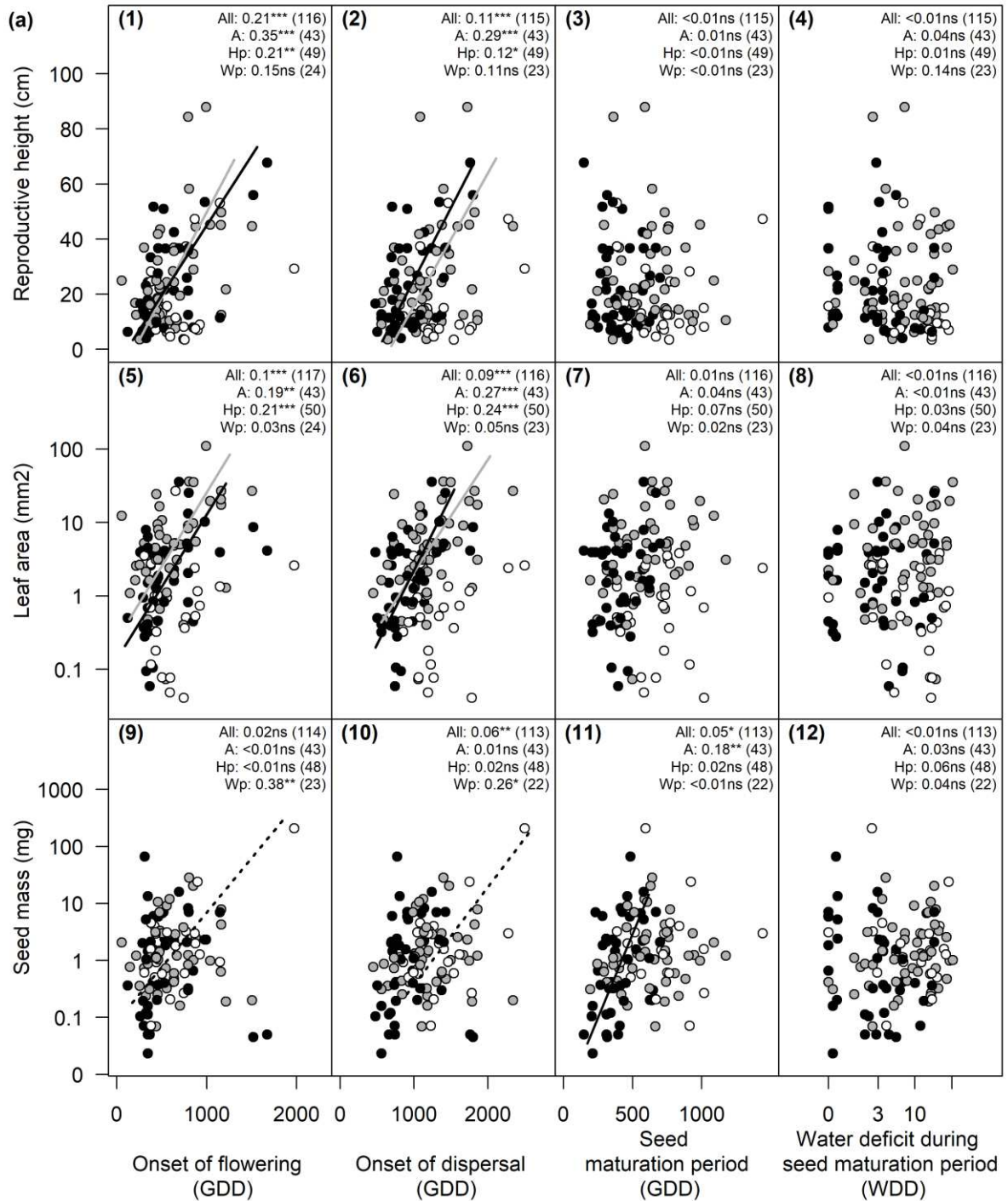


FIGURE 4a | Relationships between reproductive phenology traits and (a) size traits or (b) leaf economic traits for all species (All), annual species (A, black points), herbaceous perennials (Hp, grey points) and woody perennials (Wp, open points). Correlation tests were performed for all species (All) and for each group of species independently (A, Hp and Wp). The r^2 , significance (ns: $p > 0.05$; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$) and number of species (in brackets) for each test are reported in each panel. When significant, the correlation line is represented (black for annuals, grey for herbaceous perennials and dashed for woody perennials).

All bivariate relationships involving a phenological trait were tested (Fig. 4a and b). OF and OD were positively correlated to Hrep and LA, when considering all species together, but also when testing for annuals and herbaceous perennials separately (Fig. 4a panels 1, 2, 5 and 6). We found weak relationships between OF, respectively OD, and SM for woody perennials (Fig. 4a panels 9 and 10). For the latter, species that flowered and dispersed late had larger seeds than the early ones. However, these relationships were not significant when *Ruscus aculeatus*, which had the latest reproductive phenology and the largest seed mass value, was removed from the analysis. Neither OF nor OD were correlated to leaf traits in our dataset, except a weak positive correlation between OD and LMA (Fig. 4b panel 14) and negative relationships between OF, respectively OD, and $\delta^{13}\text{C}$ (Fig. 4b panels 25 and 26) for all species.

SMP was positively correlated to SM only for annuals (Fig. 4a panel 11): the correlation found for these species appeared as the upper limit of a triangle shaped relationship between the two traits for all species. Indeed, no species with short SMP had large seeds while species with long seed maturation period had either small or large seeds (Fig. 4a panel 11). Finally, annuals had the largest seeds at a given SMP, which means that they had a higher rate of the seed filling than perennial species. We found a weak positive relationship between SMP and LMA for all species; by contrast, this relationship was negative for woody perennials (Fig. 4b panel 15). SMP was negatively correlated to LDMC for woody perennials (Fig. 4b panel 19) and to $\delta^{13}\text{C}$ for all species (Fig 4b panel 27).

SWD_{SMP} was not correlated to any trait related to size or seed (Fig. 4a panels 4, 8 and 12) while it was positively correlated to LMA and LDMC for all species (Fig. 4b panels 16 and 20). The correlation with LMA was still significant within annuals and herbaceous perennials and the correlation with LDMC remained significant for herbaceous perennials only. However, SWD_{SMP} was neither correlated to Nmass nor to $\delta^{13}\text{C}$ (Fig. 4b panels 24 and 28).

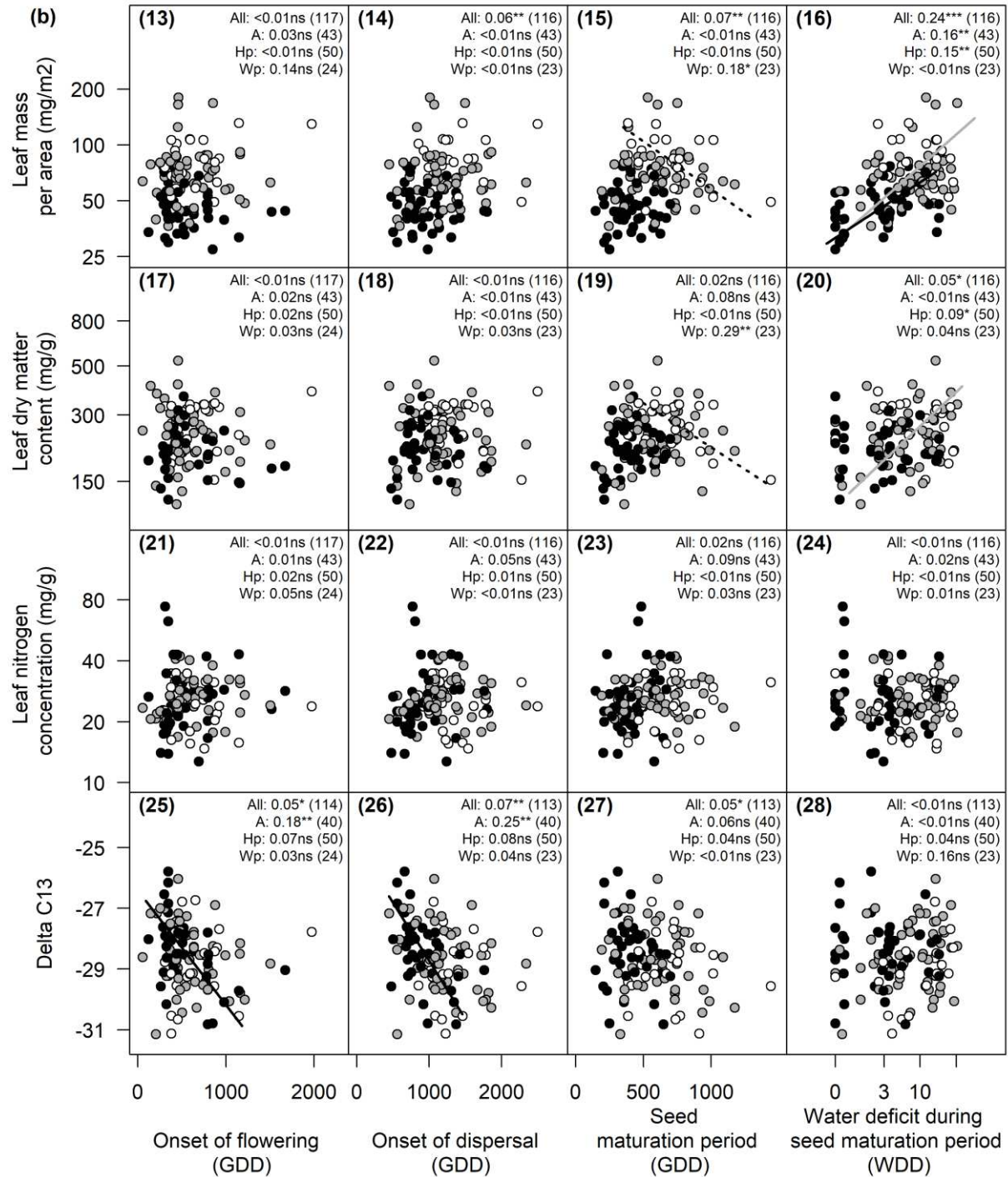


FIGURE 4b | Continued.

3.4 Effects of phylogeny

The phylogenetic principal component analysis (PHYPCA) showed few qualitative differences in comparison to the PCA (see Fig. S2). This analysis strengthened the individualization of two independent axes: a size axis, correlated to OF, OD and SMP and a 'leaf economic' axis, correlated to SWD_{SMP}. The main differences with the PCA concerned

LA and SM, which were weakly correlated to the two first phylogenetic principal components of the PPCA (see S1. Supplementary material).

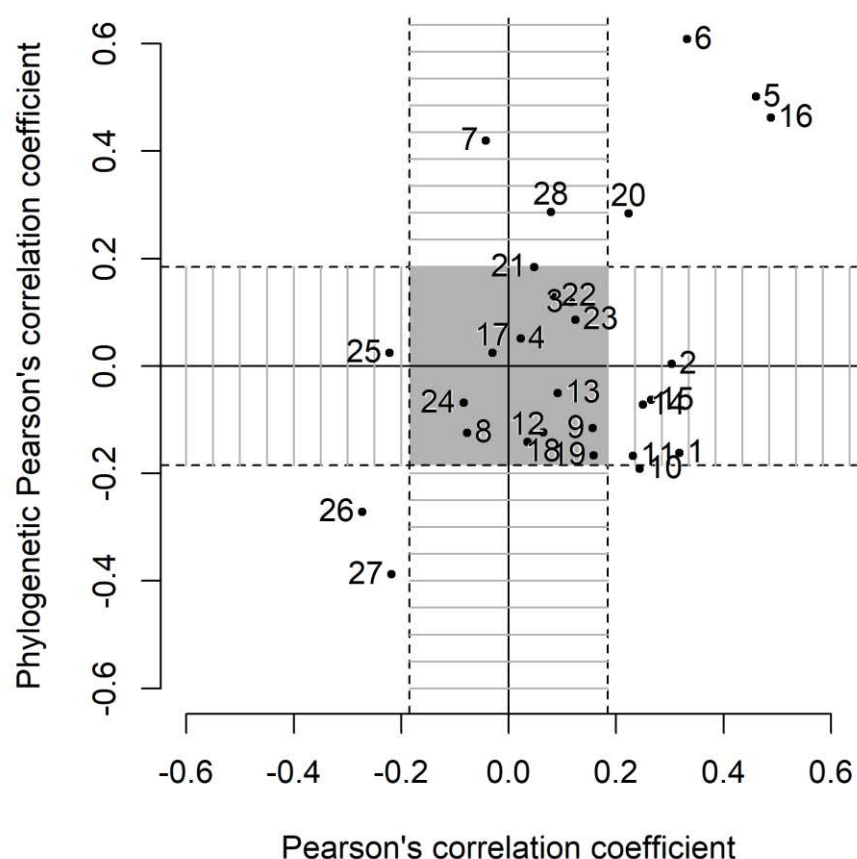


FIGURE 5 | Pearson's correlation coefficients for the 28 relationships tested in Fig. 4 against phylogenetic Pearson's correlation coefficients for the same relationships. Refer to panel number in Fig. 4 to identify the corresponding relationships. The dashed lines represent the critical r value for 113 species with an alpha of 0.05. Points located in the grey square represent relationships that were not significant in both cases. Points in vertically hatched areas represent relationships that lose significance when accounting for phylogenetic correlation structure and points in horizontally hatched areas represent relationships that become significant when accounting for phylogeny.

Similarly, the results on the bivariate analyses remained qualitatively unchanged for 19 relationships of the 28 tested, when accounting for phylogeny (Fig. 5). Among them, six correlations were significant and illustrated the robust relationships between OF, OD and HRep (Fig.4a panels 5 and 6), but also, OD, SMP and $\delta^{13}\text{C}$ (Fig.4b panels 26 and 27), and SWD_{SMP} , LMA and LDMC (Fig.4b panels 16 and 20). Consistently with the observations on the PPCA, the relationships involving LA and SM (Fig.4a panels 1, 2, 10 and 11) lose their significance when accounting for the phylogeny, as well as the relationships between OD, SMP, and LMA (Fig.4b panels 14 and 15). Two positive relationships became highly

significant when accounting for phylogeny only: SMP and HRep (Fig.4a panel 7) and SWD_{SMP} and $\delta^{13}\text{C}$ (Fig.4b panel 28).

4 DISCUSSION

4.1 Reproductive phenology is a major axis of phenotypic variation in Mediterranean plant

The Mediterranean climate is characterized by a strong seasonality in temperature and water availability (Daget 1977a), making of phenology a critical component of plant adequation to the environment. The species developmental cycles must be synchronized with favorable periods for plant growth to ensure survival and reproduction. Although one can consider these conditions as strong constraints on plant phenotype, the reproductive phenology appeared as one of the major axes of variation between species. Indeed, the temporality of flowering, dispersal and the seed maturation period contributed highly to the first principal component of the dataset. The three traits spanned a wide range of values and defined a unique phenological axis. In our case, the onset of dispersal appeared as a better functional markers of the reproductive phenology than the onset of flowering. This trait allowed a better discrimination between groups of species and captured variation in both onset of flowering and seed maturation period between species. We think further studies involving these traits are required to assess whether the use of the onset of dispersal as a functional marker of reproductive phenology can be generalized in other climatic contexts.

The seven other plant traits used in this study described two plant functioning dimensions: a plant size dimension and a 'leaf economy' dimension. These two axes were shown independent in a recent study based on more than 2,200 species distributed worldwide (Díaz *et al.* 2016). In this study, the authors argued that the phenotypic space occupied by plant species and based on six plant traits can be described by a unique plan formed by these two axes. The first plan of the PCA in our study was similarly structured and the traits of reproductive phenology were clearly integrated to this plan. The reproductive phenology dimension was indeed connected to the plant size dimension and did not add an independent axis to the description of the phenotypic space occupied by Mediterranean species. A more detailed description of the relationships between the reproductive phenology and the other traits are given in the following parts.

4.2 Onset of the reproduction and reproductive plant height for herbaceous species

Consistently with several studies (see Table 1), the most robust relationships found in this study were those involving the temporality of reproductive events (flowering and dispersal) and the reproductive plant height. In climates with strong seasonality, most of the vegetative biomass of herbaceous species (even all in the case of annuals) disappears during the unfavorable period. By contrast with woody species, the plant size at reproduction for these species is therefore the result of the vegetative growth between the onset of the growing season and the onset of the reproduction (Jia *et al.* 2011). A longer period of maternal growth resulted in taller plants at reproduction for herbaceous species, while these traits were found to be uncoupled in woody species. Although herbaceous species with early reproduction cannot have a tall stature due to physiological constraints on plant growth rate, late species can either be small or tall due to differences in their onset of vegetative growth or in their growth rate. However, very few small stature species performed late reproduction. This can be explained by evolutionary constraints, as stronger competition for light or accessibility to pollen (through the wind or pollinators) is expected in late season, due to the increasing height of the plant community (Bazzaz, Ackerly & Reekie 2000).

The positive relationships found between the onset of flowering and the reproductive plant height for annuals and herbaceous perennials shared similar slope and intercepts. Although annual species are expected to show higher vegetative growth rate than herbaceous perennials (e.g. Pitelka 1977; Garnier 1992), these species did not reach higher reproductive height for a given period of maternal growth than herbaceous perennials. This can be explained by the facts that: (1) the growth rate of reproductive parts is not necessarily related to the growth rate of the vegetative structure due to differences in resources allocation; (2) perennial species were probably several years old and had enough resources in their belowground structures to onset their reproductive growth earlier in comparison to annuals which lack reserves and must establish vegetative structures.

Finally, we found positive relationships between the phenological traits and the area of a leaf in herbaceous species. These relationships might result from an indirect effect of plant stature on both phenology and leaf area. Consistent with other studies (Díaz *et al.* 2016), the area of a leaf was found to be positively correlated with plant height, which is generally interpreted as the fact that large species tend to have large organs (leaf, seeds...).

4.3 Seed mass at maturity and seed phenology

The seed mass at maturity, which varies by several orders of magnitude among species, is a critical component of plant performance. It is known to play a key role in plant establishment, with large-seeded species having higher survivorship during the seedling stage than small-seeded species (Moles & Westoby 2004). Moreover, the trade-off between the seed mass and the number of seeds produced each year (Moles & Leishman 2008) describes a continuum of regeneration strategies from species with high colonization capacities (maximizing establishment with large seeds) to species with high dispersal capacities (maximizing space occupancy with small seeds). Surprisingly, only few studies have tested the relationship between the position of species in this continuum and the temporality of their reproductive events.

In seasonal climates, late reproduction implies a potentially long maternal growth but a short period of time before the onset of the unfavorable period. The time-size tradeoff (Bolmgren & Cowan 2008) predicts that species with late reproduction should produce smaller seeds to avoid exposure to stressful conditions during the seed maturation period (Mazer 1989). There is a lack of congruence between studies testing this hypothesis (see Table 1) and the sign of the relationships between the onset of the reproduction and the seed mass often depends on the group of species considered. Our results do not support the idea that species with late reproduction are time-limited for the production of large seeds. Indeed, the flowering time had no influence on the seed mass, and some species with late reproduction produced large seeds by tolerating a water deficit period during the seed maturation.

It is also assumed that the seed mass at maturity depends on the time of seed development (Moles & Westoby 2003; Heydel & Tackenberg 2017). This does not account for differences in the rate of seed development between species however, which might be due to differences in the chemical composition of seeds and/or the production of particular appendages or surrounding structures (e.g. fruit flesh, pappus or other loose parts). We can therefore expect some variability between species in their seed mass for a given seed maturation period. The triangular shaped relationship found in this study between seed mass and seed maturation period is consistent with this idea. The upper limit of the triangle can be interpreted as a physiological limit of the seed-filling rate that only few species achieve, probably by producing very simple seeds.

We found that annual species had the highest rate of seed filling as compared to herbaceous and woody perennials. Furthermore, their seed mass, expressed on a \log_{10} scale, was found to be linearly related with seed maturation period, which can be written as:

$$SM = m_0 * 10^{RRSD * SMP} \quad (3)$$

where SM is the seed mass at maturity, m_0 is the initial mass of seed primordium, RRSD the relative rate of seed filling and SMP the seed maturation period. Assuming that all annual species performed similar RRSD (close to the physiological limit) and the validity of equation 3, the relative rate of the seed development for these species was estimated to $5.88 \mu\text{g.g}^{-1} \cdot ^\circ\text{C.days}^{-1}$ (slope value of a standardized major axis regression between the \log_{10} of seed mass and the seed maturation period for annual species). Plant life-history characteristics, which lead to differential priorities in the vegetative or in the reproductive structure investment, must be considered to explain these phenological patterns (Jackson & Bliss 1984; Forrest & Miller-Rushing 2010; Ehrlén 2015). Indeed, a critical aspect is that annuals must guarantee a substantial seed production every year, while reproduction by seeds is less critical for perennials. Therefore, annuals might have evolved towards fast and short seed maturation periods in order to maximize the seed mass while limiting exposure to hazards or damaging conditions. Perennials, by contrast, can afford to have a slower filling rate, and produce seeds with more complex chemical compounds.

4.4 Leaf economics and water deficit during seed maturation

In line with results from the literature (Table 1), we found very few correlations between traits related to the leaf economics and the reproductive phenology. Onset of dispersal and seed maturation period were weakly correlated with LMA suggesting that late species are associated with conservative leaf traits. Craine *et al.* (2012) found a positive relationship between the date of flowering and the leaf density suggesting similar results. These are generally interpreted by the effect of leaf economics traits on plant growth, which in turn impacts phenology. However, many other factors as allocation processes or alternative developmental programs can weaken these relationships.

Mediterranean climate, characterized by a high seasonality in temperature and water availability, with a marked summer drought (Daget 1977b), places strong constraints on plant phenology. It provides only two favorable windows for plant development: (1) late winter and spring, after the late frosts and before the summer drought, and (2) autumn, after the first

rainfalls and before early winter frosts (Kummerow 1983). Accordingly, flowering phenology in these Mediterranean plant communities is bimodal (Thompson 2005). However, this bimodality is strongly asymmetric with a majority of species reproducing in spring (cf. Thompson 2005 and references therein). The reproductive phenology is therefore mostly constrained by water availability and adaptations to water stress conditions might be advantageous to perform longer reproductive periods.

The soil water deficit during seed maturation (SWD_{SMP}), based on the accumulation of soil water deficit during the seed maturation, is used as a proxy of the species tolerance to water stress conditions (Segrestin *et al.* in press). SWD_{SMP} was found variable between species and some of them matured their seeds during periods of long and intense water deficit. Grain development appears limited mostly by the plant capacity to supply assimilates (Rahman & Yoshida 1985) and seed maturation can thus occur during periods of water deficit, as long as the plant can tolerate drought periods and maintain photosynthetic activity or reallocate resources to seed filling. The index correlated positively with $\delta^{13}\text{C}$ (when accounting for phylogeny), leaf mass per area and leaf dry matter content. As $\delta^{13}\text{C}$ describes the water use efficiency of the leaf (amount of water transpired per unit of carbon fixed), species with higher water use efficiency seems to better tolerate water deficit periods during their seed. This result suggests a coordination of the water management between vegetative and reproductive parts revealing promising perspectives for the understanding of drought tolerance strategies in the Mediterranean and their impact of plant phenology. SWD_{SMP} is however an indirect index and a proper measurement of these plant capacities would require growth chamber experiments in order to produce response curves of seed production to different water stress conditions.

5 CONCLUSIONS

Our study is among the first to analyse the coordination between traits of the reproductive phenology and other dimensions of plant functioning in a large number of species. Phenological traits relate both to the plant size and seed dimensions in annuals, while they relate only to plant size in herbaceous perennials. No correlations were found regarding to woody species. Whether reproductive phenology can be considered as an independent axis of functional variation in plants therefore seems to depend on the species group concerned. Further understanding of the relationships between phenology and other plant traits would

require including traits related to plant growth and biomass allocation to different organs in order to obtain a more integrated view of the plant phenotype.

6 REFERENCES

- Ansquer, P., Al Haj Khaled, R., Cruz, P., Theau, J.-P., Therond, O. & Duru, M. (2009) Characterizing and predicting plant phenology in species-rich grasslands. *Grass and Forage Science*, **64**, 57-70.
- Aronson, J., Le Floch, E., David, J.-F., Dhillon, S., Abrams, M., Guillerm, J.-L. & Grossmann, A. (1998) Restoration ecology studies at Cazarils (southern France): biodiversity and ecosystem trajectories in a mediterranean landscape. *Landscape and Urban Planning*, **41**, 273-283.
- Bartoń, K. (2013) MuMIn: multi-model inference. *R package version*, **1**.
- Bazzaz, F.A., Ackerly, D.D. & Reekie, E.G. (2000) Reproductive allocation in plants. *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities* (ed. M. Fenner), pp. 1-29. CAB International, Wallingford, UK.
- Bolmgren, K. & Cowan, P.D. (2008) Time – size tradeoffs: a phylogenetic comparative study of flowering time, plant height and seed mass in a north-temperate flora. *Oikos*, **117**, 424-429.
- Bonhomme, R. (2000) Bases and limits to using ‘degree. day’ units. *European journal of agronomy*, **13**, 1-10.
- Catorci, A., Cesaretti, S., Gatti, R. & Tardella, F. (2012) Trait-related flowering patterns in submediterranean mountain meadows. *Plant Ecology*, **213**, 1315-1328.
- Chiariello, N. (1989) Phenology of California grasslands. *Grassland structure and function* (eds L.F. Huenneke & H.A. Mooney), pp. 47-58. Springer, Netherlands, Dordrecht.
- Cohen, D. (1976) The optimal timing of reproduction. *The American Naturalist*, **110**, 801-807.
- Cornwell, W., Wright, I., Turner, J., Maire, V., Barbour, M., Cernusak, L., Dawson, T., Ellsworth, D., Farquhar, G., Griffiths, H., Keitel, C., Knohl, A., Reich, P., Williams, D., Bhaskar, R., Cornelissen, J., Richards, A., Schmidt, S., Valladares, F., Körner, C., Schulze, E., Buchmann, N. & Santiago, L. (2017) Data from: A global dataset of leaf $\Delta^{13}C$ values. .
- Craine, J.M., Wolkovich, E.M., Gene Towne, E. & Kembel, S.W. (2012) Flowering phenology as a functional trait in a tallgrass prairie. *New Phytologist*, **193**, 673-682.
- Daget, P. (1977a) Le bioclimat méditerranéen: analyse des formes climatiques par le système d'Emberger. *Vegetatio*, **34**, 87-103.
- Daget, P. (1977b) Le bioclimat méditerranéen: caractères généraux, modes de caractérisation. *Vegetatio*, **34**, 1-20.
- Díaz, S., Kattge, J., Cornelissen, J.H.C., Wright, I.J., Lavorel, S., Dray, S., Reu, B., Kleyer, M., Wirth, C., Colin Prentice, I., Garnier, E., Bönsch, G., Westoby, M., Poorter, H., Reich, P.B., Moles, A.T., Dickie, J., Gillison, A.N., Zanne, A.E., Chave, J., Joseph Wright, S., Sheremet'ev, S.N., Jactel, H., Baraloto, C., Cerabolini, B., Pierce, S., Shipley, B., Kirkup, D., Casanoves, F., Joswig, J.S., Günther, A., Falczuk, V., Rüger, N., Mahecha, M.D. & Gorné, L.D. (2016) The global spectrum of plant form and function. *Nature*, **529**, 167-171.
- Diekmann, M. (1996) Relationship between flowering phenology of perennial herbs and meteorological data in deciduous forests of Sweden. *Canadian Journal of Botany*, **74**, 528-537.
- Du, G. & Qi, W. (2010) Trade-offs between flowering time, plant height, and seed size within and across 11 communities of a Qinghai-Tibetan flora. *Plant Ecology*, **209**, 321-333.
- Duru, M., Khaled, R.A.H., Ducourtieux, C., Theau, J.P., de Quadros, F.L. & Cruz, P. (2009) Do plant functional types based on leaf dry matter content allow characterizing native grass species and grasslands for herbage growth pattern? *Plant Ecology*, **201**, 421.
- Ehrlén, J. (2015) Selection on flowering time in a life-cycle context. *Oikos*, **124**, 92-101.
- Eriksson, O. & Ehrlén, J. (1991) Phenological variation in fruit characteristics in vertebrate-dispersed plants. *Oecologia*, **86**, 463-470.
- Felsenstein, J. (1985) Phylogenies and the comparative method. *The American Naturalist*, **125**, 1-15.

- Flores, O., Garnier, E., Wright, I.J., Reich, P.B., Pierce, S., Diaz, S., Pakeman, R.J., Rusch, G.M., Bernard-Verdier, M. & Testi, B. (2014) An evolutionary perspective on leaf economics: phylogenetics of leaf mass per area in vascular plants. *Ecology and Evolution*, **4**, 2799-2811.
- Forrest, J. & Miller-Rushing, A.J. (2010) Toward a synthetic understanding of the role of phenology in ecology and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **365**, 3101-3112.
- Fox, J. & Weisberg, S. (2011) Car: companion to applied regression
- Garnier, E. (1992) Growth analysis of congeneric annual and perennial grass species. *Journal of Ecology*, **80**, 665-675.
- Garnier, E., Cortez, J., Billès, G., Navas, M.-L., Roumet, C., Debussche, M., Laurent, G., Blanchard, A., Aubry, D. & Bellmann, A. (2004) Plant functional markers capture ecosystem properties during secondary succession. *Ecology*, **85**, 2630-2637.
- Grime, J. (1977) Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *American naturalist*, 1169-1194.
- Henderson, C.R. (1975) Best linear unbiased estimation and prediction under a selection model. *Biometrics*, 423-447.
- Heydel, F. & Tackenberg, O. (2017) How are the phenologies of ripening and seed release affected by species' ecology and evolution? *Oikos*, **126**, 738-747.
- Hothorn, T., Bretz, F. & Westfall, P. (2008) Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical journal*, **50**, 346-363.
- Jackson, L.E. & Bliss, L. (1984) Phenology and water relations of three plant life forms in a dry tree-line meadow. *Ecology*, **65**, 1302-1314.
- Jia, P., Bayaerta, T., Li, X. & Du, G. (2011) Relationships between flowering phenology and functional traits in eastern Tibet alpine meadow. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, **43**, 585-592.
- Kazakou, E., Garnier, E., Navas, M.-L., Roumet, C., Collin, C. & Laurent, G. (2007) Components of nutrient residence time and the leaf economics spectrum in species from Mediterranean old-fields differing in successional status. *Functional Ecology*, **21**, 235-245.
- Kummerow, J. (1983) Comparative phenology of Mediterranean-type plant communities. *Mediterranean-type ecosystems. The Role of Nutrients* (eds F.J. Kruger, D.T. Mitchell & J.U.M. Jarvis), pp. 300-317. Springer-Verlag, Berlin.
- Laughlin, D.C. (2014) The intrinsic dimensionality of plant traits and its relevance to community assembly. *Journal of Ecology*, **102**, 186-193.
- Laughlin, D.C., Leppert, J.J., Moore, M.M. & Sieg, C.H. (2010) A multi-trait test of the leaf-height-seed plant strategy scheme with 133 species from a pine forest flora. *Functional Ecology*, **24**, 493-501.
- Lechowicz, M.J. (2002) Phenology. *The Earth System: biological and ecological dimensions of global environmental change* (eds H.A. Mooney & J.G. Canadell), pp. 461-465. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Leishman, M.R., Wright, I.J., Moles, A.T. & Westoby, M. (2000) The evolutionary ecology of seed size. *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities* (ed. M. Fenner), pp. 31-57. CAB International, Wallingford, UK.
- Louault, F., Pillar, V., Aufrère, J., Garnier, E. & Soussana, J. (2005) Plant traits and functional types in response to reduced disturbance in a semi-natural grassland. *Journal of Vegetation Science*, **16**, 151-160.
- Mazer, S.J. (1989) Ecological, taxonomic, and life history correlates of seed mass among Indiana dune angiosperms. *Ecological Monographs*, **59**, 153-175.
- Molénat, G., Foulquie, D., Autran, P., Bouix, J., Hubert, D., Jacquin, M., Bocquier, F. & Bibé, B. (2005) Pour un élevage ovin allaitant performant et durable sur parcours: un système expérimental sur le Causse du Larzac. *INRA Productions animales*, **18**, 323-338.
- Moles, A.T. & Leishman, M.R. (2008) The seedling as part of a plant's life history strategy. *Seedling ecology and evolution*, 217-238.
- Moles, A.T. & Westoby, M. (2003) Latitude, seed predation and seed mass. *Journal of Biogeography*, **30**, 105-128.

- Moles, A.T. & Westoby, M. (2004) Seedling survival and seed size: a synthesis of the literature. *Journal of Ecology*, **92**, 372-383.
- Mooney, H.A., Hobbs, R.J., Gorham, J. & Williams, K. (1986) Biomass accumulation and resource utilization in co-occurring grassland annuals. *Oecologia*, **70**, 555-558.
- Pérez-Harguindeguy, N., Díaz, S., Garnier, E., Lavorel, S., Poorter, H., Jaureguiberry, P., Bret-Harte, M., Cornwell, W., Craine, J. & Gurvich, D. (2013) New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany*.
- Pitelka, L.F. (1977) Energy allocations in annual and perennial Lupines (lupinus: Leguminosae). *Ecology*, **58**, 1055-1065.
- Primack, R.B. (1987) Relationships among flowers, fruits, and seeds. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, 409-430.
- Qian, H. & Jin, Y. (2016) An updated megaphylogeny of plants, a tool for generating plant phylogenies and an analysis of phylogenetic community structure. *Journal of Plant Ecology*, **9**, 233-239.
- Rahman, M.S. & Yoshida, S. (1985) Effect of water stress on grain filling in rice. *Soil science and plant nutrition*, **31**, 497-511.
- Rathcke, B. & Lacey, E.P. (1985) Phenological patterns of terrestrial plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **16**, 179-214.
- Revell, L.J. (2012) phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution*, **3**, 217-223.
- Schwartz, M.D. (2003) Phenology: An integrative environmental science. Springer, Dordrecht.
- Segrestin, J., Bernard-Verdier, M., Violle, C., Richarte, J., Navas, M.-L. & Garnier, E. (in press) When is the best time to flower and disperse? A comparative analysis of plant reproductive phenology in the Mediterranean. *Functional Ecology*.
- Skelton, R.P., West, A.G. & Dawson, T.E. (2015) Predicting plant vulnerability to drought in biodiverse regions using functional traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**, 5744-5749.
- Smith-Ramírez, C., Armesto, J.J. & Figueroa, J. (1998) Flowering, fruiting and seed germination in Chilean rain forest myrtaceae: ecological and phylogenetic constraints. *Plant Ecology*, **136**, 119-131.
- Sun, S. & Frelich, L.E. (2011) Flowering phenology and height growth pattern are associated with maximum plant height, relative growth rate and stem tissue mass density in herbaceous grassland species. *Journal of Ecology*, **99**, 991-1000.
- Thompson, J.D. (2005) *Plant evolution in the Mediterranean*. Oxford University Press.
- Vile, D., Shipley, B. & Garnier, E. (2006) A structural equation model to integrate changes in functional strategies during old-field succession. *Ecology*, **87**, 504-517.
- Warton, D.I., Duursma, R.A., Falster, D.S. & Taskinen, S. (2012) smatr 3—an R package for estimation and inference about allometric lines. *Methods in Ecology and Evolution*, **3**, 257-259.
- Weiher, E., Werf, A., Thompson, K., Roderick, M., Garnier, E. & Eriksson, O. (1999) Challenging Theophrastus: a common core list of plant traits for functional ecology. *Journal of Vegetation Science*, **10**, 609-620.
- Westoby, M. (1998) A leaf-height-seed (LHS) plant ecology strategy scheme. *Plant and Soil*, **199**, 213-227.
- Westoby, M., Falster, D.S., Moles, A.T., Vesk, P.A. & Wright, I.J. (2002) Plant ecological strategies: some leading dimensions of variation between species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **33**, 125-159.
- Willson, M.F. & Traveset, A. (2000) The ecology of seed dispersal. *Seeds. The Ecology of Regeneration in Plant Communities* (ed. M. Fenner), pp. 85-110. CAB International, Wallingford, UK.
- Wolkovich, E.M. & Cleland, E.E. (2014) Phenological niches and the future of invaded ecosystems with climate change. *AoB Plants*.
- Wolkovich, E.M. & Ettinger, A.K. (2014) Back to the future for plant phenology research. *New Phytologist*, **203**, 1021-1024.
- Wright, I.J., Reich, P.B., Westoby, M., Ackerly, D.D., Baruch, Z., Bongers, F., Cavender-Bares, J., Chapin, T., Cornelissen, J.H.C., Diemer, M., Flexas, J., Garnier, E., Groom, P.K., Gulias, J.,

Hikosaka, K., Lamont, B.B., Lee, T., Lee, W., Lusk, C., Midgley, J.J., Navas, M.-L., Niinemets, U., Oleksyn, J., Osada, N., Poorter, H., Poot, P., Prior, L., Pyankov, V.I., Roumet, C., Thomas, S.C., Tjoelker, M.G., Veneklaas, E.J. & Villar, R. (2004) The worldwide leaf economics spectrum. *Nature*, **428**, 821-827.

Supplementary material

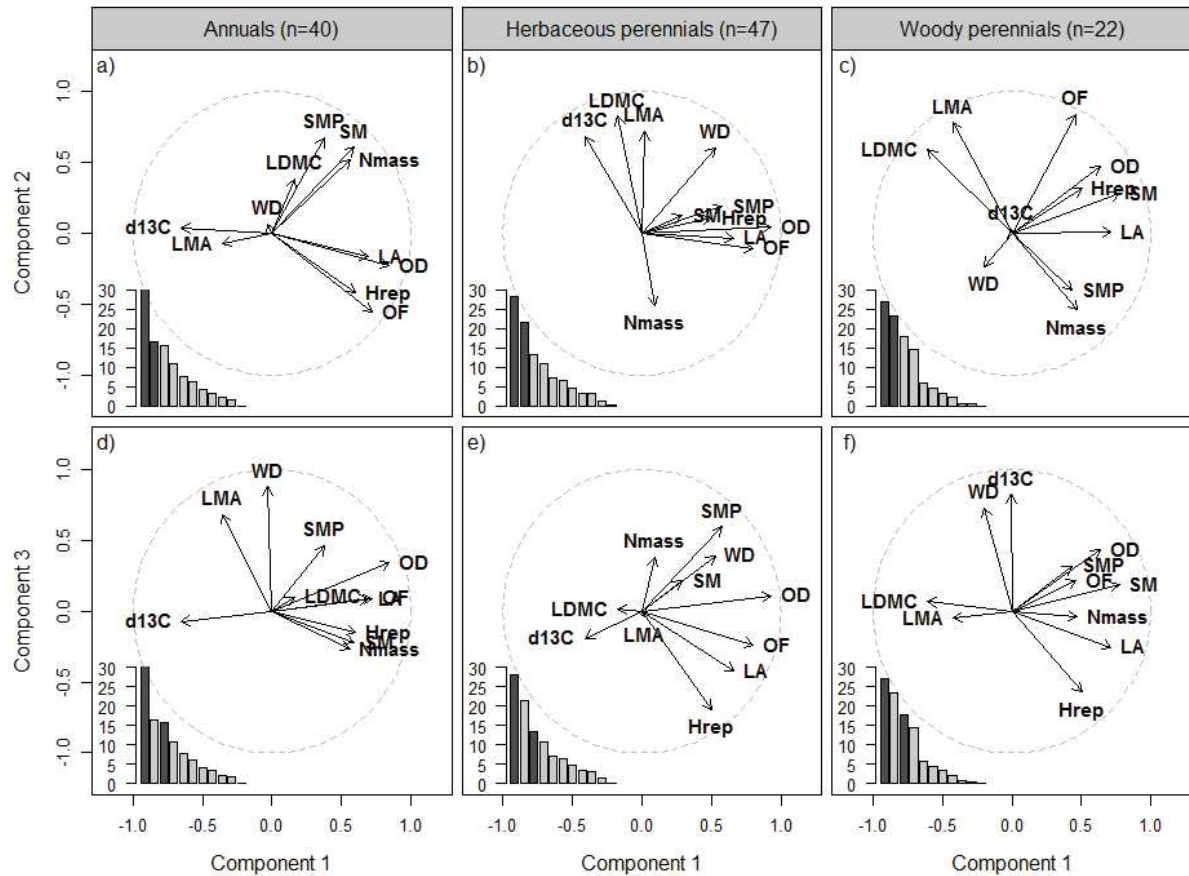


FIGURE S1 | Correlation circles of principale component analyses (PCAs) computed for 40 annual species (a,d), 47 herbaceous perennials (b,e) and 22 woody perennials (c,f) projected in the plan of components 1 and 2 (a, b, c) and the plan of components 1 and 3 (d, e, f). These PCAs include (i) four phenological traits: onset of flowering (OF), onset of dispersal (OD), seed maturation period (SMP) and water deficit during seed maturation period (WD); (ii) three size traits: plant reproductive height (Hrep), leaf area (LA) and seed mass (SM) and (iii) three ‘leaf economic’ traits: leaf mass per area (LMA), leaf dry matter content (LDMC), leaf nitrogen concentration (Nmass) and (iv) the leaf carbon isotopic ratio (d13C). In each panel, the barplot represents the percentage of variance explained by the principal components sorted negatively with darker bars for the represented components.

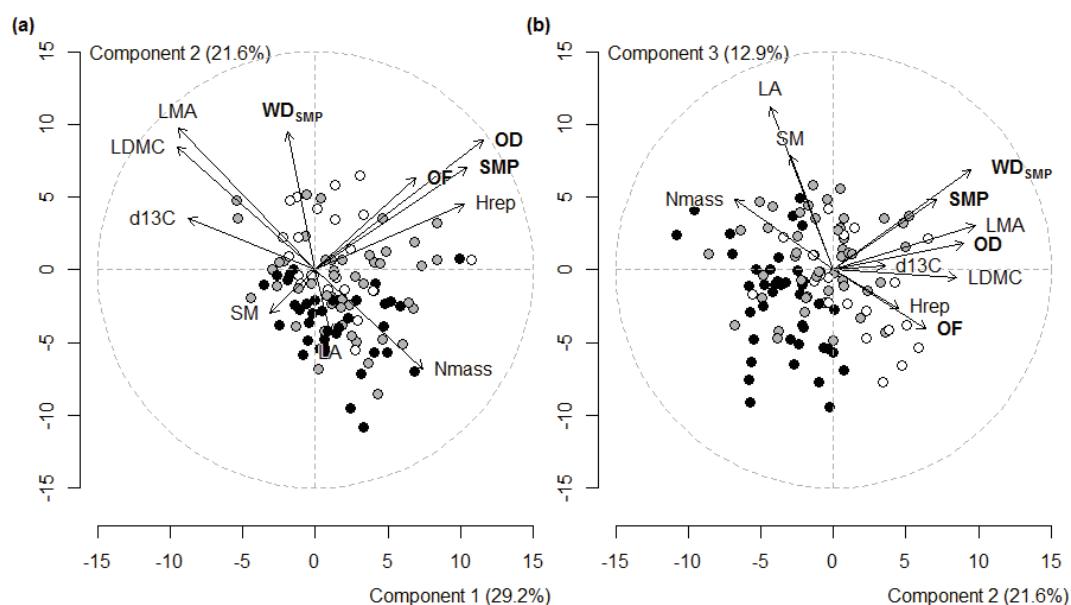


FIGURE S2 | Phylogenetic principal component analysis (PHYPCA) computed for 40 annual species (black points), 47 herbaceous perennials (grey points) and 22 woody perennials (white points) projected in the plan of components 1 and 2 (a) and the plan of components 1 and 3 (b). This PHYPCA includes (i) four phenological traits: onset of flowering (OF), onset of dispersal (OD), seed maturation period (SMP) and water deficit during seed maturation period (WD_{SMP}); (ii) three size traits: plant reproductive height (Hrep), leaf area (LA) and seed mass (SM) and (iii) three ‘leaf economic’ traits: leaf mass per area (LMA), leaf dry matter content (LDMC), leaf nitrogen concentration (Nmass) and (iv) the leaf carbon isotopic ratio (d13C).

Chapitre 5

Propriétés biomécaniques des feuilles et syndrome d'économie foliaire



PROPRIÉTÉS BIOMÉCANIQUES DES FEUILLES ET SYNDROME D'ÉCONOMIE FOLIAIRE CHEZ 24 ESPÈCES DE PARCOURS MÉDITERRANÉENS

J. Segrestin*^a, E. Kazakou^b, N. Rowe^c, S. Coq^a, I. Prieto^a, K. Sartori^a, J. Richarte^b, M.-L.
Navas^b & E. Garnier^a

^a CEFU UMR 5175, Université de Montpellier – Université Paul Valéry – EPHE, 1919 route
de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France

^b Montpellier SupAgro, CEFU UMR 5175, Université de Montpellier – Université Paul
Valéry 5 – EPHE, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France

^c Botanique et bioinformatique de l'architecture des plantes, UMR 5120, TA 40/PS 2
Boulevard de la Lironde, 34398 Montpellier, cedex 5, France

* Corresponding author: jsegrestin@gmail.com

1 INTRODUCTION

Les propriétés biomécaniques des plantes, et en particulier celles de leurs feuilles, jouent un rôle majeur dans la performance des espèces dans leur environnement. Elles ont été identifiées depuis longtemps comme importantes dans les interactions plantes-herbivores (Feeny 1976; Coley 1983; Choong 1996; Pérez-Harguindeguy *et al.* 2003; Kitajima & Poorter 2010) et sont considérées comme centrales dans l'étude du compromis entre la croissance et la défense (Chabot & Hicks 1982; Coley 1988). Ce compromis adaptatif décrit le fait qu'un investissement de ressources dans la défense, qu'elle soit physique ou chimique, représente un coût pour la plante au dépend de la croissance végétative ou reproductive (Züst & Agrawal 2017). Les espèces végétales peuvent donc être classées selon un axe de variation décrivant leur niveau d'investissement dans la défense de leurs feuilles, les cas extrêmes étant : (1) un faible investissement dans la défense mais une vitesse de croissance rapide permettant de compenser les pertes éventuelles liées à l'herbivorie et aux dommages mécaniques et (2) un fort investissement dans la défense permettant de faibles pertes de biomasse mais une vitesse de croissance plus lente. La caractérisation des propriétés biomécaniques des feuilles pour une large gamme d'espèces et l'étude de leur covariation avec d'autres caractéristiques des plantes apparaissent donc pertinentes pour appréhender les stratégies écologiques des espèces végétales (Onoda *et al.* 2011).

Plusieurs auteurs ont proposé l'existence d'un lien entre le compromis croissance-défense et les stratégies d'utilisation des ressources au niveau foliaire (Reich *et al.* 1991; Wright *et al.* 2004; Díaz *et al.* 2016). En effet, un axe de gestion des ressources, nommé le syndrome d'économie foliaire (Wright *et al.* 2004), décrit des corrélations entre la vitesse de photosynthèse par unité de masse (A_{mass}), la durée de vie des feuilles (DVF) et des traits morpho-anatomiques et chimiques des feuilles (*e.g.* masse surfacique : MSF, teneur en azote : N_{mass}). Ces corrélations, trouvées à l'échelle mondiale, sont interprétées comme le résultat d'un compromis entre la vitesse d'acquisition des ressources (vitesse de photosynthèse élevée, turn-over rapide des feuilles) et leur conservation (feuilles longévives, vitesse de photosynthèse faible). Or, il est généralement admis que la stratégie de conservation des ressources s'accompagne d'un fort investissement dans la défense des feuilles afin de permettre leur plus longues durées de vie (Coley, Bryant & Chapin 1985; Westoby *et al.* 2002). Ainsi, quelques études ont montré que la durée de vie des feuilles est positivement corrélée aux propriétés biomécaniques chez les espèces ligneuses (Coley 1988; Wright & Cannon 2001; Kitajima & Poorter 2010). Cette hypothèse reste néanmoins peu testée et

d'avantage d'études présentant des mesures simultanées de traits foliaires relatifs à ces deux dimensions sont nécessaires, notamment en intégrant une plus grande diversité de formes de croissances et de type d'écosystèmes.

Une des difficultés identifiées concerne les méthodes d'estimation des propriétés biomécaniques. Elles sont en effet difficiles à appréhender puisqu'elles sont le résultat de nombreuses composantes : teneur et types de fibres dans les parois cellulaires, agencement spatial des tissus vasculaires, présence de sclérenchyme, épaisseur de la feuille, etc... La masse surfacique foliaire (rapport entre la masse sèche d'une feuille et sa surface), l'épaisseur, la teneur en matière sèche ou encore la teneur en fibres des feuilles ont d'ailleurs souvent été utilisées comme marqueurs de ces propriétés (Loranger *et al.* 2012; Schuldt *et al.* 2012; Bumb *et al.* 2016). L'utilisation d'appareils spécifiques permet d'effectuer trois types de tests visant à mesurer les propriétés biomécaniques dites structurelles (Onoda *et al.* 2011) des feuilles de manière plus directe: les tests de résistance à la coupe et à la perforation, réalisés essentiellement sur les espèces ligneuses jusqu'ici (Reich *et al.* 1991; Choong 1996; Wright & Cannon 2001; Ang, Lucas & Tan 2008; Kitajima & Poorter 2010; Westbrook *et al.* 2011) et le test de résistance à l'étirement, réalisé sur une plus large gamme de type d'espèces (Cornelissen *et al.* 1999; Pérez-Harguindeguy *et al.* 2000; Diaz *et al.* 2004). Bien que souvent interprétés de manière similaire, puisque quelques études ont montré leur corrélation sur un nombre limité d'espèces (Choong 1996; Enrico *et al.* 2015), ces tests estiment différentes caractéristiques physiques complémentaires (Sanson *et al.* 2001) et les facteurs à l'origine de leur variation entre espèces restent peu connus.

L'objectif de cette étude est de caractériser les propriétés structurelles des feuilles de 24 espèces de parcours méditerranéens. Les espèces sélectionnées représentent différents cycles de vies et groupes taxonomiques, majoritairement chez des plantes herbacées. Des tests de résistance à la coupe et à l'étirement ont été réalisés afin de comparer les différentes méthodes. Nous avons notamment testé l'impact de la méthode utilisée sur les relations entre les propriétés structurelles et la masse surfacique foliaire, l'épaisseur des feuilles et leur densité (estimée par la teneur en matière sèche et la teneur en fibres) qui ont été identifiées comme des composantes majeures des propriétés structurelles des feuilles (Onoda *et al.* 2011). Enfin, nous avons testé les relations entre les propriétés structurelles, la durée de vie des feuilles et leur vitesse de photosynthèse afin de tester le lien entre l'investissement dans les défenses mécaniques et le syndrome d'économie foliaire.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Site d'étude et sélection des espèces

TABLEAU 1 | Liste des 24 espèces étudiées associée à leur famille botanique, cycle de vie (Ann : Annuel, Per : Pérenne), groupe (M : monocotylédone, D : dicotylédone), type de pollinisation (ent : entomogame, ané : anémogame, aut : autogame) et type de dissémination (ané : anémochore, zoo : zoochore, baro : barochore, auto : autochore). L'origine correspond aux pratiques de gestion conduites sur les parcelles du parcours où l'espèce est la plus abondante et a été récoltée (P+/F+ : régime pâturé et fertilisé ; P+/F- : régime pâturé non fertilisé ; P-/F- : régime non pâturé non fertilisé).

Espèce	Famille botanique	Cycle de vie	Groupe	Pollinisation	Dissémination	Origine
<i>Anisantha sterilis</i>	Poaceae	Ann	M	ané	Zoo	P+/F+
<i>Anthyllis vulneraria</i>	Fabaceae	Ann	D	ent	Ané	P+/F-
<i>Brachypodium pinnatum</i>	Poaceae	Per	M	ané	Zoo	P+/F-
<i>Bromopsis erecta</i>	Poaceae	Per	M	ané	Zoo	P+/F-
<i>Bromus hordeaceus</i>	Poaceae	Ann	M	ané, aut	Zoo	P+/F+
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	Brassicaceae	Ann	D	aut	Ané	P+/F+
<i>Carex humilis</i>	Cyperaceae	Per	M	ané	Baro	P-/F-
<i>Coronilla minima</i>	Fabaceae	Per	D	ent	Zoo	P+/F-
<i>Erodium cicutarium</i>	Geraniaceae	Ann	D	ent, aut	Auto	P+/F+
<i>Festuca christiani-bernardii</i>	Poaceae	Per	M	ané	Zoo	P-/F-
<i>Geranium molle</i>	Geraniaceae	Ann	D	ent, aut	Auto	P+/F+
<i>Helianthemum apenninum</i>	Cistaceae	Per	D	ent	Zoo	P+/F-
<i>Helianthemum canum</i>	Cistaceae	Per	D	ent	Baro	P-/F-
<i>Hippocrepis comosa</i>	Fabaceae	Per	D	ent	Zoo	P+/F-
<i>Lotus corniculatus</i>	Fabaceae	Per	D	ent	Baro	P+/F-
<i>Pilosella officinarum</i>	Asteraceae	Per	D	aut	Ané	P+/F-
<i>Plantago lanceolata</i>	Plantaginaceae	Per	D	ent, ané	Baro	P+/F+
<i>Poa bulbosa</i>	Poaceae	Per	M	ané	Baro	P+/F+
<i>Potentilla verna</i>	Rosaceae	Per	D	ent	Baro	P-/F-
<i>Poterium sanguisorba</i>	Rosaceae	Per	D	ent	Baro	P-/F-
<i>Stipa pennata</i>	Poaceae	Per	M	ané	Ané	P-/F-
<i>Trifolium repens</i>	Fabaceae	Per	D	ent	Zoo	P+/F+
<i>Veronica arvensis</i>	Plantaginaceae	Ann	D	ent, aut	Baro	P+/F+
<i>Vulpia myuros</i>	Poaceae	Ann	M	aut	Zoo	P+/F+

Les espèces étudiées sont des plantes herbacées et ligneuses de petite stature (chaméphytes). Elles proviennent d'un parcours ovin situé sur le Causse du Larzac en Aveyron (domaine expérimental de La Fage, 43°55'N, 3°05'E, France), où le climat, classé comme Méditerranéen humide, est caractérisé par une forte saisonnalité des températures et de la disponibilité en eau (température annuelle moyenne de 9.8°C et précipitations annuelles moyennes de 1035mm, Daget 1977). Les espèces ont été sélectionnées en fonction de leur

abondance dans des milieux caractérisés par des pratiques de gestion contrastées (différences d'intensité du pâturage et de fertilisation) (voir Chollet *et al.* 2014; Bumb *et al.* 2016 pour plus de détails). Nous avons ainsi maximisé la diversité phénotypique entre espèces en sélectionnant des espèces pérennes caractéristiques de milieux à faible disponibilité en nutriments et en eau (*Stipa pennata*, *Carex humilis*) mais aussi des espèces annuelles typiques de milieux riches en nutriments et avec une forte intensité de pâturage (*Geranium molle*, *Veronica arvensis*). La liste d'espèces étudiées comprend 8 annuelles et 15 pérennes réparties en 8 monocotylédones et 15 dicotylédones (Tableau 1).

2.2 Mesures biomécaniques et traits foliaires

Au cours des mois de mai et juin 2015, huit individus par espèce ont été identifiés dans la parcelle où l'espèce est la plus abondante au moment de leur pic de végétation. Pour chaque individu, un rameau comportant deux feuilles matures, non abimées et d'âge similaire (généralement produites successivement sur le rameau) est récolté. Les rameaux sont directement placés dans une glacière, dans des tubes individuels contenant de l'eau distillée, puis ils sont transférés au laboratoire et conservés au réfrigérateur à 4°C pendant au moins 12h afin d'assurer une hydratation optimale des tissus.

Deux tests biomécaniques sont réalisés sur les feuilles de chaque rameau (Fig. 1). Une première feuille est utilisée pour le test à la coupe et une seconde pour le test à l'étirement :

- (1) Un appareil d'essais mécaniques en traction (Instron® 5940) adapté à la coupe de feuilles a été utilisé pour le test de coupe (Ang, Lucas & Tan 2008). La feuille est maintenue horizontalement par des mors espacées de 4 mm et vissées manuellement afin d'éviter l'écrasement des tissus. La feuille est coupée perpendiculairement à sa nervure centrale par une lame de rasoir descendant verticalement à une vitesse de 10 mm/min et fixée à un capteur de force. Des mesures du déplacement de la lame (mm) et de force (N) sont réalisées à intervalles de temps réguliers. La lame est inclinée à 20° afin de couper l'échantillon progressivement sur un peu plus de la moitié de sa largeur. Une coupe incomplète permet de maintenir la feuille en place pour un second passage, effectué dans la même entaille, qui estime les forces de frottement entre la lame et les tissus foliaires lors de la coupe. Ces forces sont ensuite soustraites de la mesure du premier passage (Ang, Lucas & Tan 2008). L'énergie de coupe (exprimée en Joules, J) correspond à l'intégrale de la courbe de force de coupe corrigée par les forces de frottement (Newtons, N) entre la marge de la feuille et la fin de la nervure

centrale (mm). Cette valeur d'énergie est ensuite rapportée à la longueur de coupe afin d'obtenir la résistance à la coupe (J.m^{-1}) qui est considérée comme un marqueur des propriétés structurales.

- (2) Un appareil d'essais mécaniques similaire (Instron® MicroTester) est utilisé pour les tests d'étirement. Ce test nécessite l'utilisation d'un échantillon rectangulaire afin d'appliquer une contrainte homogène à l'ensemble de l'échantillon (Pérez-Harguindeguy *et al.* 2013). Les feuilles ont donc été coupées en bandes d'environ 4 mm de large incluant la nervure centrale dans son grand axe pour obtenir une telle géométrie (largeur exacte mesurée à la loupe binoculaire avant le test). L'échantillon est ensuite placé entre deux pinces visées manuellement, séparées de 20 ou 5 mm selon la taille de la feuille. L'une des pinces est fixe et l'autre s'éloigne à une vitesse constante de 6 mm/s. Cette dernière est munie d'un capteur de force et d'un capteur de déplacement. La force mesurée au moment de la rupture (N) est enregistrée et est rapportée à la largeur de l'échantillon. On obtient alors la force à l'étirement (kN.m^{-1}) qui correspond à la force minimale nécessaire à la rupture d'une unité de largeur d'échantillon et est également considérée comme un marqueur des propriétés structurales.

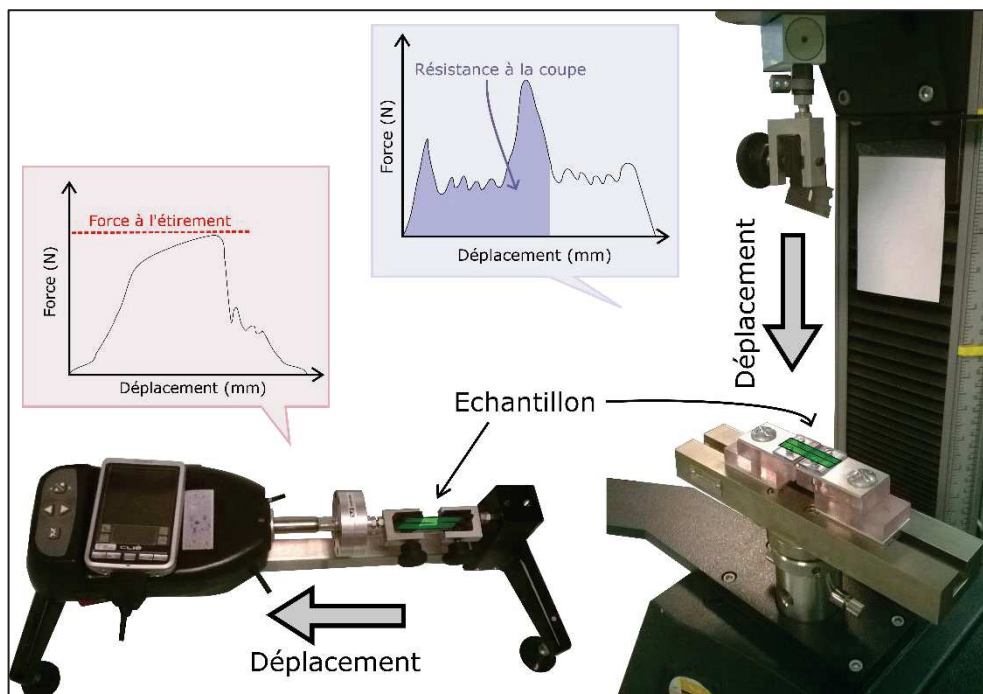


FIGURE 1 | Appareils d'essais mécaniques permettant de réaliser des tests en traction (à gauche) et à la coupe (à droite). Ces appareils possèdent des capteurs de déplacement (mm) et de force (N). Les courbes obtenues permettent d'estimer la force à l'étirement (encadré rouge) et la résistance à la coupe (encadré bleu).

Des mesures complémentaires sont réalisées sur les feuilles avant chaque test mécanique : le poids frais après réhydratation (P_f) est mesuré. L'épaisseur du limbe (E_l) et de la nervure centrale (E_n) sont mesurées à l'aide d'un capteur de déplacement LVDT (Linear Variable Differential Transformer). La surface de la feuille (S) est estimée à partir de l'analyse de scans réalisés à une résolution de 1200 ppp. Puis, le poids sec après 72h de séchage à 60°C (P_s) est mesuré. Ces mesures permettent d'estimer la masse surfacique foliaire ($MSF = \frac{P_s}{S}$, g.m⁻²), la teneur en matière sèche des feuilles ($TMSF = \frac{P_s}{P_f} * 1000$, mg.g⁻¹) et l'épaisseur moyenne de la feuille ($E = E_n * \frac{\text{Largeur de la nervure}}{\text{Largeur de la feuille}} + E_l * \left(1 - \frac{\text{Largeur de la nervure}}{\text{Largeur de la feuille}}\right)$, mm). Toutes ces mesures ont été réalisées sur le limbe des feuilles ou des folioles dans le cas des feuilles composées, i.e. sans prendre en compte le pétiole ou le rachis, respectivement (Pérez-Harguindeguy *et al.* 2013).

2.3 Estimation de la teneur en fibres des feuilles

En 2013 ou 2014, entre 30 et 150 individus de chaque espèce ont été récoltés dans les mêmes parcelles afin d'obtenir au moins quatre grammes de biomasse de feuilles sèches pour déterminer leur teneur en fibres par la méthode de spectroscopie en proche infrarouge (NIRS). Les échantillons ont été triés, séchés et broyés avant l'analyse. Les spectres de réflectance ont été réalisés par un spectromètre FOSS Nirsystem 6500 (FOSS Nirsystems, Silver Spring, MD, USA) opérant entre 400 et 2500 nm. La teneur en fibres (fibres insolubles au détergent neutre, NDF %) a été prédite grâce à des calibrations basées sur des analyses chimiques selon la méthode détergente séquentielle de Van Soest avec un prétraitement amyolitique et protéase (Van Soest, Robertson & Lewis 1991). Des calibrations précédemment disponibles ont été révisées et adaptées à nos échantillons suite à des analyses de référence sur 24 échantillons représentatifs de notre jeu de données. Les calibrations ont été établies en utilisant des régressions partielles des moindres carrés avec le logiciel WINISI (Infrasoft International, Port Matilda, PA, USA) (pour plus de détails voir Bumb *et al.* 2016).

2.4 Traits du syndrome d'économie foliaire

Les 24 espèces étudiées ont été mises en culture au terrain d'expérience du centre d'écologie fonctionnelle et évolutive à Montpellier (43°38'N, 3°51'E) afin de mesurer la durée de vie des feuilles et la vitesse de photosynthèse maximale par unité de masse. Parmi les 24 espèces, *Poa bulbosa* n'a jamais réalisé un cycle de vie complet durant les suivis et a été exclu des analyses. Pour chaque espèce pérenne, huit individus matures et sains ont été sélectionnés *in-*

situ puis transplantés dans des pots individuels de 8L contenant un substrat standardisé entre novembre 2014 et mai 2015. Les plantes ont profité d'une phase d'acclimatation de 8 à 13 mois au terrain d'expérience avant le début des suivis. Pour les espèces annuelles, des graines ont été récoltées *in-situ* tout au long de l'année 2015. Elles ont été semées en février 2016 dans les mêmes conditions que les espèces pérennes. Les 192 pots ont été séparés en deux groupes identiques positionnés aléatoirement sur deux tables en extérieur. Un arrosage adapté à chaque individu a été réalisé tout au long de l'expérience afin de décrire le cycle des plantes dans des conditions hydriques non stressantes.

Début avril 2016, un rameau par individu a été sélectionné et marqué à l'aide d'une bague. La plus jeune feuille apparente du rameau (feuille zéro) est marquée puis des suivis hebdomadaires de chaque individu ont été réalisés entre avril et septembre 2016. À chaque passage, les nouvelles feuilles apparues sont marquées et la mort des feuilles déjà marquées est notée. La date d'apparition de chaque feuille est estimée en considérant une production de feuille régulière entre deux passages. Ainsi, les dates d'apparition de 2 à 20 feuilles produites à la suite de la feuille zéro ont été estimées pour chaque individu. De même, la date de mort de chaque feuille est estimée en considérant une mort régulière de feuilles entre deux passages. Ainsi, les durées de vie (DVF, jours) de 1 à 17 feuilles par individu ont été estimées par la différence entre les dates de mort et d'apparition.

Début juin 2016, la vitesse photosynthèse maximale par unité de masse (A_{mass} , $\text{mmol.g}^{-1}.\text{s}^{-1}$) a été mesurée sur 6 à 8 individus par espèce. La mesure a été effectuée sur une feuille mature et exposée au soleil par un appareil portable (LI-6400, LICOR, Inc., Lincoln, NE, USA) équipé d'une chambre lumineuse LI-6400-02B LED light et d'un injecteur de CO_2 LICOR 6400-01. La concentration en CO_2 dans la chambre a été maintenue à $400 \mu\text{mol.mol}^{-1}\text{CO}_2$ et l'intensité lumineuse a été réglée à $1500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (lumière saturante). La température et l'humidité relative dans la chambre correspondaient aux conditions ambiantes extérieures.

2.5 Analyses des données

Les analyses ont été réalisées à l'échelle de l'espèce, à partir des moyennes obtenues pour les huit individus de chaque espèce. La distribution des données biomécaniques est représentée par des diagrammes en violons réalisés à partir de fonction d'estimation de densité par noyau. Les distributions observées dans notre jeu de données sont comparées à un jeu de données représentant la distribution de ces traits à l'échelle mondiale (Onoda *et al.* 2011). Les différences entre groupes taxinomiques d'espèces sont testées par une ANOVA à un facteur.

Des tests de corrélations de Pearson ont été réalisés entre le logarithme des variables pour toutes les espèces ($n = 24$) ou pour chaque groupe d'espèce (monocotylédones et dicotylédones) séparément. Pour chaque relation significative ($p\text{-value} < 0.05$) les coefficients d'une fonction de puissance ($Y = aX^b$) sont estimées par une régression linéaire sur les logarithmes des variables ($\log(Y) = \log(a) + b * \log(X)$) selon la méthode d'axe majeur standardisé (package R 'smatr' - Warton *et al.* 2012). Ainsi, le choix de l'attribution d'une variable en X ou en Y n'intègre pas de biais dans l'estimation des coefficients. La comparaison des coefficients entre groupe d'espèces est réalisée selon la méthode présentée par (Warton *et al.* 2012).

3 RÉSULTATS

3.1 Caractéristiques biomécaniques des feuilles

On observe une grande variabilité entre espèces sur la résistance à la coupe des feuilles, allant de 0.45 J.m^{-1} (*Vulpia myuros*) à 1.03 J.m^{-1} (*Stipa pennata*). Ces valeurs apparaissent élevées en comparaison de celles observées dans le jeu de données mondial (Fig. 2a), obtenues majoritairement sur des espèces ligneuses (seulement 25 espèces herbacées sur les 1197 espèces représentées). On ne détecte aucune différence entre les monocotylédones et les dicotylédones sur cette mesure (Fig. 2a, ANOVA, $F = 0.09$, ddl = 1 et 22, $P\text{-val} = 0.76$). De même, on observe une grande variabilité entre espèces concernant la force à l'étirement, allant de 0.08 kN.m^{-1} (*Lotus corniculatus*) à 8 kN.m^{-1} (*Stipa pennata*). Ces valeurs couvrent une gamme assez large comparée à celles représentées dans le jeu de données mondial (Fig. 2c) obtenues sur un échantillon plus équilibré d'espèces herbacées (574 espèces) et ligneuses (926 espèces). On observe une nette différence de force à l'étirement entre les monocotylédones et les dicotylédones dans notre jeu de données (Fig. 2c, ANOVA, $F = 56.1$, ddl = 1 et 22, $P\text{-val} < 0.001$).

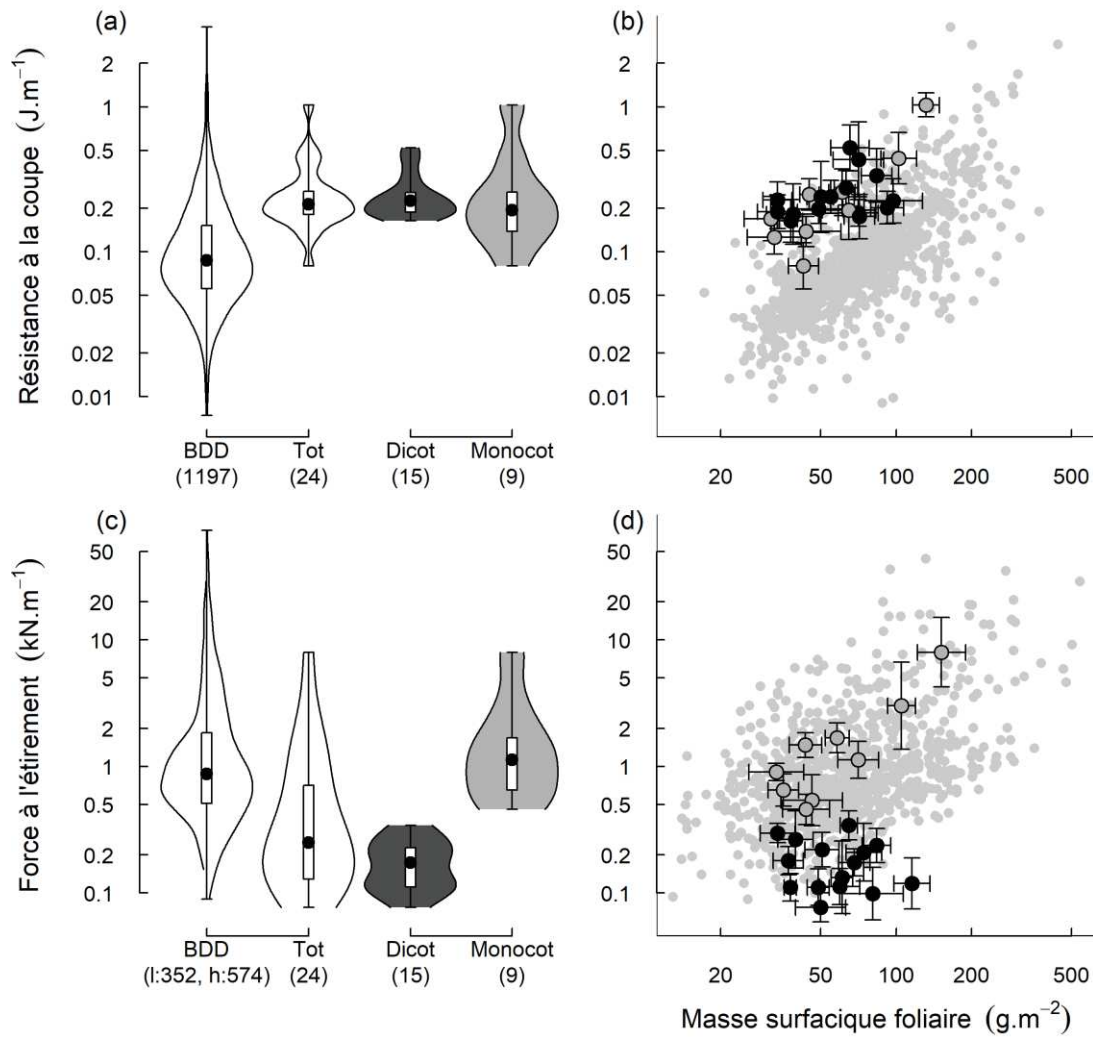


FIGURE 2 | Diagrammes en violons représentant la distribution de la résistance à la coupe (a) et de la force à l'étirement (c) pour les 24 espèces étudiées (Tot) en comparaison avec une base de données mondiale (BDD, Onoda *et al.* 2011). Les distributions par groupe d'espèces (Dicot : dicotylédones en gris foncé; Monocot : monocotylédones en gris clair) sont montrées dans chaque panneau. Le diagramme représentant la distribution de la force à l'étirement dans la base de données (panneau c, BDD) n'est pas symétrique. La distribution de gauche représente les espèces ligneuses (l) et celle de droite des herbacées (h). Le nombre d'espèces est donné entre parenthèses. Les panneaux b et d représentent la position des espèces étudiées (les points noirs représentent les dicotylédones, les points gris les monocotylédones et les barres d'erreurs l'écart type autour des moyennes par espèce) dans les relations entre les traits biomécaniques et la masse surfacique foliaire trouvées à l'échelle mondiale (points gris clairs en arrière plan, voir Onoda *et al.* 2011).

La relation entre la résistance à la coupe et la force à l'étirement n'est que marginalement significative ($r = 0.4$, $t = 2$, $\text{ddl} = 22$, $P\text{-val} = 0.05$) et est clairement structurée par les groupes taxonomiques (Fig. 3). Au sein de chaque groupe on observe une relation linéaire positive entre le logarithme de ces deux traits (Fig. 3) et leur droite de régression partagent la même

penne (penne commune = 1.2) mais des ordonnées à l'origine différentes (0.1 pour les dicotylédones et 2.1 pour les monocotylédones). Pour une même résistance à la coupe, une espèce monocotylédone à une force à l'étirement 7.4 fois plus élevée qu'une espèce dicotylédone :

$$F_{mon} = e^{2.1} * R_{mon}^{1.2} \quad (1)$$

$$\text{et } F_{dic} = e^{0.1} * R_{dic}^{1.2} \quad (2)$$

$$\text{pour } R_{mon} = R_{dic} \text{ on a } \frac{F_{mon}}{F_{dic}} = e^{2.1-0.1} = 7.4 \quad (3)$$

avec F_{mon} et F_{dic} , la force à l'étirement d'une espèce monocotylédone et dicotylédone respectivement, R_{mon} et R_{dic} la résistance à la coupe d'une espèce monocotylédone et dicotylédone respectivement.

3.2 Propriétés biomécaniques des feuilles et traits morpho-anatomiques et chimiques

On trouve une relation positive entre la résistance à la coupe des feuilles et leur masse surfacique foliaire (Fig. 2b et 4a, $r = 0.66$, $t = 4.1$, $ddl = 22$, $P\text{-val} < 0.001$). À masse surfacique foliaire équivalente, les espèces étudiées ont une résistance à la coupe élevée en comparaison de celles représentées dans la base de données mondiale (Fig. 2b). La relation est maintenue lorsque l'on considère uniquement les espèces monocotylédones (Fig. 3a, $r = 0.86$, $t = 4.5$, $ddl = 7$, $P\text{-val} = 0.003$). Cependant, elle n'est pas significative pour les espèces dicotylédones (Fig. 4a, $t = 1.3$, $ddl = 13$, $P\text{-val} = 0.2$) bien que les valeurs observées soient peu éloignées de la relation trouvée pour les monocotylédones. La relation positive entre la résistance à la coupe et l'épaisseur de la feuille n'est que marginalement significative (Fig. 4b, $r = 0.39$, $t = 1.97$, $ddl = 22$, $P\text{-val} = 0.06$). De nouveau, ce résultat n'est maintenu que pour les espèces monocotylédones (Fig. 4b).

Enfin, on ne détecte pas de relation entre la résistance à la coupe et la teneur en matière sèche des feuilles lorsque l'on considère l'ensemble des espèces (Fig. 4c, $t = 1.58$, $ddl = 22$, $P\text{-val} = 0.13$) ou uniquement les dicotylédones ($t = 0.71$, $ddl = 13$, $P\text{-val} = 0.49$). On trouve cependant une relation positive entre ces traits pour les monocotylédones ($r = 0.79$, $t = 3.42$, $ddl = 7$, $P\text{-val} = 0.01$). Des résultats similaires à ceux trouvés avec la teneur en matière sèche sont observés pour la relation entre la résistance à la coupe et la teneur totale en fibres des feuilles (Fig. 5a).

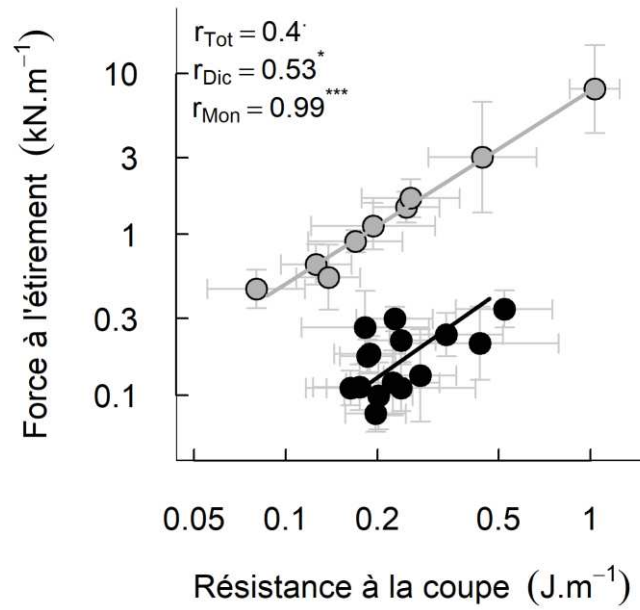


FIGURE 3 | Relation entre les mesures biomécaniques pour les 24 espèces et pour chaque groupe taxonomique (points noirs pour les dicotylédones et points pour les monocotylédones). Les barres grises représentent les écart-types pour chaque espèce. Les coefficients de corrélation de Pearson pour l'ensemble des espèces (r_{Tot}) ou pour chaque groupe d'espèce (r_{Dic} : dicotylédones, r_{Mon} : monocotylédones), ainsi que leur significativité sont mentionnés dans chaque panneau (*: P-val < 0.05; **: P-val < 0.01; ***: P-val < 0.001). Lorsque la corrélation est significative, la droite de régression de type SMA est représentée.

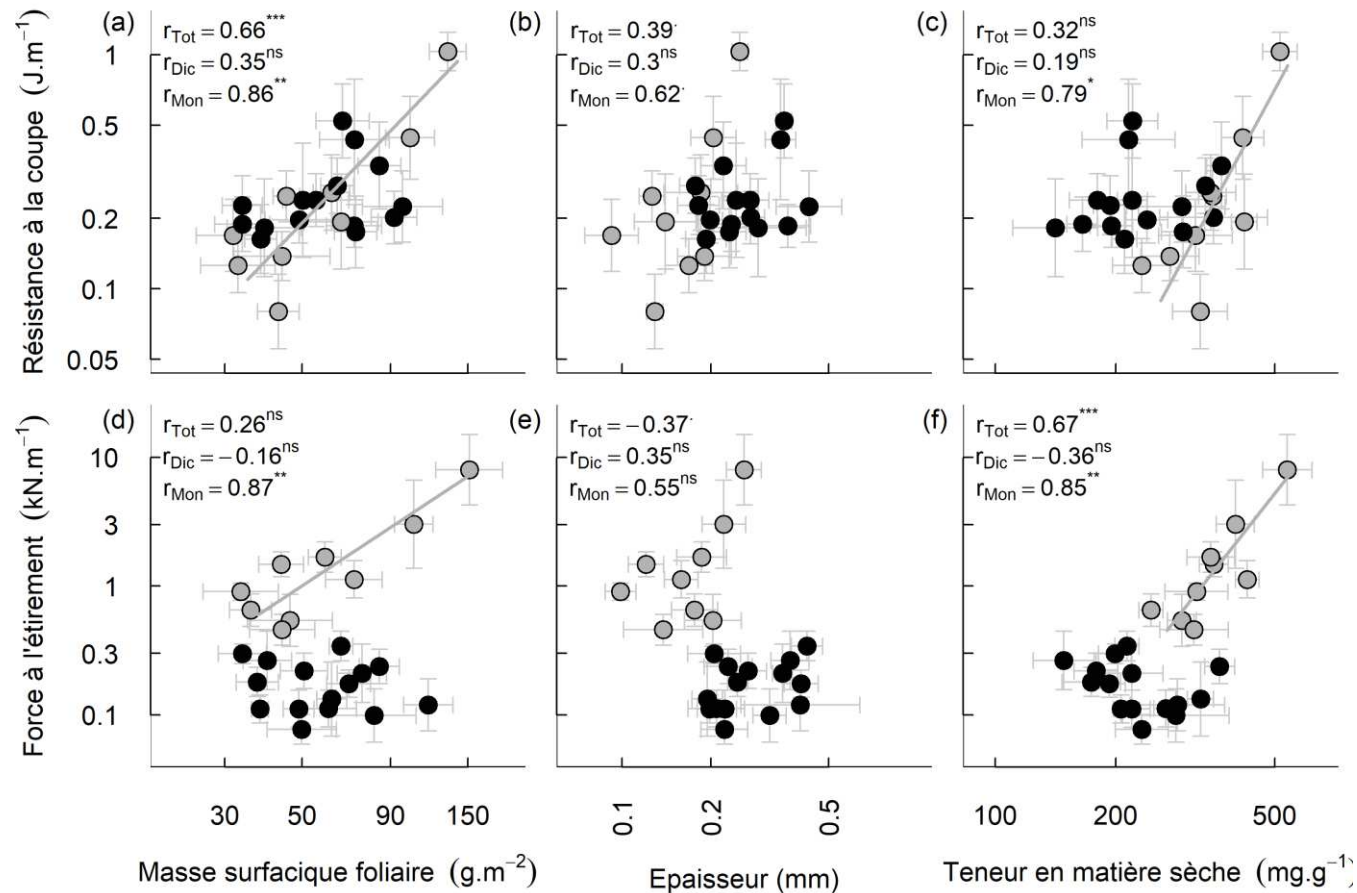


FIGURE 4 | Relations entre les traits biomécaniques et la masse surfacique foliaire (a et d), l'épaisseur (b et e) et la teneur en matière sèche de la feuille testée. Les barres grises représentent les écart-types pour chaque espèce. Les coefficients de corrélation de Pearson pour l'ensemble des espèces (r_{Tot}) ou pour chaque groupe d'espèce (r_{Dic} : dicotylédones, r_{Mon} : monocotylédones), ainsi que leur significativité sont mentionnés dans chaque panneau (ns: P-val > 0.1; ^{*}: P-val < 0.05; ^{**}: P-val < 0.01; ^{***}: P-val < 0.001). Lorsque la corrélation est significative, la droite de régression de type SMA est représentée.

On ne trouve pas de relation entre la force à l'étirement et la masse surfacique foliaire lorsque l'on considère l'ensemble du jeu de données (Fig. 2c et 3d, $t = 1.3$, ddl = 22, P-val = 0.22). Le nuage de points observé est clairement structuré par les groupes taxonomiques (Fig. 4d) : pour les monocotylédones, on observe une corrélation positive entre ces traits, cohérente avec ce que l'on trouve dans la base de données mondiale (Fig. 2c, $r = 0.87$, $t = 4.7$, ddl = 7, P-val = 0.002) alors que ces traits sont indépendants pour les dicotylédones dont les forces à l'étirement apparaissent faibles (Fig. 2c, $t = -0.6$, ddl = 13, P-val = 0.56). On ne trouve pas de relation entre la force à l'étirement et l'épaisseur des feuilles, quel que soit le jeu de données considéré (Fig. 4e). La force à l'étirement est corrélée à la teneur en matière sèche et à la teneur totale en fibres des feuilles pour l'ensemble du jeu de données (Fig. 4f et 5b). Ces relations sont maintenues pour les monocotylédones mais pas pour les dicotylédones bien que la position de ces espèces dans le nuage de points global soit cohérente.

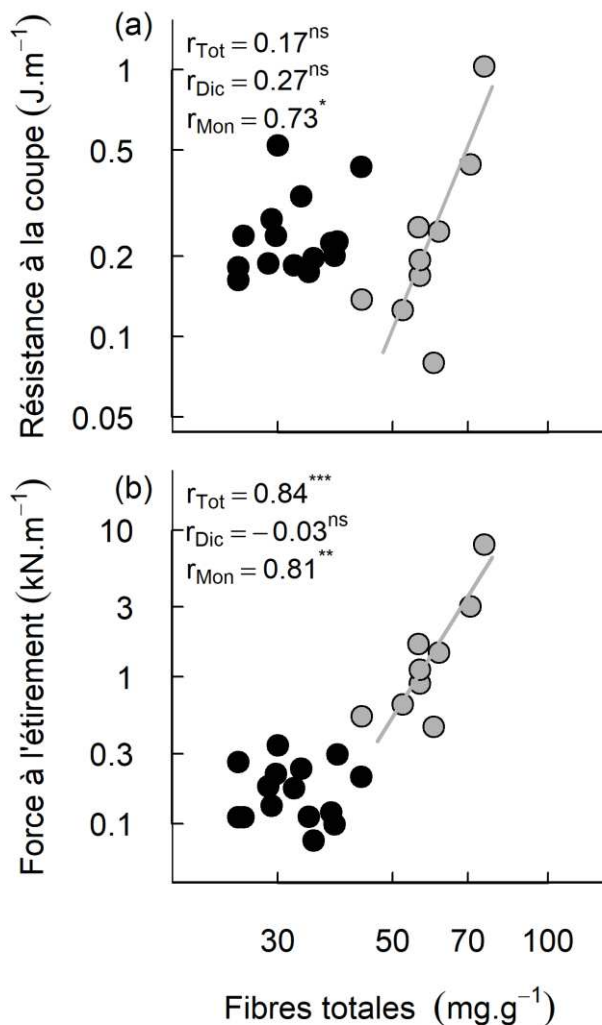


FIGURE 5 | Relations entre les traits biomécaniques et la teneur en fibres totales mesurées sur les 24 espèces étudiées. Les coefficients de corrélation de Pearson pour l'ensemble des espèces (r_{Tot}) ou pour chaque groupe d'espèce (r_{Dic} : dicotylédones, r_{Mon} : monocotylédones), ainsi que leur significativité sont mentionnés dans chaque panneau (ns: P-val > 0.1; *: P-val < 0.05; **: P-val < 0.01; ***: P-val < 0.001). Lorsque la corrélation est significative, la droite de régression de type SMA est représentée.

3.3 Propriétés biomécaniques et le syndrome d'économie foliaire

La résistance à la coupe est négativement corrélée à la vitesse de photosynthèse maximale par unité de masse (Fig. 6a, $r = -0.59$, $t = -3.38$, $ddl = 21$, $P\text{-val} = 0.003$) et positivement corrélée à la durée de vie d'une feuille (Fig. 6c, $r = 0.48$, $t = 2.51$, $ddl = 21$, $P\text{-val} = 0.02$). Ces relations ne sont pas maintenues au sein de chaque groupe taxonomique, à l'exception de celle entre la résistance à la coupe et la photosynthèse pour les espèces monocotylédones (Fig. 6).

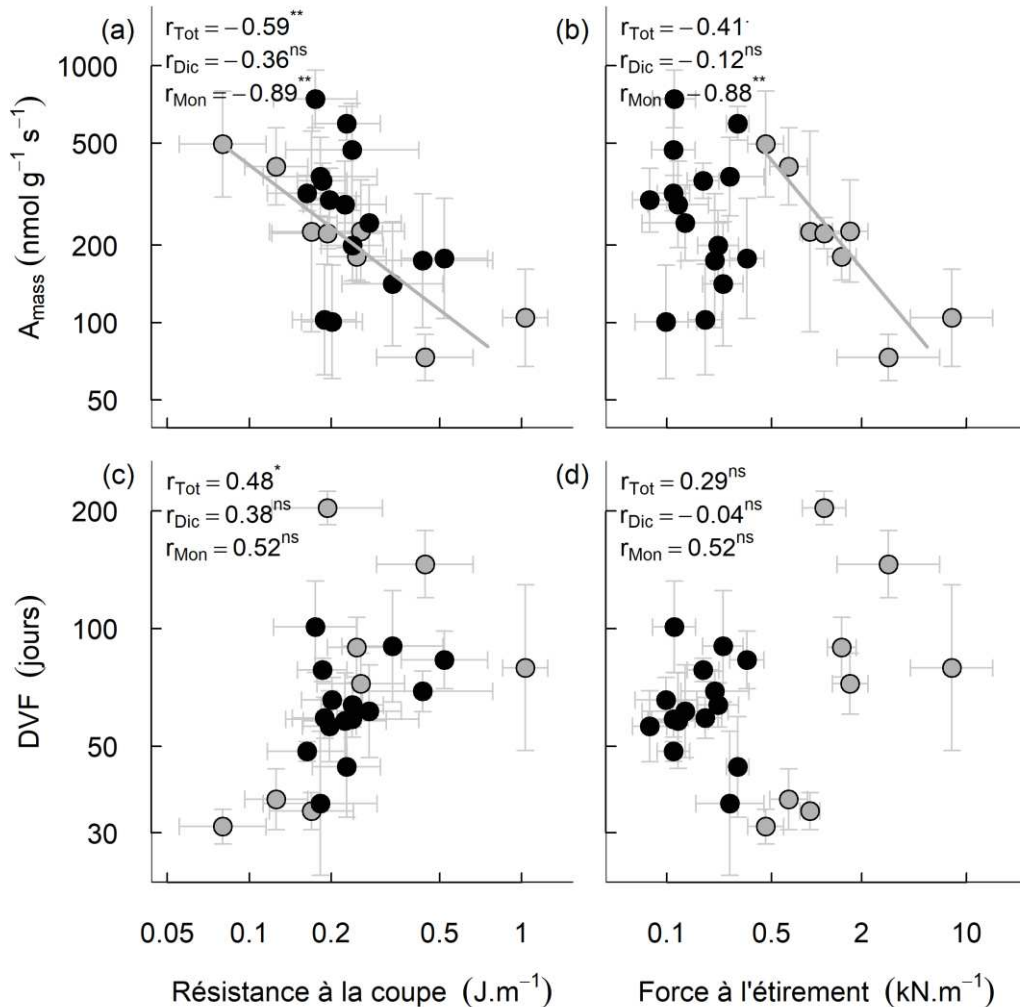


FIGURE 6 | Relations entre les traits biomécaniques et la vitesse de photosynthèse maximale par unité de masse (A_{mass} , a et b) et la durée de vie des feuilles (DVF, c et d) pour 23 espèces. Les coefficients de corrélation de Pearson pour l'ensemble des espèces (r_{Tot}) ou pour chaque groupe d'espèce (r_{Dic} : dicotylédones, r_{Mon} : monocotylédones), ainsi que leur significativité sont mentionnés dans chaque panneau (ns: $P\text{-val} > 0.1$; : $P\text{-val} < 0.1$; *: $P\text{-val} < 0.05$; **: $P\text{-val} < 0.01$; ***: $P\text{-val} < 0.001$). Lorsque la corrélation est significative, la droite de régression de type SMA est représentée.

La force à l'étirement apparait moins corrélée aux traits du syndrome d'économie foliaire (Fig. 6b et d). En effet, on trouve uniquement une relation négative entre la force à l'étirement

et la vitesse de photosynthèse pour les monocotylédones (Fig. 6b) et aucune relation n'est détectée avec la durée de vie des feuilles (Fig. 6c).

4 DISCUSSION

Notre étude apporte de nouveaux éléments dans la compréhension des déterminants des différences de résistance à la coupe et de force à l'étirement entre espèces. La diversité des espèces étudiées permet de couvrir une large gamme de valeurs de propriétés structurelles des feuilles, en comparaison à une base de données mondiale, et de mettre en évidence les différences de significations écologiques de ces deux mesures. À notre connaissance, notre étude est la première à tester les relations entre plusieurs traits biomécaniques des feuilles et les traits fondamentaux du syndrome d'économie foliaire chez des espèces herbacées. Ces points sont plus largement discutés dans les parties suivantes.

4.1 La résistance à la coupe et la force à l'étirement capturent différentes caractéristiques des feuilles

Contrairement à ce qui a été trouvé dans d'autres études (voire Edwards, Read & Sanson 2000; Read & Sanson 2003; Enrico *et al.* 2015), la résistance à la coupe et la force à l'étirement ne sont que faiblement corrélées lorsque l'on considère l'ensemble des espèces. Des corrélations positives entre ces mesures apparaissent cependant lorsque l'on considère les groupes taxonomiques séparément. Enrico *et al.* (2015) ont montré que pour une valeur de résistance à la coupe donnée, les espèces ont une force à l'étirement différente selon leur type de nervation: feuilles à nervures réticulée < feuilles à nervures parallèles < feuilles à section circulaire. Notre étude semble confirmer ces résultats puisqu'à même résistance à la coupe les monocotylédones, dont toutes les espèces ont des feuilles à nervures parallèles, ont une force à l'étirement 7.4 fois plus élevée que les espèces dicotylédones, dont les espèces ont des feuilles à nervures majoritairement réticulées. En appliquant une contrainte dans la direction de la nervure centrale, le test à l'étirement semble être clairement influencé par l'orientation des tissus vasculaires de la feuille contrairement au test à la coupe, qui ne permet pas de discriminer les espèces selon leur type de nervation.

Les propriétés structurelles des feuilles sont connues comme étant la combinaison de composantes anatomiques (épaisseur de la feuille) et chimiques (teneur en matière sèche, type et teneur en fibres) (Onoda *et al.* 2011). Cependant, les parts relatives de ces composantes semblent différentes selon la méthode utilisée pour l'estimation des propriétés structurelles.

En effet, la résistance à la coupe est positivement corrélée à la masse surfacique foliaire, qui dépend à la fois de l'épaisseur de la feuille et de sa teneur en matière sèche (Vile *et al.* 2005), mais est peu corrélée à chacune de ces composantes individuelles. En revanche, la force à l'étirement n'est corrélée qu'à la teneur en matière sèche et en fibres des feuilles mais pas à la masse surfacique foliaire ou à l'épaisseur. Ces mesures semblent donc correspondre à des propriétés des feuilles différentes : la résistance à la coupe apparaît comme une mesure intégrative qui prend en compte non seulement l'anatomie mais aussi la composition chimique des feuilles, alors que la force à l'étirement est majoritairement contrôlée par la teneur en fibres des feuilles. Ce résultat doit être considéré lors du choix de la méthode utilisée pour estimer les propriétés structurales des feuilles, puisqu'il peut avoir un impact fort sur les déductions qui peuvent être faites quant aux conséquences écologiques des différences entre espèces. Dans notre cas, le test à l'étirement discrimine les espèces monocotylédones des dicotylédones, en partie en lien avec leur type de nervation (voir paragraphe précédent) mais également en raison de leur teneur en fibres plus élevée. Par contre, le test à la coupe ne les discrimine pas puisqu'il intègre, en plus des composantes chimiques, des composantes anatomiques comme l'épaisseur des feuilles.

La résistance à la coupe apparaît donc comme le trait le plus pertinent pour la description du fonctionnement de la feuille et permet de connecter la défense mécanique au concept du syndrome d'économie foliaire. D'autre part, la force à l'étirement, qui décrit la teneur en fibre des feuilles, est connue pour permettre la description d'autres processus écologiques comme la digestibilité et la décomposition des litières (Cornelissen *et al.* 1999; Pérez-Harguindeguy *et al.* 2000; Bumb *et al.* 2016).

4.2 Les propriétés biomécaniques des feuilles dans le syndrome d'économie foliaire

Le syndrome d'économie foliaire décrit le compromis adaptatif entre la vitesse d'acquisition des ressources et leur conservation (Wright *et al.* 2004; Reich 2014). Il est considéré comme un axe de variation fonctionnel fondamental dans la description des stratégies écologiques des plantes (Westoby *et al.* 2002) et a été décrit pour de nombreuses espèces présentes dans la plupart des biomes de la planète. Les traits fondamentaux pour décrire cet axe sont la vitesse de photosynthèse par unité de masse (vitesse d'acquisition) et la durée de vie des feuilles (conservation). Ces traits sont cependant difficiles à mesurer et la plupart des études utilisent des mesures indirectes comme la masse surfacique foliaire et la teneur en azote des feuilles

pour l'appréhender. Cependant, l'étude des relations entre les traits biomécaniques et le syndrome d'économie foliaire nécessite une description fine des processus physiologiques de la feuille et ne peut pas se contenter de proxy potentiellement impliqués dans d'autres fonctions.

Comme trouvé chez les espèces ligneuses (Wright & Cannon 2001; Kitajima *et al.* 2012), la résistance à la coupe est positivement corrélée à la durée de vie des feuilles dans notre jeu de données. Cependant, aucune relation significative n'a été détectée entre la force à l'étirement et la durée de vie des feuilles. À notre connaissance, aucune autre étude n'a testé la relation entre ces traits ce qui ne nous permet pas de généraliser ce résultat. Ces différences entre méthodes font écho aux résultats présentés dans la partie précédente et renforcent nos conclusions : la résistance à la coupe est un trait intégratif qui traduit de manière plus fidèle les propriétés biomécaniques globales de la feuille en comparaison à la force à l'étirement.

Au-delà des considérations méthodologiques, notre étude confirme qu'une durée de vie des feuilles plus longue est associée à une résistance à la coupe plus élevée chez les espèces herbacées. De plus, nous avons montré que cette plus grande résistance à la coupe n'était pas uniquement liée à une teneur en fibres plus élevée, puisque certaines monocotylédones ont des durées de vie des feuilles plus courtes que les dicotylédones malgré leur plus grande teneur en fibres. Des composantes anatomiques, telles que l'épaisseur des feuilles ou l'orientation des tissus vasculaires peuvent probablement expliquer ce résultat. Curieusement, la corrélation entre la résistance à la coupe et la vitesse de photosynthèse par unité de masse est plus forte que celle avec la durée de vie des feuilles. Une analyse plus approfondie, notamment par le biais de modèles de pistes, serait nécessaire afin d'identifier clairement les liens de causalité entre traits biomécaniques, traits morpho-anatomiques et chimiques et traits du syndrome d'économie foliaire.

5 CONCLUSIONS

Notre étude est une des première à tester les relations entre la défense mécanique et les traits fondamentaux du syndrome d'économie foliaire pour des espèces herbacées. Nous avons montré que deux mesures communément utilisées pour estimer les propriétés structurelles des feuilles aboutissent à des résultats contrastés. Nos résultats suggèrent que la résistance à la coupe est un trait intégrateur, qui décrit à la fois les composantes anatomiques et la composition chimique de la feuille, alors que la force à l'étirement n'est corrélée qu'à la quantité de fibres contenue dans la feuille. Par conséquent, la résistance à la coupe apparaît

corrélée à la durée de vie des feuilles en association avec la masse surfacique foliaire, sans effet significatif de la forme de croissance ou du cycle de vie. D'autre part la force à l'étirement semble décrire de manière incomplète l'investissement dans la défense et n'est pas corrélée à la durée de vie des feuilles. L'analyse approfondie des relations de causalité entre les traits de défense et ceux du syndrome d'économie foliaire promet une meilleure compréhension des processus à l'origine du compromis entre acquisition et conservation des ressources.

6 RÉFÉRENCES

- Ang, K.Y., Lucas, P.W. & Tan, H.T.W. (2008) Novel way of measuring the fracture toughness of leaves and other thin films using a single inclined razor blade. *New Phytologist*, **177**, 830-837.
- Bumb, I., Garnier, E., Bastianelli, D., Richarte, J., Bonnal, L. & Kazakou, E. (2016) Influence of management regime and harvest date on the forage quality of rangelands plants: the importance of dry matter content. *AoB Plants*, **8**, plw045.
- Chabot, B.F. & Hicks, D.J. (1982) The ecology of leaf life spans. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **13**, 229-259.
- Chollet, S., Rambal, S., Fayolle, A., Hubert, D., Foulquié, D. & Garnier, E. (2014) Combined effects of climate, resource availability, and plant traits on biomass produced in a Mediterranean rangeland. *Ecology*, **95**, 737-748.
- Choong, M. (1996) What makes a leaf tough and how this affects the pattern of *Castanopsis fissa* leaf consumption by caterpillars. *Functional Ecology*, 668-674.
- Coley, P. (1988) Effects of plant growth rate and leaf lifetime on the amount and type of anti-herbivore defense. *Oecologia*, **74**, 531-536.
- Coley, P.D. (1983) Herbivory and defensive characteristics of tree species in a lowland tropical forest. *Ecological Monographs*, **53**, 209-234.
- Coley, P.D., Bryant, J.P. & Chapin, F.S. (1985) Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science*, **230**, 895-899.
- Cornelissen, J.H.C., Pérez-Harguindeguy, N., Díaz, S., Grime, J.P., Marzano, B., Cabido, M., Vendramini, F. & Cerabolini, B. (1999) Leaf structure and defence control litter decomposition rate across species and life forms in regional floras on two continents. *New Phytologist*, **143**, 191-200.
- Daget, P. (1977) Le bioclimat méditerranéen: analyse des formes climatiques par le système d'Emberger. *Vegetatio*, **34**, 87-103.
- Díaz, S., Hodgson, J.G., Thompson, K., Cabido, M., Cornelissen, J.H.C., Jalili, A., Montserrat-Martí, G., Grime, J.P., Zarrinkamar, F., Asri, Y., Band, S.R., Basconcelo, S., Castro-Díez, P., Funes, G., Hamzehee, B., Khoshnevi, M., Pérez-Harguindeguy, N., Pérez-Rontomé, M.C., Shirvany, F.A., Vendramini, F., Yazdani, S., Abbas-Azimi, R., Bogaard, A., Boustani, S., Charles, M., Dehghan, M., de Torres-Espuny, L., Falczuk, V., Guerrero-Campo, J., Hynd, A., Jones, G., Kowsary, E., Kazemi-Saeed, F., Maestro-Martínez, M., Romo-Díez, A., Shaw, S., Siavash, B., Villar-Salvador, P. & Zak, M.R. (2004) The plant traits that drive ecosystems: Evidence from three continents. *Journal of Vegetation Science*, **15**, 295-304.
- Díaz, S., Kattge, J., Cornelissen, J.H.C., Wright, I.J., Lavorel, S., Dray, S., Reu, B., Kleyer, M., Wirth, C., Colin Prentice, I., Garnier, E., Bönsch, G., Westoby, M., Poorter, H., Reich, P.B., Moles, A.T., Dickie, J., Gillison, A.N., Zanne, A.E., Chave, J., Joseph Wright, S., Sheremet'ev, S.N., Jactel, H., Baraloto, C., Cerabolini, B., Pierce, S., Shipley, B., Kirkup, D., Casanoves, F., Joswig, J.S., Günther, A., Falczuk, V., Rüger, N., Mahecha, M.D. & Gorné, L.D. (2016) The global spectrum of plant form and function. *Nature*, **529**, 167-171.
- Edwards, C., Read, J. & Sanson, G. (2000) Characterising sclerophylly: some mechanical properties of leaves from heath and forest. *Oecologia*, **123**, 158-167.

- Enrico, L., Díaz, S., Westoby, M. & Rice, B.L. (2015) Leaf mechanical resistance in plant trait databases: comparing the results of two common measurement methods. *Annals of botany*, **117**, 209-214.
- Feeny, P. (1976) Plant apparency and chemical defense. *Biochemical interaction between plants and insects*, pp. 1-40. Springer.
- Kitajima, K., Llorens, A.M., Stefanescu, C., Timchenko, M.V., Lucas, P.W. & Wright, S.J. (2012) How cellulose-based leaf toughness and lamina density contribute to long leaf lifespans of shade-tolerant species. *New Phytologist*, **195**, 640-652.
- Kitajima, K. & Poorter, L. (2010) Tissue-level leaf toughness, but not lamina thickness, predicts sapling leaf lifespan and shade tolerance of tropical tree species. *New Phytologist*, **186**, 708-721.
- Loranger, J., Meyer, S.T., Shipley, B., Kattge, J., Loranger, H., Roscher, C. & Weisser, W.W. (2012) Predicting invertebrate herbivory from plant traits: evidence from 51 grassland species in experimental monocultures. *Ecology*, **93**, 2674-2682.
- Onoda, Y., Westoby, M., Adler, P.B., Choong, A.M.F., Clissold, F.J., Cornelissen, J.H.C., Díaz, S., Dominy, N.J., Elgart, A., Enrico, L., Fine, P.V.A., Howard, J.J., Jalili, A., Kitajima, K., Kurokawa, H., McArthur, C., Lucas, P.W., Markesteijn, L., Pérez-Harguindeguy, N., Poorter, L., Richards, L., Santiago, L.S., Sosinski, E.E., Van Bael, S.A., Warton, D.I., Wright, I.J., Joseph Wright, S. & Yamashita, N. (2011) Global patterns of leaf mechanical properties. *Ecology Letters*, **14**, 301-312.
- Pérez-Harguindeguy, N., Díaz, S., Cornelissen, J., Vendramini, F., Cabido, M. & Castellanos, A. (2000) Chemistry and toughness predict leaf litter decomposition rates over a wide spectrum of functional types and taxa in central Argentina. *Plant and Soil*, **218**, 21-30.
- Pérez-Harguindeguy, N., Díaz, S., Garnier, E., Lavorel, S., Poorter, H., Jaureguiberry, P., Bret-Harte, M., Cornwell, W., Craine, J. & Gurvich, D. (2013) New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany*.
- Pérez-Harguindeguy, N., Díaz, S., Vendramini, F., Cornelissen, J.H.C., Gurvich, D.E. & Cabido, M. (2003) Leaf traits and herbivore selection in the field and in cafeteria experiments. *Austral Ecology*, **28**, 642-650.
- Read, J. & Sanson, G.D. (2003) Characterizing sclerophylly: the mechanical properties of a diverse range of leaf types. *New Phytologist*, **160**, 81-99.
- Reich, P., Uhl, C., Walters, M. & Ellsworth, D. (1991) Leaf lifespan as a determinant of leaf structure and function among 23 Amazonian tree species. *Oecologia*, **86**, 16-24.
- Reich, P.B. (2014) The world-wide 'fast-slow' plant economics spectrum: a traits manifesto. *Journal of Ecology*, **102**, 275-301.
- Sanson, G., Read, J., Aranwela, N., Clissold, F. & Peeters, P. (2001) Measurement of leaf biomechanical properties in studies of herbivory: opportunities, problems and procedures. *Austral Ecology*, **26**, 535-546.
- Schuldt, A., Bruehlheide, H., Durka, W., Eichenberg, D., Fischer, M., Kröber, W., Härdtle, W., Ma, K., Michalski, S.G. & Palm, W.U. (2012) Plant traits affecting herbivory on tree recruits in highly diverse subtropical forests. *Ecology Letters*, **15**, 732-739.
- Van Soest, P.v., Robertson, J. & Lewis, B. (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of dairy science*, **74**, 3583-3597.
- Vile, D., Garnier, E., Shipley, B., Laurent, G., Navas, M.-L., Roumet, C., Lavorel, S., Diaz, S., Hodgson, J.G. & Lloret, F. (2005) Specific leaf area and dry matter content estimate thickness in laminar leaves. *Annals of botany*, **96**, 1129-1136.
- Warton, D.I., Duursma, R.A., Falster, D.S. & Taskinen, S. (2012) smatr 3—an R package for estimation and inference about allometric lines. *Methods in Ecology and Evolution*, **3**, 257-259.
- Westbrook, J.W., Kitajima, K., Burleigh, J.G., Kress, W.J., Erickson, D.L. & Wright, S.J. (2011) What makes a leaf tough? Patterns of correlated evolution between leaf toughness traits and demographic rates among 197 shade-tolerant woody species in a Neotropical forest. *The American Naturalist*, **177**, 800-811.

- Westoby, M., Falster, D.S., Moles, A.T., Vesk, P.A. & Wright, I.J. (2002) Plant ecological strategies: some leading dimensions of variation between species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **33**, 125-159.
- Wright, I.J. & Cannon, K. (2001) Relationships between leaf lifespan and structural defences in a low-nutrient, sclerophyll flora. *Functional Ecology*, **15**, 351-359.
- Wright, I.J., Reich, P.B., Westoby, M., Ackerly, D.D., Baruch, Z., Bongers, F., Cavender-Bares, J., Chapin, T., Cornelissen, J.H.C., Diemer, M., Flexas, J., Garnier, E., Groom, P.K., Gulias, J., Hikosaka, K., Lamont, B.B., Lee, T., Lee, W., Lusk, C., Midgley, J.J., Navas, M.-L., Niinemets, U., Oleksyn, J., Osada, N., Poorter, H., Poot, P., Prior, L., Pyankov, V.I., Roumet, C., Thomas, S.C., Tjoelker, M.G., Veneklaas, E.J. & Villar, R. (2004) The worldwide leaf economics spectrum. *Nature*, **428**, 821-827.
- Züst, T. & Agrawal, A.A. (2017) Trade-offs between plant growth and defense against insect herbivory: an emerging mechanistic synthesis. *Annual review of plant biology*, **68**, 513-534.

Chapitre 6

Synthèse et discussion générale

1. LA PHÉNOLOGIE

Chez les espèces herbacées de climats saisonniers, le cadre conceptuel le plus fréquemment utilisé pour étudier la coordination entre phases phénologiques est celui du compromis « time-size » (Primack 1987; Bolmgren & Cowan 2008). Il prédit, d'une part, qu'un passage à la reproduction précoce permet peu de temps pour la croissance maternelle, ayant pour conséquence une petite taille et une faible accumulation de ressources au moment de la reproduction. D'autre part, une reproduction tardive permet une croissance végétative plus longue et une plus grande accumulation des ressources, mais impose une reproduction courte afin de terminer le cycle avant le début de la mauvaise saison. Ainsi, le compromis « time-size » propose à la fois une coordination entre les phases phénologiques (relation entre le début de la reproduction et sa durée) mais également une coordination entre la phénologie et d'autres caractéristiques de la plante (taille à la reproduction, biomasse allouée à la reproduction, etc...). Les travaux menés pendant la thèse permettent de tester en partie chacune de ces composantes dans le contexte méditerranéen. Dans un premier temps, nous discuterons de la composante phénologique du compromis « time-size » et de son implication dans la construction d'un axe de variation fonctionnel décrivant la phénologie des plantes. Puis, nous discuterons des relations entre la phénologie et les autres axes de variation fonctionnelle couramment utilisés dans les études comparatives, afin de tester une partie des hypothèses du compromis « time-size ».

1.1 La phénologie comme axe de variation fonctionnelle

L'application du concept d'axe de variation à la phénologie nécessite de caractériser le programme développemental des espèces par des marqueurs fonctionnels et de tester leur coordination. Plusieurs stades de développement ont été sélectionnés, notamment dans le but de tester les hypothèses du compromis « time-size » et d'identifier des syndromes de traits qui covarient. La mise en évidence de ces syndromes permettrait de définir un, ou plusieurs axes de variation que l'on peut intégrer dans la caractérisation du phénotype des plantes.

1.1.1 Reconsidérer le compromis « time-size » en Méditerranée...

Le compromis « time-size » stipule – en ce qui concerne la phénologie – que dans des climats saisonniers, le temps disponible pour la reproduction dépend du moment auquel elle est initiée : des floraisons précoces imposent peu de contrainte temporelle sur la période reproductive alors que des floraisons tardives devraient être associées à des périodes reproductives courtes pour terminer le cycle de développement avant le début des conditions

défavorables. Dans ce cas, on s'attend à une relation triangulaire entre la date de début de floraison et la période reproductive des espèces : les espèces à floraison précoce auraient des périodes reproductives courtes ou longues alors que les espèces à floraison tardive auraient uniquement des périodes reproductives courtes.

Dans le contexte méditerranéen, la reproduction des espèces est bimodale (printemps et automne), correspondant aux deux périodes favorables au développement des plantes (Thompson 2005). Cependant, nos analyses se sont concentrées sur la période de printemps puisque la grande majorité des espèces fleurissent après les gelées tardives de l'hiver et avant le déficit hydrique estival (voir chapitre 2 et Thompson 2005). Dans le chapitre 2, nous avons montré que la floraison de 138 espèces semble être contrainte aux périodes hors gel et avant la période de déficit hydrique. L'initiation de la floraison apparaît donc comme un stade particulièrement sensible au gel et à la sécheresse. L'application des hypothèses du compromis « time-size » à notre système d'étude devrait donc se traduire par un raccourcissement de la période reproductive pour les espèces à floraison tardive, reflétant un échappement de la période de sécheresse pendant la reproduction. Cependant, les résultats du chapitre 3, obtenus chez une vingtaine d'espèces cultivées en conditions contrôlées, ne montrent aucune relation entre la date de floraison et la période reproductive. De plus, les trois espèces qui fleurissent le plus tard présentent les plus longues périodes reproductives du jeu de données, ne permettant pas de confirmer le compromis « time-size » pour ces espèces.

La durée de la reproduction dépend (1) de la période pendant laquelle les graines sont initiées et (2) du temps nécessaire à la production d'une graine. Autrement dit, la période reproductive peut être décomposée en une somme de la période de floraison et de la période de maturation d'une graine (*cf.* Fig.1c du chapitre 3). L'étude des relations entre la date de floraison et chacune de ces composantes permet une meilleure compréhension des caractéristiques phénologiques des plantes. Nous avons montré :

- (a) une relation positive entre la date floraison et la période de floraison chez les espèces dicotylédones cultivées en conditions contrôlées (chapitre 3). Nous n'avons donc pas détecté de sélection pour des périodes de floraison courtes en fin de saison.
- (b) que la date de floraison est positivement corrélée à la période de maturation d'une graine chez 138 espèces (chapitre 2). Bien que cette relation soit faible et qu'elle n'ait pas été trouvée sur un nombre limité d'espèces en conditions contrôlées (chapitre 3),

cela suggère qu'il n'existe pas de contrainte forte pour une maturation des graines rapide à l'approche de la période de déficit hydrique.

La période de déficit hydrique estival semble donc contraindre l'initiation de la floraison mais pas la durée de la reproduction (certaines espèces subissent un déficit hydrique intense pendant la maturation de leurs graines). Ces résultats peuvent être mis en relation avec les différentes stratégies de résistance à la sécheresse (voir section 1.1 du chapitre 1, Volaire 2018) et permettent de reconsidérer le compromis « time-size » en méditerranée. En effet, ce compromis suppose uniquement un échappement (de l'anglais « escape ») du déficit hydrique et ne prend pas en compte la possibilité d'un évitement (de l'anglais « avoidance ») ou d'une tolérance (de l'anglais « tolerance ») des conditions défavorables pendant la reproduction. Or, au moins deux stratégies de résistance à la sécheresse pendant la reproduction semblent coexister dans le système méditerranéen : (1) les espèces annuelles ont des périodes de maturation d'une graine courtes permettant d'échapper aux périodes de déficit hydrique intense, et (2) les espèces pérennes maintiennent le développement des graines pendant le déficit hydrique, suggérant des processus d'évitement de la déshydratation (voir aussi Navas *et al.* 2010).

Nous avons exposé une limite du concept du compromis « time-size », puisqu'il considère que toutes les espèces doivent échapper aux conditions défavorables pendant la reproduction via un raccourcissement de la période reproductive en fin de saison, sans envisager la possibilité de stratégies d'évitement ou de tolérance. La généralisation de ces résultats nécessite cependant quelques précautions. Des cas d'évitement ou de tolérance ont été largement étudiés dans le cadre de la résistance à la sécheresse, mais l'adaptation de ce raisonnement à d'autres contextes climatiques n'est pas immédiate. Par exemple, on trouve une relation négative entre la date de floraison et la période de floraison dans des prairies alpines (Jia *et al.* 2011) et dans écosystèmes semi-arides de l'Arizona (Laughlin *et al.* 2010) suggérant une validation du compromis « time-size » dans ces environnements.

1.1.2 ...vers un syndrome « fast-slow » de la phénologie?

La composante phénologique du compromis « time-size » n'est donc pas vérifiée dans le contexte méditerranéen. Cependant, plusieurs corrélations observées dans notre étude et dans la littérature suggèrent d'autres niveaux de contrainte sur la phénologie.

Premièrement, nous avons montré en conditions contrôlées que l'écart entre la courbe de production de fleurs d'un individu et celle de la dispersion de ses graines est constant (chapitre 3) suggérant que les graines se développent à des rythmes similaires tout au long de la période reproductive. Une confirmation de ce résultat nécessiterait le suivi du devenir de chaque fleur individuellement comme l'ont fait Heydel and Tackenberg (2017). Si ce résultat se confirme en conditions naturelles, cela implique une forte coordination entre la floraison et la dispersion des graines. La réponse de ces stades phénologiques aux contraintes environnementales ne peut donc pas être analysée pour chaque stade indépendamment mais doit considérer le cycle de vie dans sa globalité. Ainsi, la dispersion des graines n'est pas simplement le résultat d'une sélection liée à la présence d'agents de dispersion, ou pour relâcher les graines à la meilleure période pour la germination, mais dépend également d'un ensemble complexe de contraintes sur la floraison et sur le temps de maturation des graines.

Afin de décrire plusieurs étapes clés du programme développemental des espèces, nous avons utilisé (1) le phyllochrone, pour décrire le rythme de développement végétatif, (2) la date de début de floraison pour décrire le passage à la reproduction et (3) la période de la floraison et la période de maturation d'une graine pour décrire la durée de la reproduction. Plusieurs corrélations ont été mises en évidence entre ces caractéristiques. Premièrement, nous avons montré que la date de floraison est corrélée positivement au phyllochrone, essentiellement chez les dicotylédones (chapitre 3), faisant écho aux travaux de Sun and Frelich (2011) qui montrent une relations négative entre la date de floraison et la vitesse de croissance en hauteur. De plus, et en accord avec d'autres études en Méditerranée (Herrera 1986; Petanidou *et al.* 1995), nous avons trouvé une relation positive entre la date de floraison et la durée de la floraison pour ces espèces (chapitre 3). Enfin, nous avons montré que la date de floraison est positivement corrélée à la période de maturation d'une graine pour 138 espèces (chapitre 2). Ces résultats suggèrent l'existence d'un syndrome phénologique « fast-slow » discriminant les espèces selon leur rythme de développement. Nos travaux proposent donc d'étendre le continuum « fast-slow » identifié pour le fonctionnement végétatif des plantes (Reich 2014) à la phénologie végétative et reproductive. Ainsi, les espèces pourraient être décrites selon un axe allant (1) d'espèces au développement végétatif rapide, associé - chez les espèces herbacées - à une floraison précoce et courte et une maturation des graines rapides, à (2) des espèces au développement végétatif plus lent, associé à des floraisons tardives et longues et une production de graines plus lente. L'intégration des stratégies de résistance à la sécheresse à ce raisonnement reste cohérente. En effet, les espèces à développement lent dans le

continuum « fast-slow » du fonctionnement végétatif (Reich 2014) sont généralement associées à des caractéristiques permettant l'évitement ou la tolérance à la déshydratation, contrairement aux espèces au développement rapide qui sont généralement associées à des stratégies d'échappement. Les résultats obtenus dans le chapitre 4 confirment en partie cette hypothèse en montrant une relation entre le maintien du développement des graines pendant la période de sécheresse (évitement) et des masses surfaciques foliaires et teneurs en matière sèche des feuilles élevées, associées aux espèces dites « slow » (Reich 2014).

L'ensemble de ces résultats est uniquement valable dans le cas d'espèces ayant une séquence phénologique « classique », où la reproduction intervient après une période de croissance végétative et dépend des ressources accumulées la même année. Bien que cela soit considéré comme étant la stratégie dominante chez les espèces herbacées non géophytes - annuelles ou pérennes - (Grainger 1939), il existe de nombreux exemples de séquences alternatives chez les ligneux. Par exemple, certains arbres décidus fleurissent avant le débourrement des feuilles et, chez certaines espèces comme *Vitis vinifera*, l'initiation des bourgeons floraux se produit plusieurs années avant le développement des inflorescences. Ainsi, nos résultats dépendent fortement du type d'espèces considéré et ne peuvent certainement pas s'appliquer à toutes les formes de croissances.

1.2 La phénologie dans l'espace phénotypique des plantes

1.2.1 Relations avec la stature

Comme mentionné précédemment, le compromis « time-size » tel que formulé par Bolmgren and Cowan (2008) ne se limite pas aux coordinations entre les phases phénologiques. Il décrit également des connexions potentielles entre la phénologie et d'autres aspects du fonctionnement des plantes. Chez les plantes herbacées, il prédit notamment qu'une floraison précoce implique peu de temps pour la croissance maternelle, ayant pour conséquence une petite taille au moment de la reproduction, contrairement à celles qui fleurissent tard et peuvent croître plus longtemps. La relation entre la date de floraison et la hauteur reproductive trouvée dans notre étude, ainsi que dans plusieurs autres (voir Tableau 1 du chapitre 4), semble confirmer cette hypothèse. Cependant, les différences de hauteur entre espèces ne peuvent clairement pas être expliquées uniquement par le temps de développement végétatif puisqu'elle est le résultat de nombreuses composantes incluant des processus physiologiques, d'allocation et d'architecture. Une compréhension plus mécanistique des processus à l'origine de cette relation nécessiterait donc une étude approfondie des processus

de croissance. Parmi les traits à intégrer dans le raisonnement on peut mentionner la vitesse de croissance relative (relative growth rate, RGR), qui est connue pour être particulièrement variable entre espèces (Grime & Hunt 1975; Garnier 1991; Lambers & Poorter 1992; Poorter & Van der Werf 1998). Ainsi, à toutes autres caractéristiques égales, des espèces ayant des RGR différentes peuvent atteindre des hauteurs reproductives différentes pour une même période de croissance. De même, la mesure des biomasses aériennes et souterraines au cours du développement permettrait de tester les relations entre la croissance en biomasse, l'allocation entre les différents organes et la croissance en hauteur des plantes.

1.2.2 Relations avec les capacités de reproduction

L'axe de capacité de reproduction est généralement caractérisé par la masse d'une graine (Westoby 1998). Celle-ci est en effet impliquée dans la performance des plantules à la germination et conditionne le taux de survie juvénile (Moles & Westoby 2004). Plusieurs auteurs ont proposé que le temps de maturation d'une graine conditionne sa masse à la maturité (Moles & Westoby 2003; Heydel & Tackenberg 2017) connectant ainsi la phénologie de la reproduction à la performance des plantes au stade juvénile. Nous avons montré que cette relation n'est vérifiée que pour les espèces annuelles (chapitre 4) ne permettant pas de généraliser cette hypothèse à toutes les formes de croissance. Un raisonnement similaire à celui décrit pour la croissance végétative peut s'appliquer au développement des graines : les différences de masse de graines à la maturité ne peuvent pas être expliquées uniquement par leur temps de développement. En effet, des différences de composition chimique ou la production de structures externes (pulpe, pappus, ailettes, etc..) peuvent mener à des taux de remplissage des graines différents entre espèces. Ainsi, la masse de la graine à maturité peut varier pour un même temps de maturation. La connexion entre la phénologie et l'axe de capacité de reproduction apparaît plus indirecte, faisant intervenir des processus du développement des graines, encore mal connus à une échelle interspécifique.

D'autre part, la production annuelle de biomasse reproductrice est un trait fondamental dans la compréhension de la performance des plantes dans leur milieu. Cependant, les traits majoritairement utilisés pour décrire les capacités de reproduction des espèces ne permettent pas une bonne estimation de cette caractéristique. Or, certains auteurs ont proposé que la phénologie de la reproduction, et en particulier la date de floraison, peut avoir un impact sur la biomasse reproductrice totale annuelle chez les herbacées (Bolmgren & Cowan 2008) : les espèces à floraison précoce ont peu de temps pour croître, limitant la quantité de ressources

disponible pour la reproduction. L'étude des relations entre la phénologie, les processus d'accumulation des ressources et de leur allocation - notamment vers la reproduction - apparaît donc comme une perspective de recherche prometteuse montrant l'intérêt d'intégrer des traits phénologiques dans la caractérisation du phénotype des plantes.

1.2.3 Relations avec le fonctionnement de la feuille

La connexion entre la phénologie et le syndrome d'économie foliaire (LES) est indirecte et on trouve généralement peu de relations entre les traits de ces dimensions (voir Tableau 1 du chapitre 4). Notre étude confirme cette observation puisque seule la relation entre la date de dispersion et la MSF est significative. Les hypothèses de connexion entre la phénologie et l'économie du carbone et des nutriments passent par des processus de croissance et par les rythmes de développement. On associe généralement - bien que cela ait été peu montré expérimentalement - les plantes ayant des feuilles acquisitives (caractérisées par une vitesse de photosynthèse élevée et turn-over des feuilles rapide) à une croissance et un développement rapide. Or, selon le continuum « fast-slow » de la phénologie proposé dans cette étude, une croissance et un développement rapide ont pour conséquence une phénologie précoce. Les processus à l'œuvre sont complexes et les traits utilisés, bien que robustes pour étudier des patrons de corrélation grossiers, ne permettent pas une description détaillée de la physiologie et du programme développemental des espèces. On ne peut donc pas connecter facilement les stratégies phénologiques aux stratégies de gestion du carbone et des nutriments au niveau foliaire.

Cependant, nous avons montré que le déficit hydrique pendant la maturation des graines (SWD_{SMP}) est corrélé à la masse surfacique foliaire (MSF) et la teneur en matière sèche des feuilles (TMSF) (chapitre 4). Nous avons fait l'hypothèse que le SWD_{SMP} est un marqueur de la capacité des espèces à produire des graines pendant une période de déficit hydrique. Cette relation peut donc être interprétée comme une connexion entre la phénologie et les stratégies de gestion de l'eau par la plante, suggérant une coordination entre la gestion de l'eau au niveau des parties reproductives et des feuilles. Cependant, le SWD_{SMP} ne correspond pas à la définition stricte d'un trait *sensu* Violle *et al.* (2007) puisqu'il intègre une composante de l'environnement pendant un stade de développement. Une véritable caractérisation de la capacité d'évitement de la déshydratation implique la mise en place d'expérimentations en chambres de culture afin de produire des courbes de réponse de la production de graines à une gamme de déficit hydrique. De même, la MSF et la TMSF sont des traits indirectement liés à

la gestion de l'eau par les feuilles et on trouve une faible relation avec le ratio isotopique $^{13}\text{C} : ^{12}\text{C}$ (chapitre 4), qui est un marqueur de l'efficacité de l'utilisation de l'eau par les feuilles (voir Annexe 1). D'autres mesures comme la conductance stomatique, ou des mesures de potentiel hydrique et de résistance à la cavitation permettrait une meilleure description de cette dimension.

Un cadre conceptuel récent, basé sur la gestion du transport de l'eau dans la plante, décrit les stratégies d'évitement ou de tolérance à la sécheresse par un compromis entre (1) les pertes en eau et (2) l'assimilation du carbone pendant les périodes de déficit hydrique (Sack *et al.* 2016). L'évitement consiste au maintien du potentiel hydrique de la plante via la réduction de la conductance stomatique ayant pour conséquence une limitation des échanges gazeux. La tolérance, elle, consiste en une tolérance à la diminution du potentiel hydrique dans la plante via des mécanismes de résistance à la cavitation, permettant de maintenir les échanges gazeux. Notre étude propose qu'il existe une coordination entre le fonctionnement hydrique des parties végétatives et celui des parties reproductives. L'intégration du fonctionnement des parties reproductives dans ce cadre conceptuel apparaît donc comme une piste de recherche à approfondir pour l'avenir.

2 LA DÉFENSE ET LE SYNDROME D'ÉCONOMIE FOLIAIRE

Le syndrome d'économie foliaire est un ensemble de traits des feuilles qui décrit les stratégies de gestion des ressources. Il est généralement appréhendé par la durée de vie de la feuille, la vitesse de photosynthèse maximale, la vitesse de la respiration, la teneur en azote et en phosphore des feuilles et la MSF (Wright *et al.* 2004). Les corrélations entre ces traits correspondent à un compromis entre l'activité métabolique de la feuille et sa longévité, ayant un effet sur la vitesse d'acquisition des ressources et leur conservation. La défense mécanique est souvent considérée comme centrale dans la compréhension du compromis « acquisition-conservation », en impactant directement la durée de vie des feuilles, mais peu d'études l'ont testé de manière explicite (Reich *et al.* 1991; Wright & Cannon 2001; Wright & Westoby 2002). Nous discutons ici des relations entre la défense mécanique et la durée de vie des feuilles (marqueur de la conservation des ressources) mais également la vitesse de photosynthèse (marqueur de l'acquisition des ressources) qui n'a jamais été testée à notre connaissance.

2.1 La défense mécanique et la durée de vie des feuilles

La longévité des feuilles est une caractéristique fondamentale du fonctionnement de la plante. Elle définit, avec la capacité photosynthétique, la quantité totale d'énergie acquise par la feuille pour le fonctionnement de l'organisme. La durée de vie des feuilles est extrêmement variable entre espèces (d'une trentaine de jours chez des annuelles à plusieurs dizaines d'année chez des arbres sempervirents, Reich *et al.* 1999; Wright *et al.* 2004) reflétant des stratégies de gestion des ressources différentes. Elle est généralement interprétée comme le résultat de l'optimisation du bilan de carbone et des nutriments dans la feuille (Mooney & Gulmon 1982; Berendse & Aerts 1987; Kikuzawa & Ackerly 1999; Westoby *et al.* 2002). En effet, la vitesse d'acquisition du carbone par la feuille décroît avec l'âge en association avec des coûts d'entretien des tissus qui augmentent. Le déclenchement de sénescence de la feuille intervient lorsqu'elle n'est plus rentable et peut être prédit par la pente de la décroissance de la vitesse de photosynthèse en fonction de l'âge de la feuille (Kikuzawa & Ackerly 1999). D'autre part, dans des environnements à faible disponibilité en ressources, il est avantageux d'avoir des feuilles longévives afin d'optimiser les temps de résidence des nutriments dans la feuille et de maximiser sa compétitivité (Berendse & Aerts 1987).

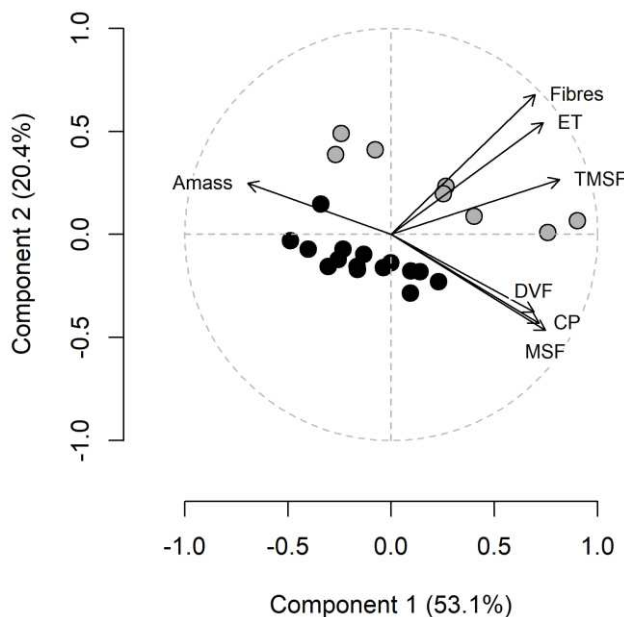


FIGURE 1 | Premier plan d'une analyse en composantes principales réalisée sur les 23 espèces du chapitre 5 à partir de traits du syndrome d'économie foliaire (Amass : vitesse de photosynthèse maximale par unité de masse, DVF : durée de vie des feuilles, MSF : masse surfacique foliaire), de traits de composition de la feuille (TMSF : teneur en matière sèche, Fibres : fibres totales) et de traits biomécaniques (CP : résistance à la coupe, ET : force à l'étirement). Les points noirs représentent les dicotylédones et les points gris les monocotylédones

La production de feuilles longévives impose un investissement dans leur protection contre les attaques biotiques et abiotiques (Chabot & Hicks 1982; Reich *et al.* 1991). D'un point de vue anatomique, cela se traduit par des feuilles plus épaisses et plus denses permettant de les rendre plus robustes contre les agressions extérieures (voir chapitre 5 et Wright & Cannon 2001; Onoda *et al.* 2011). Aussi, la production de composés secondaires permet une défense

chimique constitutionnelle ou induite contre les herbivores (Briske 1996). Nous nous sommes concentrés dans cette étude sur les relations entre les composantes anatomiques et biomécaniques des feuilles et leur longévité.

Une forte résistance à la coupe est le résultat d'une augmentation de l'épaisseur et de la densité des feuilles (chapitre 5). Nous avons montré que la résistance à la coupe et la MSF sont corrélées à la durée de vie des feuilles (Fig. 1 et chapitre 5). Notre jeu de données est l'un des premiers à présenter ces résultats pour des espèces herbacées et généralise les relations trouvées chez les arbres (Reich *et al.* 1991; Wright & Cannon 2001; Wright & Westoby 2002). D'autre part, nous avons montré que la force à l'étirement est corrélée aux teneurs en matière sèche et en fibres des feuilles (Fig. 1). Cependant, l'analyse en composantes principales (Fig. 1) montre que ces traits sont indépendants de l'axe formé par la résistance à la coupe, la MSF et la durée de vie des feuilles. Ce résultat est essentiellement lié aux différences entre monocotylédones et dicotylédones car malgré des teneurs en fibres plus élevées, les monocotylédones n'ont pas des durées de vie des feuilles plus longues que les dicotylédones (chapitre 5). L'analyse multivariée de ces relations pour chaque groupe d'espèces indépendamment est limitée par le nombre d'espèces étudiées (seulement huit espèces de monocotylédones pour sept traits). Cependant, les analyses des relations deux à deux suggèrent que ces traits deviennent corrélés au sein de chaque groupe d'espèces (chapitre 5).

La résistance à la coupe et la force à l'étirement reflètent donc des propriétés mécaniques des feuilles différentes, et les facteurs à leur origine restent incertains. Nos résultats suggèrent que la résistance à la coupe est un meilleur marqueur de l'investissement dans la défense mécanique des feuilles puisque sa signification écologique reste cohérente entre différents groupes d'espèces. Enrico *et al.* (2015) montrent que la résistance à la coupe et la force à l'étirement sont corrélées pour 72 espèces australiennes. Ils proposent une série d'équations permettant de prédire l'une à partir de l'autre dans le but de combiner les mesures réalisées dans plusieurs études comparatives indépendantes. Ils mentionnent le fait que la prise en compte du système de nervation permet obtenir de meilleures prédictions, faisant écho aux différences trouvées entre les monocotylédones et les dicotylédones dans notre étude. Cependant nos résultats nous font reconsidérer cette proposition et suggère que ces mesures ne peuvent pas être utilisées de manière similaire tant que leurs facteurs à l'origine de leur variation n'ont pas été clairement identifiés. Pour cela, une étude des rôles relatifs de l'épaisseur, de la densité, du système de nervation et des proportions des différents types de

fibres (cellulose, hémicellulose, lignine) doit être menées sur une large gamme d'espèces représentant une grande diversité phénotypique de feuilles.

2.2 La défense et la photosynthèse

Nous avons également montré - pour la première fois à notre connaissance – une forte relation négative entre la résistance à la coupe et la vitesse de photosynthèse par unité de masse (Fig. 1 et chapitre 5). Ce résultat est cohérent avec l'hypothèse que l'augmentation de l'épaisseur de la feuille provoque une diminution de la transmission de la lumière vers les cellules du parenchyme et que l'augmentation de la densité (via des parois cellulaires plus épaisses) diminue le volume intracellulaire et par conséquent la quantité de protéines photosynthétiques par unité de biomasse (Shipley *et al.* 2006). Nos résultats semblent donc confirmer l'effet de la défense mécanique sur les traits liés à l'acquisition des ressources et suggèrent son rôle central dans le compromis « croissance-défense ». Une analyse des pistes serait envisageable pour tester de manière plus formelle la position centrale de la défense mécanique dans l'explication du syndrome d'économie foliaire.

On ne s'attend pas à ce que toutes les formes de défense aient un effet sur la vitesse d'acquisition des ressources. En effet, la défense chimique permettrait une plus longue durée de vie sans modifier la structure anatomique des feuilles et des cellules. Il n'y a donc aucune raison évidente justifiant un effet de ce type de défense sur la capacité photosynthétique des feuilles. Aucune étude à notre connaissance n'a testé cette hypothèse, qui propose un découplage potentiel entre la conservation des ressources et la vitesse de photosynthèse via la défense chimique. Cette hypothèse apparaît comme une perspective de recherche importante pour mieux appréhender les processus à l'origine du syndrome d'économie foliaire.

2.3 Le compromis croissance-défense et le syndrome d'économie foliaire

La défense est souvent étudiée à travers le concept du compromis entre la croissance et la défense (Chabot & Hicks 1982; Coley 1988; Fine *et al.* 2006). Il se base sur le fait que la mise en place de mécanismes de défense représente un coût énergétique pour la plante et diminue la quantité de ressources disponibles pour la croissance végétative et reproductive (Coley, Bryant & Chapin 1985). Il existe une connexion évidente entre ce concept et celui du syndrome d'économie foliaire (Onoda *et al.* 2011) puisque la défense, notamment mécanique, est au centre de ces deux concepts. Cependant, la manière dont ils s'articulent reste mal connue.

Le compromis croissance-défense est un compromis d'allocation des ressources dans différentes fonctions de la plante (Fig. 2). Il est optimisée selon les conditions du milieu : la disponibilité en ressources minérales est notamment connue pour affecter les patrons d'allocation à la défense (Bazzaz *et al.* 1987; Hahn & Maron 2016) avec un investissement plus important dans la défense dans les milieux pauvres et des stratégies de tolérance à l'herbivorie dans les milieux riches (Boege & Marquis 2005). Comme mentionné précédemment, un investissement dans la défense (boîte « Defense » dans le Fig. 2) a un impact sur les propriétés des feuilles, faisant la connexion entre ce concept d'allocation des ressources et le syndrome d'économie foliaire.

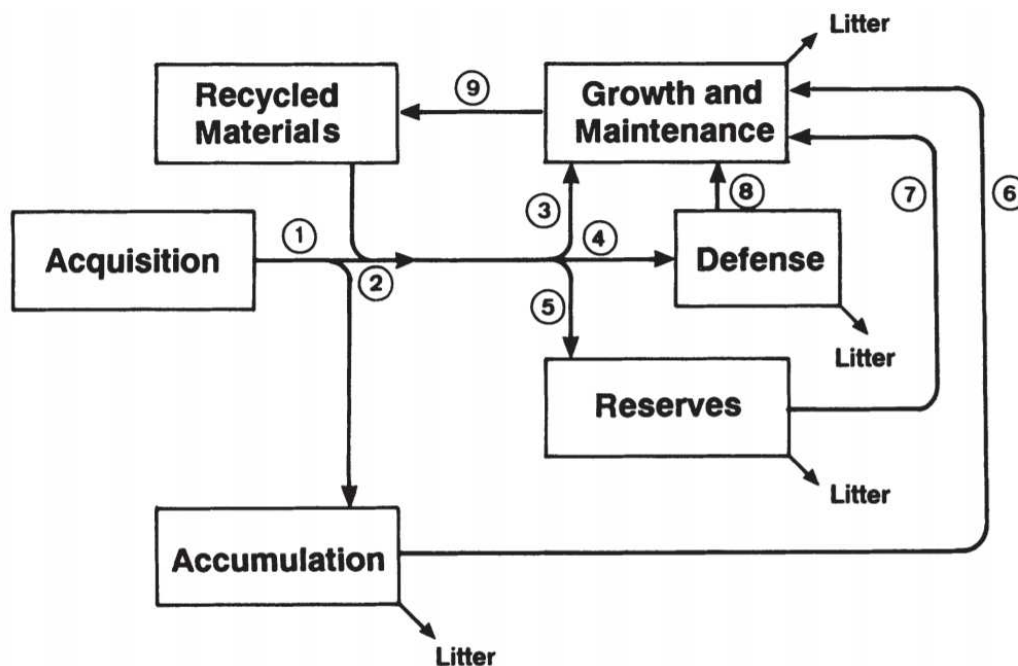


FIGURE 2 | Relations entre les pools (boîtes) et les flux (flèches numérotées) de ressources. L'accumulation a lieu quand l'acquisition est supérieure aux ressources utilisées pour la croissance, la défense et les réserves (flux 1 > flux 2). Les composés accumulés peuvent être perdus ou peuvent contribuer à une croissance future (flux 6). Les réserves sont formées au moment de l'allocation des ressources entre la croissance, défense ou le stockage (flux 2 = flux 3 + flux 4 + flux 5). L'allocation aux réserves (flux 5), à la croissance (flux 3) et à la défense (flux 4) sont donc en compétition. Les composés accumulés, les réserves et la défense peuvent alimenter la croissance (flux 6, 7 et 8). Le recyclage implique la dégradation des composés de la croissance pour former un pool de matériaux recyclés qui alimente la croissance (flux 9). Voir Chapin III, Schulze and Mooney (1990) pour plus de détails.

Cependant, les traits du syndrome d'économie foliaire peuvent être utilisés pour prédire l'acquisition des ressources par la feuille. Il définit, avec le nombre de feuilles, le pool de ressources acquises à la base des processus d'allocation (boîte « Acquisition » dans la Fig. 2). Il existe donc des relations complexes, d'interactions mutuelles entre ces deux concepts.

L'analyse des relations entre des traits d'allocation des ressources (ratio de biomasse entre les feuilles et les tiges ou entre les parties aériennes et souterraines), des mesures de croissance en biomasse et les traits du syndrome d'économie foliaire permettrait de tester de manière plus formelle la façon dont ces deux concepts s'articulent.

3 APPORT DE LA PHÉNOLOGIE ET DE LA DÉFENSE DANS L'ESPACE PHÉNOTYPIQUE DES PLANTES

La publication récente du spectre global de forme et fonction des plantes (Díaz *et al.* 2016) a permis de caractériser un espace phénotypique basé sur la mesure de six traits pour plus de 2 200 espèces de plantes réparties sur l'ensemble des biomes de la planète. Dans cette étude, plus de 70% de la variation des valeurs de traits entre espèces est capturé par un espace à deux dimensions, suggérant de fortes contraintes sur le phénotype. L'objectif majeur de notre étude est de tester l'apport de la phénologie et de la défense dans l'estimation du nombre de dimensions du phénotype. Nous avons montré dans les chapitre 3 et 5 qu'il existe des connexions entre ces deux aspects du fonctionnement des plantes et les axes de variation fonctionnelle déjà inclus dans l'espace de Díaz *et al.* (2016). Cette partie de la discussion teste de manière plus explicite la façon dont la phénologie et la défense se positionnent dans cet espace phénotypique.

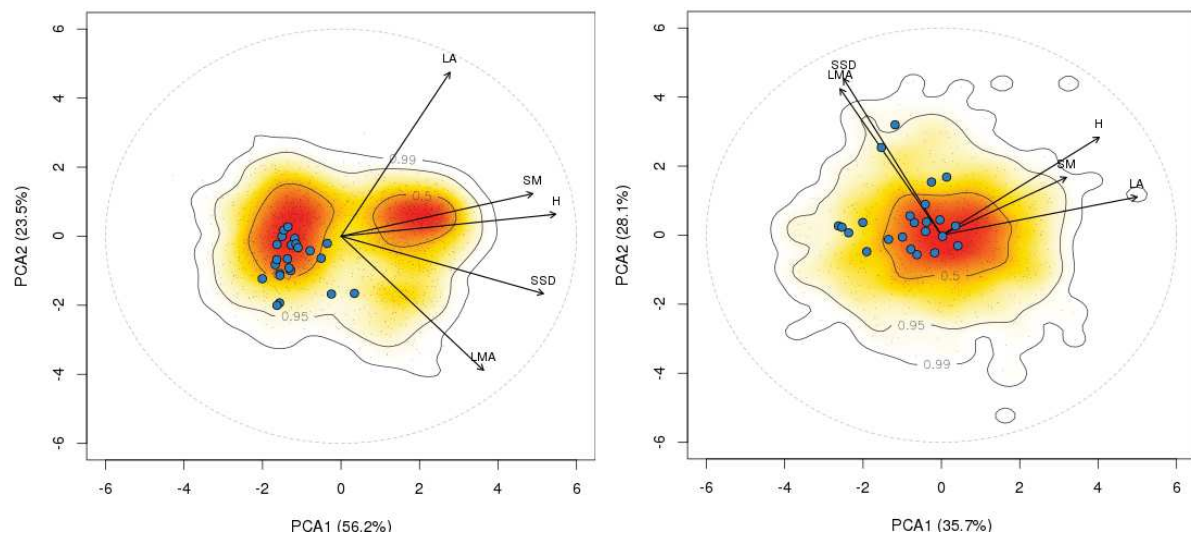


FIGURE 3 | Projection des 23 espèces des chapitres 3 et 5 (points bleus) dans l'espace phénotypique proposé par Díaz *et al.* (2016) pour (a) plus de 2 200 espèces représentant plusieurs formes de croissances ou (b) plus de 1 100 espèces herbacées. L'espace multivarié est formé à partir de cinq traits (LA : surface d'une feuille, SM : masse d'une graine, H : hauteur, SSD : densité des tiges et LMA : masse surfacique foliaire). Les espèces projetées sont inactives dans l'analyse, ne modifiant pas l'espace multivarié (*cf.* annexe 2).

Les 23 espèces sélectionnées couvrent une large gamme de valeurs de traits en comparaison des espèces herbacées mondiales (Fig. 3). Notons tout de même que le jeu de données correspond à des espèces de stature moyenne à petites et ayant des caractéristiques foliaires intermédiaires à conservatrices dans le compromis acquisition-conservation (Fig. 3).

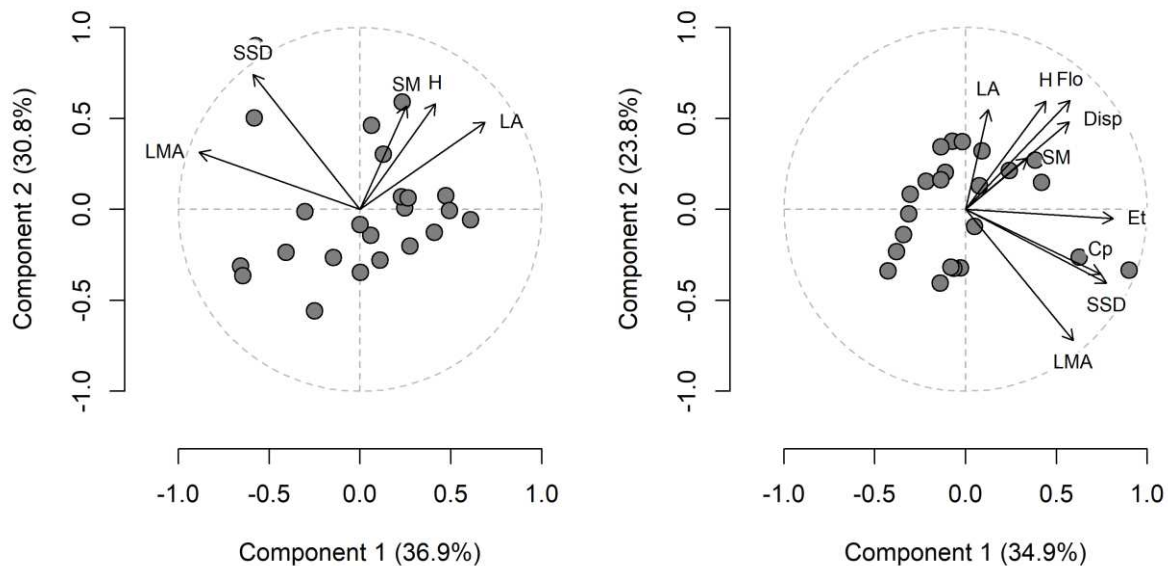


FIGURE 4 | Premiers plans d'analyses en composantes principales pour 23 espèces d'herbacées incluant (a) cinq traits du spectre global des formes et fonctions des plantes (LA : surface d'une feuille, SM : masse d'une graine, H : hauteur, SSD : densité des tiges et LMA : masse surfacique foliaire, Díaz *et al.* 2016) et (b) des traits de la phénologie et de la défense mécanique (Flo : date de début de floraison, disp : date de début de dispersion, Cp : résistance à la coupe, Et : résistance à l'étirement).

L'espace multivarié construit à partir des traits de l'espace de Díaz *et al.* (2016) pour les 23 espèces présente une structure similaire à celle trouvée pour plus de 1 100 espèces herbacées dans le spectre global des formes et fonctions des plantes (Fig. 3b et 4a). Ce résultat montre la robustesse des patrons de corrélations entre traits à une échelle globale et suggère la possibilité de généraliser nos observations à plus large échelle. L'intégration des traits phénologiques et biomécaniques à cette analyse modifie la contribution des variables aux composantes principales, mais ne semble pas modifier la dimensionnalité du phénotype. En effet, tous les traits contribuent fortement aux deux premières composantes (Fig. 4b), ne créant pas de nouvelle dimension indépendante. Comme décrit précédemment, (1) les traits phénologiques sont associés positivement à la dimension de stature de la plante et (2) les traits biomécaniques (en particulier la résistance à la coupe) sont associés à l'axe de gestion des ressources.

Enfin, afin de comparer les positions relatives des espèces entre les deux analyses, nous avons calculé les distances euclidiennes entre chaque paire d'espèces dans les deux espaces. La comparaison des matrices de distances nous permet de tester l'effet de l'intégration des traits de phénologie et de défense dans la classification des espèces. Les deux matrices de distances obtenues sont fortement corrélées (Test de Mantel, $r = 0.77$, $P\text{-val} = 0.001$) montrant une forte conservation des positions relatives des espèces dans les deux espaces. La phénologie et la défense n'ajoutent donc pas de dimension à l'espace phénotypique des plantes pour les espèces de petite stature en Méditerranée. Cela démontre de nouveau que l'immense variabilité des formes et fonctions observée chez les plantes est extrêmement structurée par différents niveaux de contraintes anatomiques, génétiques, physiologiques et développementales. Ainsi, une grande partie des différences phénotypiques entre plantes est capturée par un nombre restreint de dimensions dans l'espace phénotypique faisant apparaître une simplicité inattendue dans la biodiversité végétale.

Laughlin (2014) propose une série de tests permettant d'estimer de manière plus formelle la dimensionnalité du phénotype. Il montre que dans trois jeux de données contenant un nombre important de traits, quatre à six dimensions indépendantes peuvent être identifiées. Cependant, il ne leur donne pas de signification écologique ou fonctionnelle. Dans cet article, il propose que la meilleure manière de caractériser le phénotype consiste à mesurer peu de traits par organe mais sur un maximum d'organes. Bien que convaincante par sa simplicité, cette approche ne considère pas le fonctionnement de la plante dans sa globalité et ne donne pas de signification écologique ou fonctionnelle aux mesures réalisées. Or, une mauvaise connaissance des facteurs à l'origine de la variation des traits considérés ou du rôle de ces traits dans le fonctionnement de la plante, peut mener à des conclusions erronées dans l'étude de l'adéquation entre le phénotype et l'environnement. La démarche de caractérisation d'axes de variation fonctionnelle proposée par Westoby *et al.* (2002) reste donc la plus pertinente. D'autres axes de variation fonctionnelle restent à explorer, comme celui du syndrome d'économie des racines (Roumet *et al.* 2016) qui a rarement été intégré dans la description du phénotype des plantes à large échelle.

4 SUR LES MÉTHODES UTILISÉES DANS LA THÈSE

Ironiquement, les études comparatives sont contraintes par un compromis fonctionnel. En effet, pour une période allouée à la récolte de données, il existe un compromis entre le nombre d'individus caractérisés et le temps de mesure par individu. Selon les questions de recherche,

certain manipulent des jeux de données comportant un nombre restreint de traits rapides à collecter, pour des centaines voire des milliers d'espèces, quand d'autres mesurent en détail les processus physiologiques sur quelques individus sélectionnés. Mesurer tous les traits sur toutes les espèces apparaît comme une tâche impossible. La liste de mesures envisageables est très longue et les traits les plus couramment utilisés comme la hauteur ou la masse d'une graine, ont été mesurés sur plus de 24 000 espèces soit environ 6 % du nombre total d'espèces de plantes terrestres (Díaz *et al.* 2016).

Les travaux menés dans cette thèse n'échappent pas à cette contrainte, puisque la question de la dimensionnalité du phénotype nécessite de caractériser un maximum d'espèces par un maximum de traits. Nous avons donc besoin de critères pour choisir d'une part les traits les plus pertinents et d'autre part les espèces les plus pertinentes pour répondre à nos questions de recherche. La thèse combine deux démarches scientifiques communément utilisées en écologie comparative : la synthèse de données et l'expérimentation. Elles répondent de manière complémentaire au compromis décrit précédemment.

D'une part, nous avons utilisé la synthèse de données pour caractériser 138 d'espèces se développant sur plusieurs sites, différentes années. La compilation de jeux de données n'est généralement possible que sur un nombre limité de traits, permettant une description grossière du fonctionnement des plantes. Les mesures sont généralement issues de protocoles expérimentaux différents du fait de contraintes expérimentales spécifiques à chaque système d'étude. La compilation de ces mesures nécessite donc certaines précautions pour ne pas inclure de biais méthodologiques. L'utilisation de protocoles standardisés tels que ceux proposés par Pérez-Harguindeguy *et al.* (2013) doit être encouragée afin de faciliter le travail de compilation grâce à la production de jeux de données compatibles. Enfin, l'analyse de mesures *in-situ* nécessite souvent une caractérisation fine des conditions environnementales locales. Il est possible d'intégrer une partie de ces différences via des analyses statistiques avancées (voir chapitres 2 et 4) mais la description de l'environnement est souvent incomplète pouvant mener à des biais dans les résultats.

La démarche expérimentale utilisée a consisté, d'autre part, à réaliser un nombre important de mesures sur une vingtaine d'espèces. La sélection d'espèces est fondamentale dans ce type d'expérimentations et doit souvent prendre en compte de nombreux facteurs. Dans notre cas, nous avons sélectionné des espèces ayant des cycles de vie différents et provenant de groupes fonctionnels ou taxonomiques différents afin de maximiser la diversité phénotypique entre

espèces. Or, certains traits mesurés au cours de l'expérience sont clairement structurés par ces groupes (période de floraison dans le chapitre 3, force à l'étirement dans le chapitre 5) pouvant mener à des analyses par groupes, contraintes par une faible puissance statistique. De plus, certaines mesures ont nécessité la mise en place d'une expérimentation en pots afin de caractériser plus finement le phénotype au niveau individuel. Bien que cela soit couramment utilisé en écophysiologie ou dans le but d'observer la part génétique du phénotype et de mettre en évidence des processus de sélection ou d'adaptation locale des populations, nous savons que la mise en culture affecte le phénotype des plantes (Garnier & Freijssen 1994; Poorter *et al.* 2016). Certains traits sont connus pour être peu affectés par les conditions environnementales, comme la masse d'une graine, alors que d'autres, comme la masse surfacique foliaire, répondent généralement fortement à des modifications de l'environnement lumineux ou de la disponibilité des nutriments. Les mesures sont donc réalisées sur un phénotype artificiel dont on ignore une partie des différences avec celui qui est exprimé *in situ* et pouvant mener à une mauvaise compréhension de la connexion entre le phénotype des plantes et leur performance dans leur milieu.

La double approche utilisée est donc une force du travail de thèse. En effet, les deux méthodes ont leurs avantages et leurs faiblesses mais elles offrent deux visions complémentaires du fonctionnement des plantes. L'étude des valeurs de traits et de leurs corrélations *in situ* permet d'observer le résultat des interactions entre le génotype et l'environnement alors que les expérimentations *ex situ* permettent d'étudier les processus physiologiques et les contraintes génétiques pouvant être à l'origine de ces corrélations entre traits. Cette dualité est donc nécessaire à la compréhension des processus à l'origine des différences phénotypiques entre espèces.

5 PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Plusieurs de nos résultats se sont confrontés à la même limite : l'intégration des traits dans le fonctionnement global de l'organisme est rarement résolue. On manque de connaissances sur la manière dont les traits affectent les processus de croissance et d'allocation des ressources dans les différentes fonctions de la plante. Plusieurs questions restent ouvertes :

- (1) comment la phénologie affecte-t-elle la croissance en biomasse et l'accumulation des ressources ?
- (2) y a-t-il une relation entre la date du passage à la reproduction et la biomasse reproductive annuelle produite par la plante ? et la quantité de graines produites ?

- (3) peut-on estimer la quantité de ressources acquise à partir des caractéristiques des feuilles et d'une estimation de leur nombre ?
- (4) comment l'investissement dans la défense affecte-t-il l'acquisition des ressources ? et quel est son effet sur la quantité de ressources acquises ?

L'écologie comparative s'est largement concentrée sur la mesure de traits qui décrivent différents organes ou compartiments sans les connecter au fonctionnement de la plante de manière explicite. Ainsi, la MSF, la TMSF, l' A_{mass} ou la N_{mass} , sont des caractéristiques des feuilles, la hauteur représente uniquement les parties végétatives, la masse d'une graine est l'unité de dispersion de la plante. Or, tous ces traits ne prennent leur sens véritable qu'une fois mis en relation avec la proportion de biomasse qu'elle concerne. On peut faire l'hypothèse qu'une plante qui possède des feuilles aux caractéristiques acquisitives, mais en proportion très faible par rapport à sa biomasse totale, aura une vitesse de croissance faible. Ou encore, une allocation de biomasse très asymétrique entre les parties racinaires et aériennes peu mener à une mauvaise estimation de la biomasse d'une plante par sa hauteur. Enfin, la masse d'une graine doit être mise en relations avec la biomasse reproductive totale afin de pouvoir l'interpréter en relation avec les conditions environnementales. L'intégration des traits décrivant l'allocation de biomasse aux différents organes apparaît comme une perspective de recherche passionnante et promet des avancées significatives sur notre compréhension du fonctionnement des plantes.

Plus largement, nous devons améliorer notre compréhension des relations entre l'espace phénotypique des plantes et leur performance dans leur milieu. En effet, les gammes de variations de traits au sein d'un environnement sont généralement importantes, suggérant des filtres environnementaux de faible intensité ou l'existence de plusieurs combinaisons de traits performantes (Marks & Lechowicz 2005). La caractérisation du phénotype doit donc s'accompagner d'une analyse des dynamiques des populations au sein des communautés végétales, afin de permettre la construction de paysages adaptatifs et d'améliorer notre compréhension des relations entre phénotype et environnement. Les travaux menés dans cette thèse doivent donc servir de base pour de futures recherches sur la caractérisation de l'espace phénotypique des plantes mais également pour la recherche des liens entre les caractéristiques phénotypiques et la démographie des populations.

6 RÉFÉRENCES

- Bazzaz, F.A., Chiariello, N.R., Coley, P.D. & Pitelka, L.F. (1987) Allocating resources to reproduction and defense. *BioScience*, **37**, 58-67.
- Berendse, F. & Aerts, R. (1987) Nitrogen-use-efficiency: a biologically meaningful definition? *Functional Ecology*, **1**, 293-296.
- Boege, K. & Marquis, R.J. (2005) Facing herbivory as you grow up: the ontogeny of resistance in plants. *Trends in Ecology & Evolution*, **20**, 441-448.
- Bolmgren, K. & Cowan, P.D. (2008) Time – size tradeoffs: a phylogenetic comparative study of flowering time, plant height and seed mass in a north-temperate flora. *Oikos*, **117**, 424-429.
- Briske, D. (1996) Strategies of plant survival in grazed systems: a functional interpretation. *The ecology and management of grazing systems*, 37-67.
- Chabot, B.F. & Hicks, D.J. (1982) The ecology of leaf life spans. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **13**, 229-259.
- Chapin III, F.S., Schulze, E. & Mooney, H.A. (1990) The ecology and economics of storage in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **21**, 423-447.
- Coley, P. (1988) Effects of plant growth rate and leaf lifetime on the amount and type of anti-herbivore defense. *Oecologia*, **74**, 531-536.
- Coley, P.D., Bryant, J.P. & Chapin, F.S. (1985) Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science*, **230**, 895-899.
- Díaz, S., Kattge, J., Cornelissen, J.H.C., Wright, I.J., Lavorel, S., Dray, S., Reu, B., Kleyer, M., Wirth, C., Colin Prentice, I., Garnier, E., Bönsch, G., Westoby, M., Poorter, H., Reich, P.B., Moles, A.T., Dickie, J., Gillison, A.N., Zanne, A.E., Chave, J., Joseph Wright, S., Sheremet'ev, S.N., Jactel, H., Baraloto, C., Cerabolini, B., Pierce, S., Shipley, B., Kirkup, D., Casanoves, F., Joswig, J.S., Günther, A., Falczuk, V., Rüger, N., Mahecha, M.D. & Gorné, L.D. (2016) The global spectrum of plant form and function. *Nature*, **529**, 167-171.
- Enrico, L., Díaz, S., Westoby, M. & Rice, B.L. (2015) Leaf mechanical resistance in plant trait databases: comparing the results of two common measurement methods. *Annals of botany*, **117**, 209-214.
- Fine, P.V., Miller, Z.J., Mesones, I., Irazuzta, S., Appel, H.M., Stevens, M.H.H., Sääksjärvi, I., Schultz, J.C. & Coley, P.D. (2006) The Growth–Defense Trade-Off And Habitat Specialization By Plants In Amazonian Forests. *Ecology*, **87**.
- Garnier, E. (1991) Resource capture, biomass allocation and growth in herbaceous plants. *Trends in Ecology & Evolution*, **6**, 126-131.
- Garnier, E. & Freijssen, A. (1994) On ecological inference from laboratory experiments conducted under optimum conditions. *A whole plant perspective on carbon-nitrogen interactions* (eds E. Garnier & J. Roy), pp. 267-292. SPB Academic Publishing bv, The Hague.
- Grainger, J. (1939) Studies upon the time of flowering of plants: anatomical, floristic and phenological aspects of the problem. *Annals of Applied Biology*, **26**, 684-704.
- Grime, J. & Hunt, R. (1975) Relative growth-rate: its range and adaptive significance in a local flora. *The Journal of Ecology*, 393-422.
- Hahn, P.G. & Maron, J.L. (2016) A framework for predicting intraspecific variation in plant defense. *Trends in Ecology & Evolution*, **31**, 646-656.
- Herrera, J. (1986) Flowering and fruiting phenology in the coastal shrublands of Doñana, south Spain. *Vegetatio*, **68**, 91-98.
- Heydel, F. & Tackenberg, O. (2017) How are the phenologies of ripening and seed release affected by species' ecology and evolution? *Oikos*, **126**, 738-747.
- Jia, P., Bayaerta, T., Li, X. & Du, G. (2011) Relationships between flowering phenology and functional traits in eastern Tibet alpine meadow. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, **43**, 585-592.
- Kikuzawa, K. & Ackerly, D. (1999) Significance of leaf longevity in plants. *Plant Species Biology*, **14**, 39-45.
- Lambers, H. & Poorter, H. (1992) Inherent variation in growth rate between higher plants: a search for physiological causes and ecological consequences. *Advances in ecological research*, **23**, 187-261.

- Laughlin, D.C. (2014) The intrinsic dimensionality of plant traits and its relevance to community assembly. *Journal of Ecology*, **102**, 186-193.
- Laughlin, D.C., Leppert, J.J., Moore, M.M. & Sieg, C.H. (2010) A multi-trait test of the leaf-height-seed plant strategy scheme with 133 species from a pine forest flora. *Functional Ecology*, **24**, 493-501.
- Marks, C.O. & Lechowicz, M.J. (2005) Alternative designs and the evolution of functional diversity. *The American Naturalist*, **167**, 55-66.
- Moles, A.T. & Westoby, M. (2003) Latitude, seed predation and seed mass. *Journal of Biogeography*, **30**, 105-128.
- Moles, A.T. & Westoby, M. (2004) Seedling survival and seed size: a synthesis of the literature. *Journal of Ecology*, **92**, 372-383.
- Mooney, H. & Gulmon, S. (1982) Constraints on leaf structure and function in reference to herbivory. *BioScience*, **32**, 198-206.
- Navas, M.L., Roumet, C., Bellmann, A., Laurent, G. & Garnier, E. (2010) Suites of plant traits in species from different stages of a Mediterranean secondary succession. *Plant Biology*, **12**, 183-196.
- Onoda, Y., Westoby, M., Adler, P.B., Choong, A.M.F., Clissold, F.J., Cornelissen, J.H.C., Díaz, S., Dominy, N.J., Elgart, A., Enrico, L., Fine, P.V.A., Howard, J.J., Jalili, A., Kitajima, K., Kurokawa, H., McArthur, C., Lucas, P.W., Markesteijn, L., Pérez-Harguindeguy, N., Poorter, L., Richards, L., Santiago, L.S., Sosinski, E.E., Van Bael, S.A., Warton, D.I., Wright, I.J., Joseph Wright, S. & Yamashita, N. (2011) Global patterns of leaf mechanical properties. *Ecology Letters*, **14**, 301-312.
- Pérez-Harguindeguy, N., Díaz, S., Garnier, E., Lavorel, S., Poorter, H., Jaureguiberry, P., Bret-Harte, M., Cornwell, W., Craine, J. & Gurvich, D. (2013) New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany*.
- Petanidou, T., Ellis, W.N., Margaris, N.S. & Vokou, D. (1995) Constraints on flowering phenology in a phryganeic (East Mediterranean shrub) community. *American Journal of Botany*, 607-620.
- Poorter, H., Fiorani, F., Pieruschka, R., Wojciechowski, T., Putten, W.H., Kleyer, M., Schurr, U. & Postma, J. (2016) Pampered inside, pestered outside? Differences and similarities between plants growing in controlled conditions and in the field. *New Phytologist*, **212**, 838-855.
- Poorter, H. & Van der Werf, A. (1998) Is inherent variation in RGR determined by LAR at low irradiance and by NAR at high irradiance? A review of herbaceous species. *Inherent variation in plant growth. Physiological mechanisms and ecological consequences* (eds H. Lambers, H. Poorter & M.M.I. Van Vuuren), pp. 309-336. Backhuys Publishers, Leiden.
- Primack, R.B. (1987) Relationships among flowers, fruits, and seeds. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, 409-430.
- Reich, P., Uhl, C., Walters, M. & Ellsworth, D. (1991) Leaf lifespan as a determinant of leaf structure and function among 23 Amazonian tree species. *Oecologia*, **86**, 16-24.
- Reich, P.B. (2014) The world-wide 'fast-slow' plant economics spectrum: a traits manifesto. *Journal of Ecology*, **102**, 275-301.
- Reich, P.B., Ellsworth, D.S., Walters, M.B., Vose, J.M., Gresham, C., Volin, J.C. & Bowman, W.D. (1999) Generality of leaf trait relationships: a test across six biomes. *Ecology*, **80**, 1955-1969.
- Roumet, C., Birouste, M., Picon-Cochard, C., Ghestem, M., Osman, N., Vrignon-Brenas, S., Cao, K.f. & Stokes, A. (2016) Root structure–function relationships in 74 species: evidence of a root economics spectrum related to carbon economy. *New Phytologist*, **210**, 815-826.
- Sack, L., Ball, M.C., Brodersen, C., Davis, S.D., Des Marais, D.L., Donovan, L.A., Givnish, T.J., Hacke, U.G., Huxman, T. & Jansen, S. (2016) Plant hydraulics as a central hub integrating plant and ecosystem function: meeting report for 'Emerging Frontiers in Plant Hydraulics' (Washington, DC, May 2015). *Plant, cell & environment*, **39**, 2085-2094.
- Shipley, B., Lechowicz, M.J., Wright, I. & Reich, P.B. (2006) Fundamental trade-offs generating the worldwide leaf economics spectrum. *Ecology*, **87**, 535-541.
- Sun, S. & Frelich, L.E. (2011) Flowering phenology and height growth pattern are associated with maximum plant height, relative growth rate and stem tissue mass density in herbaceous grassland species. *Journal of Ecology*, **99**, 991-1000.
- Thompson, J.D. (2005) *Plant evolution in the Mediterranean*. Oxford University Press.






- Violle, C., Navas, M.-L., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I. & Garnier, E. (2007) Let the concept of trait be functional! *Oikos*, **116**, 882-892.
- Volaire, F. (2018) A unified framework of plant adaptive strategies to drought: crossing scales and disciplines. *Global Change Biology*.
- Westoby, M. (1998) A leaf-height-seed (LHS) plant ecology strategy scheme. *Plant and Soil*, **199**, 213-227.
- Westoby, M., Falster, D.S., Moles, A.T., Vesk, P.A. & Wright, I.J. (2002) Plant ecological strategies: some leading dimensions of variation between species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **33**, 125-159.
- Wright, I.J. & Cannon, K. (2001) Relationships between leaf lifespan and structural defences in a low-nutrient, sclerophyll flora. *Functional Ecology*, **15**, 351-359.
- Wright, I.J., Reich, P.B., Westoby, M., Ackerly, D.D., Baruch, Z., Bongers, F., Cavender-Bares, J., Chapin, T., Cornelissen, J.H.C., Diemer, M., Flexas, J., Garnier, E., Groom, P.K., Gulias, J., Hikosaka, K., Lamont, B.B., Lee, T., Lee, W., Lusk, C., Midgley, J.J., Navas, M.-L., Niinemets, U., Oleksyn, J., Osada, N., Poorter, H., Poot, P., Prior, L., Pyankov, V.I., Roumet, C., Thomas, S.C., Tjoelker, M.G., Veneklaas, E.J. & Villar, R. (2004) The worldwide leaf economics spectrum. *Nature*, **428**, 821-827.
- Wright, I.J. & Westoby, M. (2002) Leaves at low versus high rainfall: coordination of structure, lifespan and physiology. *New Phytologist*, **155**, 403-416.

Annexe 1

Coordination entre les isotopes du carbone et de l'oxygène et le spectre d'économie foliaire

RESEARCH ARTICLE

Leaf carbon and oxygen isotopes are coordinated with the leaf economics spectrum in Mediterranean rangeland species

Iván Prieto^{1,2}  | José I. Querejeta²  | Jules Segrestin¹  | Florence Voltaire³  | Catherine Roumet¹ 

¹CEFE, CNRS, Univ Montpellier, Univ Paul Valéry Montpellier 3, EPHE, IRD, Montpellier, France

²Centro de Edafología y Biología Aplicada del Seguro-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CEBAS-CSIC), Murcia, Spain

³CEFE, INRA, CNRS, Univ. Montpellier, Univ Paul Valéry Montpellier 3, EPHE, IRD, Montpellier, France

Correspondence

Iván Prieto

Email: iprietoaguilar@gmail.com

Funding information

Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Number: Ecosfix - ANR-10-STRA-003-001 and O2LA - ANR-09-STRA-09; Spanish Ministerio de Economía y Competitividad, Grant/Award Number: FPD1-2013-16221; Agropolis Foundation; Ministerio de Ciencia e Innovación, Grant/Award Number: CGL2010-21064 and CGL2013-48753-R

Handling Editor: Rafael Oliveira

Abstract

1. The leaf economics spectrum (LES) describes covariation in traits relevant to carbon and nutrient economics across plant species, but much less is known about the relationship between the LES and leaf water economy. We propose an approach combining the measurement of two leaf traits related to water-use economy, leaf carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and oxygen ($\delta^{18}\text{O}$) isotopic composition, and the measurement of leaf morphological and nutrient traits to investigate the link between leaf carbon and nutrient economics and water use.
2. We tested the relationships between leaf traits linked to carbon and nutrient use within the LES and water-use traits using leaf $\delta^{18}\text{O}$ as a proxy of stomatal conductance (g_s) and $\delta^{13}\text{C}$ as a proxy of intrinsic water-use efficiency (WUE_i) across 15 Mediterranean rangeland species grown in an irrigated common garden and in a natural rangeland in Southern France.
3. The target species spanned a wide range of variation in leaf morphological and nutrient trait values and a wide range of leaf $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values. Principal component analysis revealed multiple associations among leaf morphology, nutrients and isotopic composition, with the first axis alone explaining 56.0% of the total variation across species. Leaf $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{13}\text{C}$ covaried with leaf morphology and leaf nutrient concentrations along a single resource-use axis. Species with high leaf $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{13}\text{C}$ (low g_s and high WUE_i) exhibited a resource-conservative strategy (high leaf dry matter content, low leaf N, P and K), whereas species with low leaf $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{13}\text{C}$ (high g_s and low WUE_i) showed a more resource-acquisitive strategy (high specific leaf area and leaf N, P and K). These leaf trait syndromes and resource-use strategies were strongly conserved across sites with contrasting environmental conditions, indicating that foliar $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{13}\text{C}$ can be included as an integral part of the LES for this set of rangeland species.
4. Overall, the data suggest a tight coupling and coordination between water, carbon and nutrient-use strategies across herbaceous plant species. A dual $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{13}\text{C}$ isotope approach combined with LES trait measurements is a promising tool to more comprehensively assess the diversity of resource-use strategies among coexisting plant species.

KEYWORDS

carbon and oxygen isotopes, leaf economics spectrum, leaf traits, Mediterranean ecosystems, plant strategies, stomatal conductance, water-use efficiency

1 | INTRODUCTION

Vascular plants possess general attributes or trait values (traits hereafter) that define how they interact with their environment. Plants face three basic challenges related to resource acquisition: obtaining sufficient water, nutrients and light to fix enough carbon to allow their establishment, persistence and reproduction (Craine & Dybzinski, 2013). These three functions have resulted during evolution in organ-level construction constraints and trade-offs and a limited set of trait combinations aimed at maximizing carbon and nutrient uptake while minimizing water losses (Díaz et al., 2015; Donovan, Maherali, Caruso, Huber, & de Kroon, 2011). One consistent trade-off at the leaf level is known as the leaf economics spectrum (LES; Wright et al., 2004). The LES defines a continuum spanning from fast-growing species with a quick return of the investments in nutrients and carbon in leaves, to slow-growing species with a slower return. At the quick return end of the LES are species with high leaf nutrient concentration, high rates of photosynthesis and respiration and low investment in leaf C structures per leaf area (LA; high specific leaf areas [SLA], i.e., the ratio of LA to dry mass) that result in fast growth rates. At the slow return end of the LES are species with high investments in leaf C structures (high leaf dry matter contents [LDMC]) and low leaf nutrient concentrations associated with low photosynthetic, respiration and growth rates. Despite the crucial role of water in plant growth and survival, leaf traits related to water economy have been seldom considered in the LES (although see Blonder et al., 2015; Blonder, Violle, & Enquist, 2013; Li et al., 2015; Mason & Donovan, 2015; Sandquist & Cordell, 2007).

In a recent review, Reich (2014) suggested that traits associated with fast vs. slow resource-use strategies may be similar for light, nutrients and water. He proposed that the link between leaf gas exchange (i.e., stomatal conductance and photosynthesis) and leaf hydraulics should be strong, thus regulating carbon and water fluxes within the leaves so that “fast” species should be able to sustain high water flux rates, for example, high stomatal conductance, with the opposite expected for “slow” species. Brodribb, Feild, and Jordan (2007) found that leaf hydraulic conductivity was positively correlated with leaf stomatal conductance and photosynthetic capacity, and Mason and Donovan (2015) found co-evolution among traits governing carbon, water and nutrient uptake within the genus *Helianthus*. An emerging body of evidence indicates that leaf photosynthetic and hydraulic capacities are coordinated and often co-scale across plant species (Brodribb & Feild, 2010; Brodribb et al., 2007; Flexas, Scoffoni, Gago, & Sack, 2013; Sack & Holbrook, 2006; Scoffoni et al., 2016) and that leaf venation traits (e.g., vein density), which are linked to leaf hydraulic conductance and gas exchange, drive many of the correlations underlying the LES (Blonder et al., 2013; Sack & Scoffoni, 2013; Scoffoni et al., 2016). In this study, we tested whether two leaf isotopic traits

($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$), known to be related to plant water use, are coordinated with the LES in rangeland Mediterranean species.

The carbon isotopic composition of leaf material ($\delta^{13}\text{C}$) depends on the ratio of intercellular to ambient CO_2 concentrations (c_i/c_a) and is influenced by both stomatal conductance (g_s) and the rate of CO_2 fixation by Rubisco (i.e., photosynthetic rate, A). This makes $\delta^{13}\text{C}$ measured in leaves a good proxy for time-integrated leaf-level intrinsic water-use efficiency ($\text{WUE}_i = A/g_s$) over the period when the leaf material is produced (Farquhar et al., 1989; Seibt, Rajabi, Griffiths, & Berry, 2008), although it is often difficult to interpret the extent to which interspecific differences in leaf $\delta^{13}\text{C}$ are determined by differences in A , in g_s or both (Scheidegger, Saurer, Bahn, & Siegwolf, 2000; Werner et al., 2012). The oxygen isotopic composition ($\delta^{18}\text{O}$) of leaf tissue is primarily determined by (1) the isotopic composition of the soil water used by the plant, (2) the evaporative isotopic enrichment of the leaf water in transpiring leaves and (3) the isotopic exchange between oxygen atoms in organic molecules and local water in the sites where these organic molecules are formed (Barbour, 2007). Leaf $\delta^{18}\text{O}$ is inversely related to the ratio between the intercellular and ambient water vapour molar fraction (e_i/e_a) and is thus strongly influenced by g_s , providing a good time-integrated proxy measure of stomatal conductance and transpiration rate (Barbour, 2007; Barbour & Farquhar, 2000). Contrary to leaf $\delta^{13}\text{C}$, leaf $\delta^{18}\text{O}$ is independent of variation in net photosynthetic rates, so a dual isotopic approach combining $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ measurements can help separate the effects of A and g_s on $\delta^{13}\text{C}$ and WUE_i (Grams, Kozovits, Häberle, Matyssek, & Dawson, 2007; Scheidegger et al., 2000). Caution should be taken when interpreting interspecific variations in leaf $\delta^{18}\text{O}$ as definitive evidence of differences in g_s because leaf $\delta^{18}\text{O}$ is influenced by multiple environmental factors (such as ambient temperature and vapour pressure deficit; Dansgaard, 1964; Rozanski, Araguás-Araguás, & Gonfiantini, 1993), as well as by plant source water $\delta^{18}\text{O}$. Different soil layers may have contrasting water $\delta^{18}\text{O}$ values and plant water sources may thus vary with differences in rooting patterns or depth among coexisting species (Barbour, 2007; Moreno-Gutiérrez, Dawson, Nicolás, & Querejeta, 2012).

Some studies have shown that species with a more conservative use of resources (i.e., long-lived leaves with high tissue density and low nutrient concentrations) had higher values of $\delta^{13}\text{C}$, while the opposite was found in species with fast resource-use traits (high SLA and nitrogen concentration, Navas, Roumet, Bellmann, Laurent, & Garnier, 2010; Pérez-Ramos et al., 2012). Other studies performed under non-limiting soil water conditions have shown that leaf $\delta^{13}\text{C}$ and water-use traits (e.g., stomatal size or g_s) were independent and aligned along two independent axes of variation (Li et al., 2015; Sandquist & Cordell, 2007), suggesting substantial decoupling between C-gain and water use. Therefore, the relationship between LES traits and key leaf

physiological traits controlling both C uptake and water loss, such as g_s or WUE_p , remains unclear.

We propose here that an approach combining the measurement of leaf $\delta^{13}C$ and $\delta^{18}O$ and leaf morphological and nutrient traits associated with leaf economics (Wright et al., 2004, 2005) could be useful to more comprehensively characterize the diversity of plant resource-use strategies and to establish the link between leaf carbon and nutrient economics and water use. Leaf $\delta^{13}C$ and $\delta^{18}O$ integrate information on leaf physiology throughout the leaf life span (Dawson, Mambelli, Plamboeck, Templer, & Tu, 2002), thus providing comparable information on similar time-scales as other commonly used leaf traits (e.g., SLA or leaf N). Assessing leaf $\delta^{18}O$ and $\delta^{13}C$ variation across species exposed to the same environmental conditions could thus allow for the inclusion of a third water-related dimension in the LES theory, thus contributing to advance our understanding of the diversity of resource-use strategies among plants.

The main aim of this work was to characterize the diversity of leaf functional traits and to investigate the link between leaf carbon and nutrient economics and water use among 15 Mediterranean rangeland species grown in common garden conditions. We assessed the relationships of leaf $\delta^{18}O$ and $\delta^{13}C$ with five leaf structural and nutrient traits that are an integrative part of the LES. We measured $\delta^{18}O$ and $\delta^{13}C$ as time-integrated proxies for stomatal conductance and WUE_p , respectively (Farquhar et al., 1989; Ramírez, Querejeta, & Bellot, 2009) and SLA, LDMC and leaf N, P and K concentrations (Wright et al., 2005). We hypothesized that variation in leaf $\delta^{18}O$ and $\delta^{13}C$ is coordinated with variation in leaf morphological traits and nutrient concentrations across species. More specifically, we predicted that species on the resource-conservative side of the LES (high LDMC, low SLA and nutrient concentrations) would also show a conservative water-use strategy characterized by high leaf $\delta^{18}O$ and $\delta^{13}C$ values, whereas species in the resource-acquisitive side of the LES (low LDMC, high SLA and nutrient concentrations) would show a more profligate water-use

strategy characterized by comparatively lower $\delta^{18}O$ and $\delta^{13}C$ values. To test the applicability of our approach to natural rangeland conditions, we also measured the seven traits of interest on the same set of species growing in natural Mediterranean rangelands.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Study site and plant species

The study was performed in a common garden experiment conducted at the Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CEFE-CNRS) in Montpellier, France (43°64'N, 3°86'E, 100 m a.s.l.). Climate is Mediterranean subhumid (Daget, 1977) with cool to cold winters, frequent frosts in winter and a marked summer drought. The mean annual precipitation was 607 mm, and the mean temperature was 14.9°C. The soil is homogeneous, 1.20 m deep and of loam-clay texture with pH = 7.8, soil organic C content of 14.5 g/kg, nitrogen content of 1.38 g/kg, phosphorus content of 0.05 g P₂O₅ kg and a C/N ratio of 10.5. In January 2011, we collected ramets or seeds from 15 perennial rangeland species, 6 monocotyledonous and 9 dicotyledonous, belonging to seven different families (Table 1). Ramets (or seeds) were collected from dry rangelands in southern France, located on a limestone plateau (Larzac Causse) at the INRA La Fage experimental station (43°55'N, 3°05'E, 790 m a.s.l.) with a mean annual precipitation of 1,070 mm and mean monthly temperatures that range from 1°C in January to 19°C in August (see Bernard-Verdier et al., 2012 for site details). Ramets (and seeds) were planted and grown in a glasshouse for 3 months, and in March 2011, when all plant species were well rooted, they were transplanted to the common garden site. Individual plants were transplanted to 1 × 1.2 m plots in monocultures at a density of 100 individuals per m². The distance between individual plants within each plot was 10 cm, and the minimum distance between plots was

TABLE 1 List of rangeland species included in the study. Species belong to two different classes (mono- and dicotyledonous) and seven families. Given are also the species abbreviations and their cumulative 95% rooting depths (cm) measured in May 2012 in monocultures in the common garden experiment. Different letters indicate significant differences between species (simultaneous inference contrasts, $p < .05$)

Species	Species abbreviation	Family	95% rooting depth
<i>Bromus erectus</i>	Be	Poaceae	71.2 ± 2.8 ab
<i>Carex flacca</i>	Cf	Cyperaceae	53.7 ± 7.4 ab
<i>Carex humilis</i>	Ch	Cyperaceae	60.3 ± 4.6 ab
<i>Centaurea pectinata</i>	Cp	Asteraceae	70.9 ± 3.2 ab
<i>Coronilla minima</i>	Cm	Fabaceae	76.2 ± 4.1 a
<i>Festuca christianii-bernardii</i>	Fc	Poaceae	67.2 ± 9.2 ab
<i>Helianthemum canum</i>	Hc	Cistaceae	61.9 ± 3.4 ab
<i>Hieracium pilosella</i>	Hp	Asteraceae	56.6 ± 4.5 ab
<i>Koeleria vallesiana</i>	Kv	Poaceae	60.2 ± 7.9 ab
<i>Lotus corniculatus</i>	Lc	Fabaceae	61.1 ± 0.7 ab
<i>Potentilla neumanniana</i>	Pn	Rosaceae	46.7 ± 10.3 b
<i>Prunella laciniata</i>	Pl	Lamiaceae	–
<i>Sanguisorba minor</i>	Sm	Rosaceae	67.1 ± 2.3 ab
<i>Stipa pennata</i>	Sp	Poaceae	69.7 ± 6.2 ab
<i>Thymus dolomiticus</i>	Td	Lamiaceae	59.7 ± 6.6 ab

50 cm. A total of 60 plots (15 species \times 4 replicates) were established in four different blocks, with each block containing all monocultures of 15 species. Plots were randomly distributed within each block. Plots were irrigated at regular intervals (from March 2011 to May 2012) to ensure they were always under non-limiting soil water conditions (Fort et al., 2017). All species were exposed to the same environmental microclimatic conditions (temperature, relative air humidity and vapour pressure deficit) due to their roughly similar size and height, and they all presumably used the same main source of water (a mixture of local precipitation and irrigation water). All plots were weeded regularly.

2.2 | Leaf traits

In May 2012, at the peak of vegetative growth, and 1 year after plant establishment, leaf morphology and chemistry were assessed on fully mature leaves in all the target species. To characterize leaf morphology, we measured SLA (m^2/kg) and LDMC (mg/g). For each species, SLA and LDMC were determined in three individual plants per plot using 2–4 leaves per individual; a mean value for each plot was then calculated. Fully developed mature leaves were collected, rehydrated under dark conditions for 24 hr and weighed (saturated weight, SW; g). After weighing, LA (m^2) was determined with an area meter (model MK2; Delta-T Devices, Cambridge, UK). Leaves were then oven-dried at 60°C for 48 hr and weighed again to obtain their dry weight (DW; g). Specific leaf area and LDMC were calculated as $\text{SLA} = (\text{LA}/\text{DW}) \times 1000$ and $\text{LDMC} = (\text{DW}/1000 \times \text{SW})$. For leaf nutrient traits, we measured their C, N, P and K concentrations (mg/g). Their C and N concentrations were determined by dry combustion with an elemental analyser (Thermo-Finnigan EA1112, Milan, Italy). Leaf P and K concentrations were measured using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES, Thermo Elemental Iris Intrepid II XDL, Franklin, MA, USA) after a microwave-assisted digestion with $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$ (4:1, v:v).

Leaf $\delta^{13}\text{C}$ was analysed using an Elementar analyser coupled to an isotope ratio mass spectrometer (EA/GA-IRMS, Carlo Erba, Elementar, Finnigan, Isoprime), and leaf $\delta^{18}\text{O}$ was determined using an isotope ratio mass spectrometer (IRMS, ANCA/SL elemental analyser) coupled to a Finnigan MAT Delta PlusXL IRMS Elemental Analyser (Finnigan MAT, Bremen, Germany). Isotope composition is expressed in delta notation (‰) relative to the Vienna Pee Dee Belemnite standard (V-PDB) for $\delta^{13}\text{C}$ and the Vienna Standard Mean Ocean Water for $\delta^{18}\text{O}$. To better understand the functional significance of variations in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ among species, leaf net photosynthetic rate (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) and leaf stomatal conductance (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) were measured in a subset of 10 target species (see Annex S1 for more details).

Additionally, to test the applicability of our approach to natural field conditions, we measured the same leaf traits on individuals of the same set of species growing in natural rangelands at the INRA La Fage experimental station. These natural rangelands span a gradient of soil nutrients and water availability and were not irrigated or fertilized (see Bernard-Verdier et al., 2012 for site details). These individuals

were growing in the same plots where the ramets (and seeds) for the common garden experiment were collected. Leaf samples were harvested in May 2010 in order to determine SLA, LDMC and leaf N (data available in Bernard-Verdier et al., 2012), and we used the remaining ground material of these samples to determine leaf $\delta^{18}\text{O}$, $\delta^{13}\text{C}$, leaf P and leaf K using the same methods as those used for the common garden experiment. We did not have enough leaf material to conduct analyses for *Centaurea pectinata*, and thus, comparisons between traits in the common garden and in the natural rangelands were made with a subset of 14 species.

2.3 | Statistical analysis

Differences in leaf isotopic composition among species were evaluated using general linear mixed models (LMM) with $\delta^{13}\text{C}$ or $\delta^{18}\text{O}$ as the dependent variable and species as the independent factor, with block as the random factor. A general principal component analysis (PCA) was performed at the plot level with the seven leaf traits (SLA, LDMC, leaf N, K, P, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$) measured across the 15 target species included in the common garden experiment to obtain a multidimensional overview of the integration of two water-use traits ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$) in the LES framework ($\text{LES}_{\text{CG7traits}}$). Additionally, to avoid redundancy in statistical analyses when testing morphological and nutrient trait relationships with leaf isotope composition, another PCA was constructed excluding the two isotopic traits and using the remaining five traits (SLA, LDMC and leaf N, K and P). Within this second PCA, we extracted the Axis 1 scores of each species and used this as a continuous variable defining the LES ($\text{LES}_{\text{CG5traits}}$) for further analyses. Finally, a third PCA was conducted with the seven leaf traits measured in natural rangelands at the INRA La Fage experimental station ($\text{SLA}_{\text{field}}$, $\text{LDMC}_{\text{field}}$, leaf N_{field}, K_{field}, P_{field}, $\delta^{13}\text{C}_{\text{field}}$ and $\delta^{18}\text{O}_{\text{field}}$). Within this third PCA, we extracted the Axis 1 scores of each individual species and used it as a continuous variable defining the LES in natural grasslands ($\text{LES}_{\text{field}}$).

To explore relationships between traits related to leaf economics and leaf isotopic composition, we used general linear mixed regression models with $\delta^{13}\text{C}$ or $\delta^{18}\text{O}$ as the dependent variable and either each individual trait or the $\text{LES}_{\text{CG5traits}}$ (Axis 1 in the PCA with five traits) as the independent variable, with block as the random factor. All replicates ($n = 4$ per species) were used in these analyses. In addition, these general linear mixed regression models were run using phylogenetic independent contrasts (PICs). The phylogenetic tree used for PIC analyses is an extraction of the 15 target species from the phylogenetic supertree in Flores et al. (2014). All families in our database were matched to the latest phylogeny by the Angiosperm Phylogeny Group III (2009), based on family-level trees (Davies et al., 2004). Branch lengths were adjusted with the *Bladj* algorithm implemented in Phylocom 4.2 (<http://phylodiversity.net/phylocom/>) taking age estimates for the main nodes from Wikström, Savolainen, and Chase (2001). The phylogenetic distance between two species was estimated by the age of their most recent common ancestor. Trait variables were then transformed into phylogenetically independent contrasts using the *pic* function and a linear mixed regression model was then fit leaving out the intercept according to Paradis (2012).

Additionally, we calculated the variance partition (R^2) for the fixed factors (e.g., leaf traits or the $LES_{CG5traits}$) for each model according to Nakagawa and Schielzeth (2013).

To test for the consistency of the LES scores between species growing in the common garden and species grown in natural grasslands, we conducted Spearman's rank correlation analyses between the $LES_{CG7traits}$ (Axis 1 of $PCA_{7traits}$ for species in the common garden) and the LES_{field} (Axis 1 of PCA for species in natural grasslands). The same correlation analyses between common garden values and natural grassland values were conducted for each individual leaf trait. For these analyses, mean values per species were used ($n = 14$).

For general linear mixed regression, multivariate and correlation analyses, residuals were assessed for normality (Shapiro–Wilks test at $p > .05$) and data were log-transformed when necessary. All calculations and statistical analyses were performed with the R software (v 2.15.3, R Development Core Team, 2013) using the packages ade4 (Chessel, Dufour, & Thioulouse, 2004), effects (Fox et al., 2014), Hmisc (Harell, 2015), lme4 (Bates et al., 2015), nlme (Pinheiro, Bates, DebRoy, & Sarkar, 2014), phytools (Revell, 2012) and ape (Paradis, Claude, & Strimmer, 2004).

3 | RESULTS

3.1 | Common garden experiment

The 15 target species grown in the common garden experiment spanned a wide range of variation in leaf morphological and nutrient trait values, as well as a wide range of leaf $\delta^{18}O$ and $\delta^{13}C$ values (Table 2, Figures S1 and S2). Of the 15 species, 13 had similar rooting depths and only the shallowest-rooted species (*Potentilla neumanniana*) and the deepest-rooted species (*Coronilla minima*) differed significantly from each other (Table 1). There was a remarkably tight relationship between leaf $\delta^{13}C$ and $\delta^{18}O$ values across species (Figure 1, $\delta^{13}C = 0.38 \times \delta^{18}O - 38.05$, $\chi^2 = 48.13$, $p < .001$, $R^2 = .45$),

and this relationship was maintained when corrected phylogenetically (Figure 1, PICs, $F_{1,13} = 10.75$, $p < .05$, $R^2 = .45$). The species *Helianthemum canum* (Cistaceae) was an outlier in this relationship as it had low $\delta^{13}C$ values associated with intermediate $\delta^{18}O$ values. When analyses were re-run excluding this species, the relationship showed a better fit whether corrected phylogenetically or not (Figure 1; $\delta^{13}C = 0.40 \times \delta^{18}O - 38.28$, $\chi^2 = 85.9$, $p < .001$, $R^2 = .61$ and $F_{1,12} = 19.8$, $p < .001$, $R^2 = .62$).

Principal components analysis based on seven traits showed multiple associations among leaf morphology, nutrients and isotopic composition across the 15 rangeland species grown in the common garden experiment. The first two axes explained 72.4% of the total variability across species (Figure 2a). The first axis alone explained 56.0% of the leaf trait variation, with all traits contributing substantially to this axis (Table S1). Traits classically associated with a resource-acquisitive strategy, that is, high SLA and high leaf N and K, were positively correlated with Axis 1, whereas LDMC, associated with a resource-conservative strategy, was negatively correlated. Leaf $\delta^{18}O$ and $\delta^{13}C$ were associated with the conservative side of the spectrum (Table S1). Leaf P was more heavily loaded on Axis 2, but still had a substantial load on Axis 1 (Table S1). The main axis of variation thus separated species associated with the more conservative or “slow” side of the LES (high $\delta^{13}C$, $\delta^{18}O$ and LDMC and low SLA, leaf N, K and P) from species with a more acquisitive or “fast” strategy and opposite traits (Figure 2b). Similar correlation patterns were observed when the PCA was performed with the five traits classically associated with the LES (SLA, LDMC, N, P and K; Table S1).

In the common garden experiment, variation in leaf $\delta^{18}O$ across species was tightly linked to variation in all traits defining the LES (Figure 3, Table S2). Leaf $\delta^{18}O$ was positively related to LDMC and negatively related to SLA and leaf nutrient concentrations (N, K, P) and to the first axis in the PCA defining the $LES_{CG5traits}$. These relationships were maintained, or even became stronger, when phylogenetic dependence was incorporated (Table S3). These models improved,

TABLE 2 Description and range of values (min-max) for the seven functional traits measured in the common garden experiment and their key role in plant functioning. Description of traits and function are based on Pérez-Harguindeguy et al. (2013), Bernard-Verdier et al. (2012) and Wright et al. (2005)

Trait	Abbreviation	Units	Range	Key role in plant functioning/interpretation
Specific leaf area	SLA	m ² /kg	5.08–27.27	Photosynthetic rate, light capture and relative growth rate
Leaf dry matter content	LDMC	mg/g	145.67–542.07	Drought tolerance and physical resistance, leaf life span
Leaf nitrogen concentration	Leaf N	mg/g	11.0–42.8	Photosynthetic rate, nutritional quality, light capture
Leaf phosphorus concentration	Leaf P	mg/g	0.40–6.10	Energy reactions (i.e., photosynthesis, respiration), nutritional quality
Leaf potassium concentration	Leaf K	mg/g	1.0–53.3	Photosynthesis (enzymatic activation), stomatal regulation
Oxygen isotopic composition	Leaf $\delta^{18}O$	‰	20.7–30.2	Stomatal conductance, source water $\delta^{18}O$
Carbon isotopic composition	Leaf $\delta^{13}C$	‰	–30.5 to –25.7	Water-use efficiency

although not substantially, when *H. canum* was excluded from the analyses (Figure 3, Tables S2 and S3). Similarly, interspecific variation in $\delta^{13}\text{C}$ was also strongly linked to variation in all traits and to the $\text{LES}_{\text{CG5traits}}$ across species (Figure 4, Table S4). Leaf $\delta^{13}\text{C}$ increased with higher LDMC and decreased with increases in SLA, leaf N, K, P and the $\text{LES}_{\text{CG5traits}}$. These models also improved when *H. canum* was excluded, with the exception of leaf P (Figure 4, Table S4). The relationships with $\delta^{13}\text{C}$ were maintained when phylogenetic dependence was taken into account except for leaf N and leaf P (Table S5). Interestingly, leaf $\delta^{18}\text{O}$ generally showed stronger relationships with leaf morphological and nutrient traits or the $\text{LES}_{\text{CG5traits}}$ than leaf $\delta^{13}\text{C}$, especially when incorporating phylogeny in the analyses (Tables S2–S5).

Within the subset of 10 species used for leaf gas exchange measurements, we found the expected negative relationship between leaf $\delta^{18}\text{O}$ and g_s , both when *H. canum* was included or excluded from the analysis ($R^2 = .45$, $F_{1,8} = 6.45$, $p < .05$ and $R^2 = .68$, $F_{1,7} = 14.99$, $p < .01$, respectively; Figure 5a and Table S6). Leaf $\delta^{18}\text{O}$ was also negatively correlated

with A (Table S6). Leaf $\delta^{13}\text{C}$ was positively correlated with WUE_p , as expected, although the relationship was stronger when *H. canum* was included than when it was excluded ($R^2 = .61$, $F_{1,8} = 12.75$, $p < .01$ and $R^2 = .43$, $F_{1,7} = 5.33$, $p < .05$, respectively; Figure 5b and Table S6). Leaf $\delta^{13}\text{C}$ was negatively correlated with g_s and was also negatively correlated with A but only when *H. canum* was excluded (Table S6). Moreover, A and g_s were positively correlated with SLA and leaf N and negatively correlated with LDMC (Table S6), as expected from the LES theory.

3.2 | Applicability of this approach under natural rangeland conditions

The PCA with seven traits measured in natural rangelands showed similar multiple trait associations with those found in the common garden (except for leaf N; Table S1). A tight correlation between leaf $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ values across species was also found in natural rangelands whether including ($F_{1,51} = 36.95$, $p < .001$, $R^2 = .41$) or excluding *H. canum* ($F_{1,51} = 36.28$, $p < .05$, $R^2 = .92$). Similar relationships between leaf isotopic composition ($\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{13}\text{C}$) and leaf morphological and nutrient traits were also found in natural rangelands, and these correlations were also stronger for $\delta^{18}\text{O}$ than for $\delta^{13}\text{C}$ (Table S7).

There was a tight positive correlation between species scores along the $\text{LES}_{\text{CG7traits}}$ and $\text{LES}_{\text{field}}$ axes ($\rho = 0.85$, $p < .001$; Figure 6), indicating that the species relative ranking along PCA Axis 1 (LES) was highly conserved between sites with contrasting climate and environmental conditions. Moreover, the species ranking was conserved for all the leaf traits between the common garden experiment and natural rangelands, except for leaf P (Figure 6). Species had similar leaf $\delta^{13}\text{C}$ and SLA values under common garden conditions and in natural rangelands (i.e., aligned along the 1:1 line), whereas they had lower leaf $\delta^{18}\text{O}$, leaf N, P and K concentrations and higher LDMC values in natural rangelands than in the common garden (Figure 6).

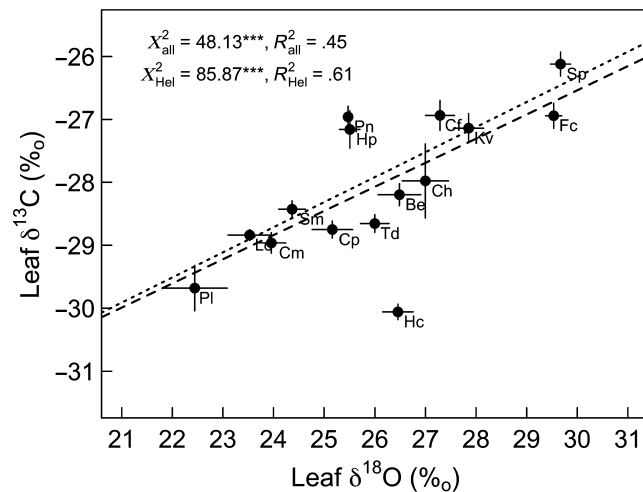


FIGURE 1 Relationship between leaf carbon isotope composition ($\delta^{13}\text{C}$) and oxygen isotope composition ($\delta^{18}\text{O}$) across 15 rangeland species grown in the common garden experiment. Error bars represent ± 1 SEM. Shown are regression lines for general linear mixed models with all 15 species (dashed line, χ^2_{all} , $df = 1$) and for all species excluding *Helianthemum canum* (dotted line, χ^2_{Hel} , $df = 1$). R^2 values for each model are given. Abbreviations for species are given in Table 1

4 | DISCUSSION

4.1 | Isotopic traits related to water use are part of the “classic” LES

Across the 15 Mediterranean rangeland species, leaf morphological (SLA and LDMC) and nutrient traits (N, P and K concentrations) linked

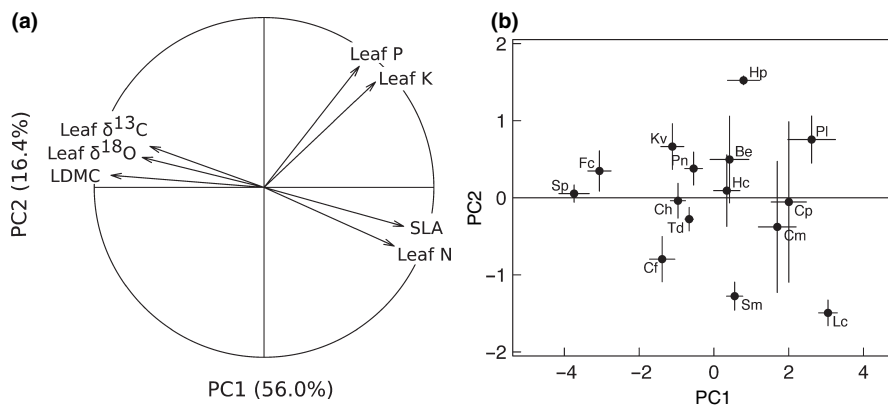


FIGURE 2 Principal component analysis (PCA) of leaf morphological, nutrient and isotopic traits for 15 rangeland species grown in the common garden experiment. Depicted is the projection of leaf trait variables (a) and species mean values (b). Lines in (b) depict the standard error of the mean for Axis 1 and Axis 2 species loadings, respectively. Abbreviations for traits are given in Table 2, and abbreviations for species are given in Table 1

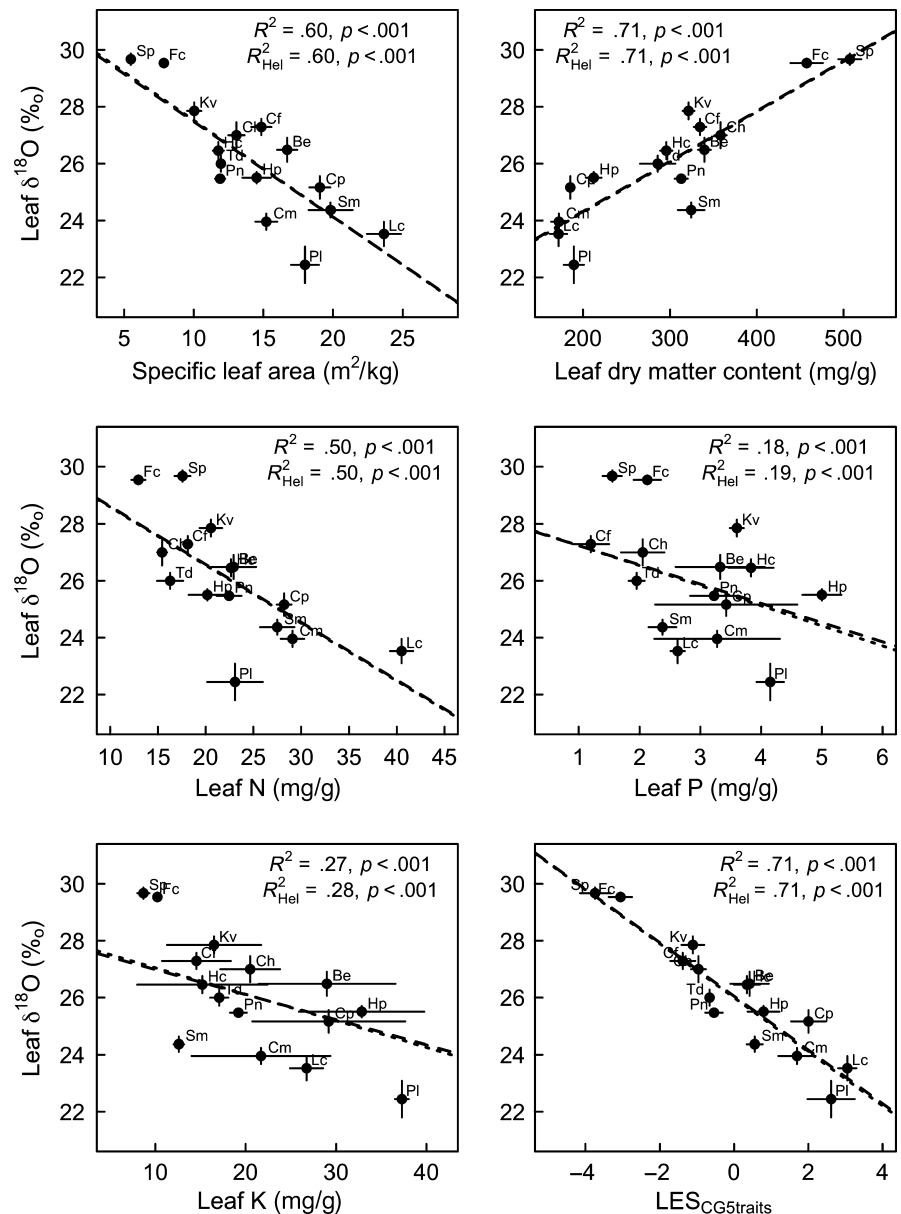


FIGURE 3 Relationships between leaf oxygen isotopic composition ($\delta^{18}\text{O}$), leaf morphological (SLA, LDMC) and nutrient (N, P, K concentrations) traits and the leaf economics spectrum ($\text{LES}_{\text{CG5traits}}$) across 15 rangeland species grown in the common garden experiment. Shown are the regression lines and R^2 values for models with all species (dashed line) and for models excluding *Helianthemum canum* (dotted line, subscript Hel). All models were significant at $p < .001$. Error bars represent ± 1 SEM. Abbreviations for species are given in Table 1

to leaf economics were coordinated as predicted by the LES theory (Díaz et al., 2015; Wright et al., 2004). In addition to the “classic” LES traits and trade-offs aimed at optimizing plant C and nutrient use (Wright et al., 2005), we show here that leaf $\delta^{18}\text{O}$ (proxy of g_s) and $\delta^{13}\text{C}$ (proxy of WUE_i) were tightly linked to resource-use strategies in Mediterranean rangeland species (fast vs. slow, sensu Reich, 2014). Plant species with traits associated with a conservative or slow use of resources (i.e., high LDMC and low leaf nutrient concentrations) had a conservative water-use strategy (high $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{13}\text{C}$). At the opposite end of the continuum are plant species showing a more acquisitive strategy (high SLA and high leaf nutrient concentrations) associated with a profligate and rapid use of water (low $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{13}\text{C}$). This highlights the tight coupling and coordination between water, carbon and nutrient-use strategies across Mediterranean rangeland species and suggests that foliar $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{13}\text{C}$ can be included as an integral part of the LES. Below, we will discuss more in-depth the mechanistic

bases underlying the relationships between isotopic traits, water use and traits associated with C and nutrient use from the LES.

4.2 | Inclusion and relevance of isotopic traits in the LES

Leaf $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{13}\text{C}$ served as reliable indicators of g_s and WUE_i , respectively, as shown by the strong linear relationships observed within the subset of ten target species for which leaf gas exchange data were available. Leaf $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ were positively correlated with each other across species at both the common garden and natural rangelands, which indicates that the wide variation in WUE_i among species is primarily determined by large interspecific differences in stomatal regulation of water loss (Moreno-Gutiérrez et al., 2012). This interpretation is further supported by the observed strong negative correlations between WUE_i and g_s , and between $\delta^{13}\text{C}$ and g_s . On the other

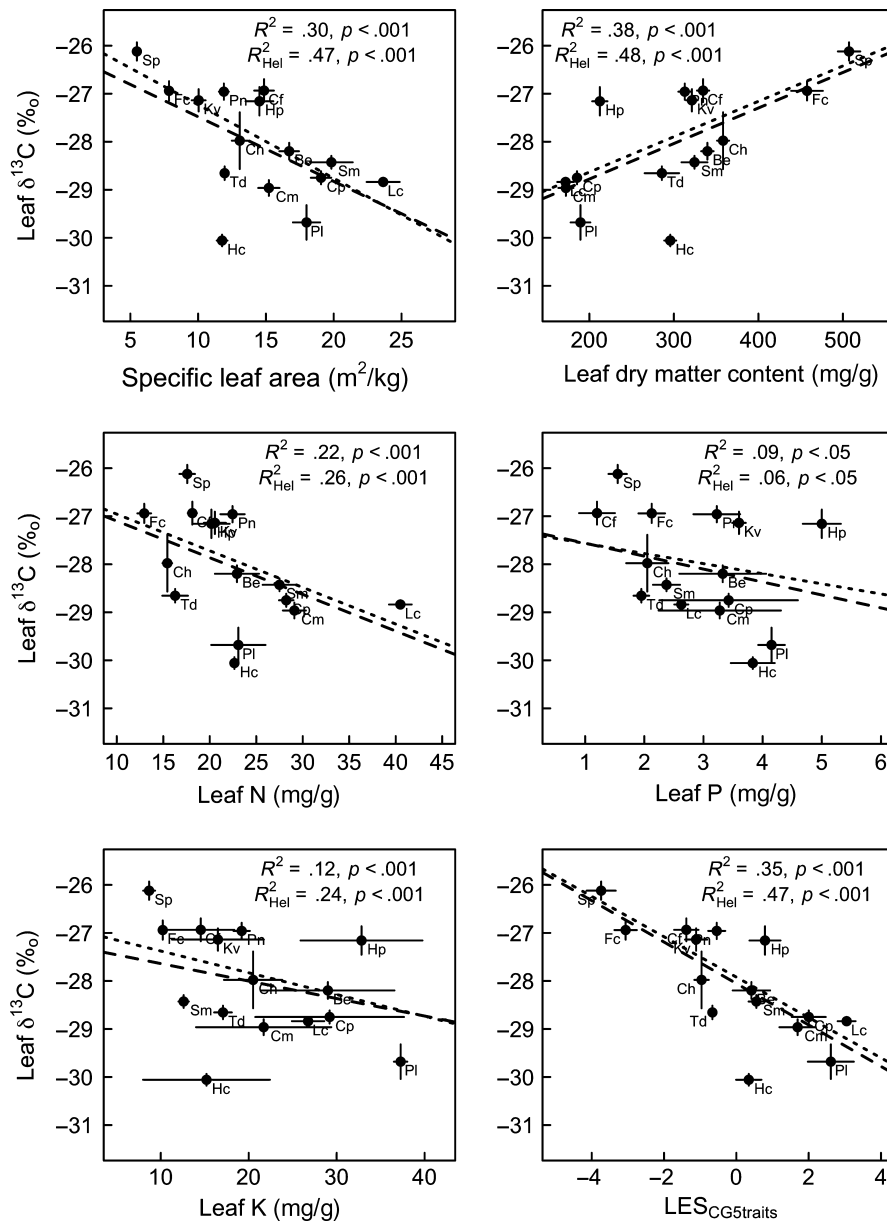


FIGURE 4 Relationships between leaf carbon isotope composition ($\delta^{13}\text{C}$), leaf morphological (SLA, LDMC) and nutrient (N, P, K concentrations) traits and the leaf economics spectrum ($\text{LES}_{\text{CG5traits}}$) across 15 rangeland species grown in the common garden experiment. Shown are regression lines and R^2 values for models with all species (dashed line) and for models excluding *Helianthemum canum* (dotted line, subscript Hel). All models were significant at $p < .001$, except for leaf P ($p < .05$). See Table S5 for details on statistical results. Error bars represent ± 1 SEM. Abbreviations for species are given in Table 1

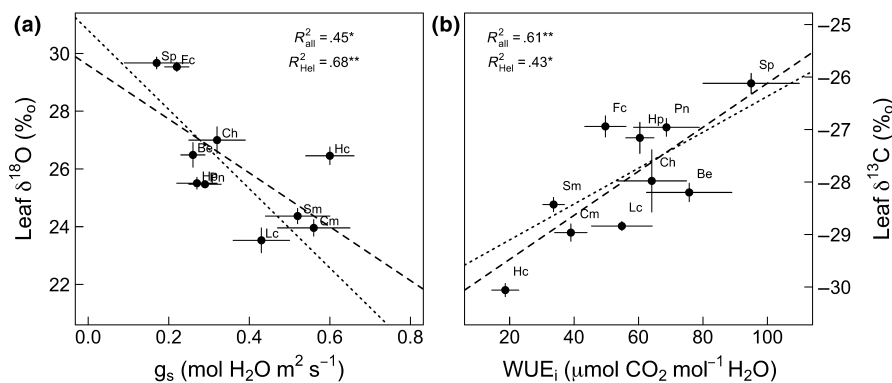


FIGURE 5 Cross-species relationships between (a) leaf oxygen isotope composition ($\delta^{18}\text{O}$) and stomatal conductance (g_s) and (b) leaf carbon isotope composition ($\delta^{13}\text{C}$) and water-use efficiency (WUE_i) measured in a subset of 10 species (see Section 2 sections for details). Shown are Pearson's correlation relationships and coefficients (R) for all species (dashed line) and for all species excluding *Helianthemum canum* (dotted line). Mean values were used for correlation analyses, and error bars represent ± 1 SEM; $^{**}p < .01$; $^*p < .05$; n.s., non-significant. Abbreviations for species are given in Table 1

hand, carbon isotopic fractionation may occur during storage and mobilization of carbohydrates for leaf production, potentially adding noise to the stomatal signal in leaf $\delta^{13}\text{C}$ (Badeck, Tcherkez, Nogués, Piel, & Ghashghaie, 2005). However, any potential post-photosynthetic isotopic fractionation signal was comparatively weak relative to the strong stomatal signal in the $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{13}\text{C}$ of current leaves. Also, it is important to note that cumulative 95% rooting depth values and leaf $\delta^{18}\text{O}$ values were not correlated across species, even after accounting for phylogenetic dependence ($p > .20$ in both cases), so differences in water extraction depth could be ruled out as a major cause of interspecific variation in leaf $\delta^{18}\text{O}$ in the common garden study. Previous studies have also found that water source partitioning is not common in grassland communities, as all the herbaceous species extracted water mostly from shallow soil layers (Bachmann et al., 2015).

To the best of our knowledge, the present study provides the first evidence of a tight cross-species correlation between leaf $\delta^{18}\text{O}$ and integrative morphological/anatomical traits such as SLA and LDMC. The $\delta^{18}\text{O}$ of leaf water and organic matter is determined by the integration of the isotopic gradient that is formed by back-diffusion of ^{18}O -enriched water from the evaporating surfaces (substomatal cavity), against the advective flow of non-enriched water in the transpiration flux (Barbour, 2007; Wang, Yakir, & Avishai, 1998). Similar to our study, Wang et al. (1998) found large non-climatic variations in the $\delta^{18}\text{O}$ of leaf organic matter among coexisting plant species, which led them to conclude that species-specific characteristics (such as g_s , transpiration rates and the effective path length for water movement from the leaf veins to the sites of evaporation) are key determinants of leaf $\delta^{18}\text{O}$ variation across species. We propose that, at the cross-species level, high SLA (and low LDMC) may be associated with higher vascular and mesophyll hydraulic conductivity, lower tortuosity of water pathways in the mesophyll and shorter effective path lengths for water movement. Together with concurrent high stomatal conductance and transpiration rate (which scale inversely with path length; Song, Barbour, Farquhar, Vann, & Helliker, 2013), this may further contribute to low evaporative ^{18}O enrichment of leaf water and organic matter (Barbour, 2017; Kahmen, Simonin, Tu, Goldsmith, & Dawson, 2009; Kahmen et al., 2008; Roden, Kahmen, Buchmann, & Siegwolf, 2015). The mechanistic link between leaf morphological/anatomical features and effective path length for water movement within leaves (which influences $\delta^{18}\text{O}$) has been examined by several studies, but remains elusive to date (Kahmen et al., 2008, 2009). Recent studies have shown links between ^{18}O enrichment of leaf water and leaf traits not included in classical LES studies, such as stomatal or vein density (Holloway-Phillips et al., 2016; Larcher, Hara-Nishimura, & Sternberg, 2015).

Many studies, including ours, have reported positive correlations between $\delta^{13}\text{C}$ and LMA (the inverse of SLA) within and across species (Mason & Donovan, 2015; Navas et al., 2010; Vitousek, Field, & Matson, 1990). The positive association between $\delta^{13}\text{C}$ and LMA is thought to be driven by an increase in the length of the internal CO_2 diffusion pathway from the stomata to the chloroplasts in thicker leaves, which reduces CO_2 supply at the sites of carboxylation (Hultine & Marshall, 2000), and by lower mesophyll conductance to CO_2 in leaves with a more densely packed mesophyll per unit area (Tomás

et al., 2013). Another mechanism behind the positive correlation between $\delta^{13}\text{C}$ and LMA may be that thicker leaves contain a greater amount of photosynthetic enzymes and thus have greater demand for CO_2 per unit area (Hultine & Marshall, 2000).

Here, we also provide evidence of a tight cross-species negative correlation between leaf isotopic composition ($\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{13}\text{C}$) and leaf nutrient concentrations (N, P and K; see Werner & Máguas, 2010). However, whether interspecific differences in g_s and WUE_i are the cause or the effect of interspecific differences in leaf nutrient concentrations remains unclear. On the one hand, a profligate water-use strategy characterized by high stomatal conductance and cumulative transpiration (resulting in low leaf $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{13}\text{C}$) may help achieve high leaf nutrient status through enhanced transpiration-driven mass flow of soil nutrients to roots and uptake of dissolved nutrients. The ability to sustain high g_s when soil moisture is optimal may be an effective strategy for nutrient harvesting under a dry Mediterranean climate (Cramer, Hawkins, & Verboom, 2009). Negative correlations of leaf nutrient concentrations with $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{13}\text{C}$ at the within-species level have been reported before as a plastic response to contrasting nutrient availabilities (Cernusak, Winter, Aranda, Turner, & Marshall, 2007; Masle, Farquhar, & Wong, 1992), but few studies have shown these relationships at the interspecific level. On the other hand, leaf nutrient concentrations, in particular nitrogen, and photosynthetic capacity are strongly and positively correlated (Field, Merino, & Mooney, 1983); a high time-integrated stomatal conductance (low leaf $\delta^{18}\text{O}$) would then be needed to minimize stomatal constraints on photosynthesis and to thereby achieve the full potential for high carbon assimilation rates in species with high leaf nutrient concentrations, as suggested by the inverse correlation of leaf $\delta^{18}\text{O}$ with photosynthetic rates in our study. High g_s is often coordinated with high leaf hydraulic conductivity and mesophyll conductance to CO_2 (Ferrio et al., 2012; Flexas et al., 2013; Scoffoni et al., 2016), which may further contribute to achieving higher A in species with low $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ values. This implies that higher leaf $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{13}\text{C}$ and tighter stomatal control of transpiration may be generally accompanied by lower photosynthetic rates across Mediterranean rangeland species (due to the frequently observed trade-off between WUE_i and A_{max} ; Flexas et al., 2012, 2016).

One species, *H. canum*, deviated slightly from the general pattern outlined above with comparatively low leaf $\delta^{13}\text{C}$ values despite having intermediate $\delta^{18}\text{O}$ and LES values. *Helianthemum canum* is a drought-resistant chamaephyte in which low mesophyll conductance to CO_2 may have led to lower photosynthetic rates than those expected from its leaf $\delta^{18}\text{O}$ values (Seibt et al., 2008; Werner et al., 2012). Nonetheless, the relationships of leaf $\delta^{18}\text{O}$ with LES traits were generally more robust than those with leaf $\delta^{13}\text{C}$, supporting the use of a dual isotope approach to investigate plant resource-use strategies (Moreno-Gutiérrez et al., 2012).

4.3 | Applicability of this approach under natural conditions

It could be argued that the results obtained in the common garden experiment might be context-dependent, given that the

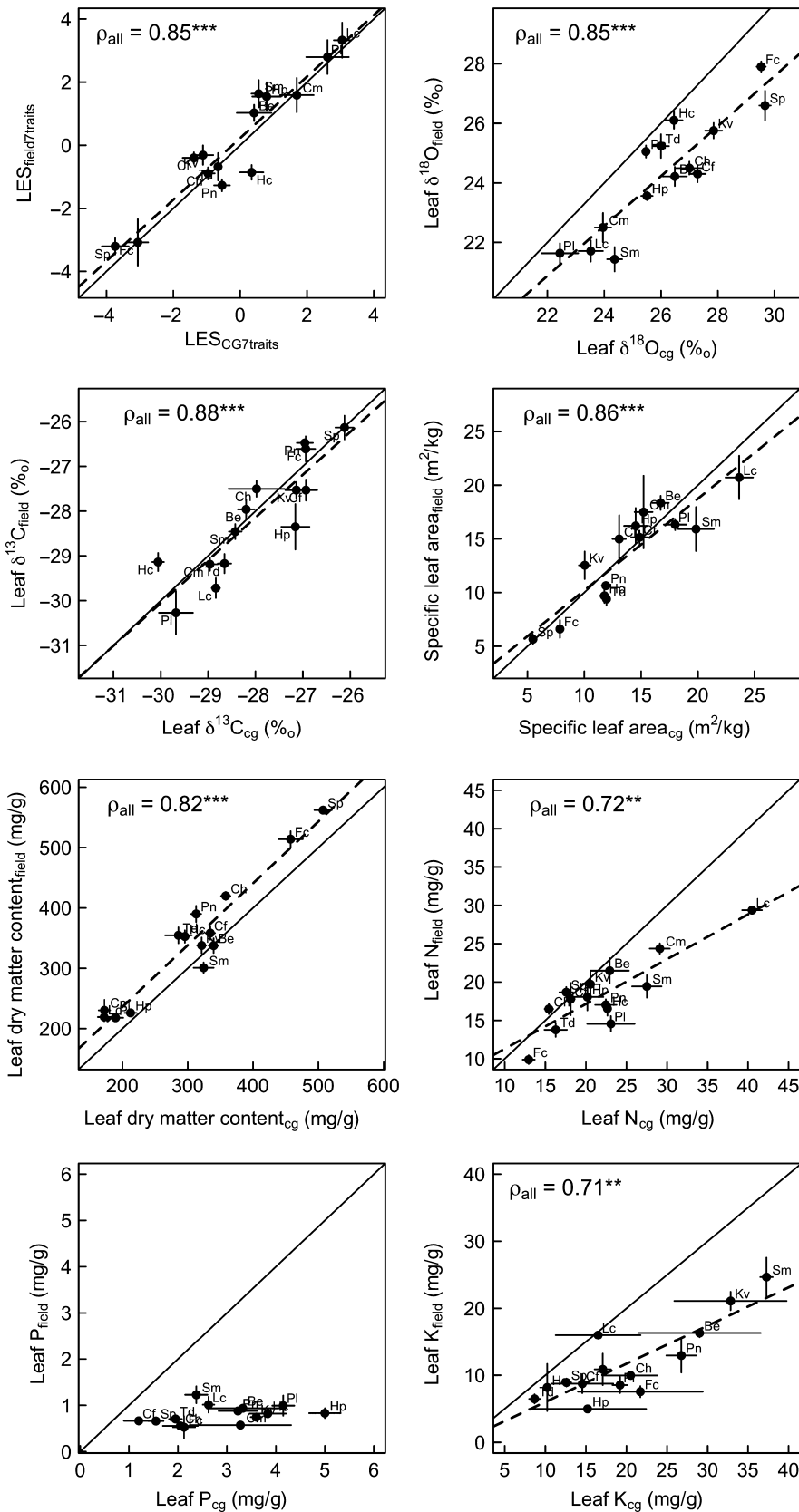


FIGURE 6 Pairwise Spearman's rank relationships between the leaf economics spectrum scores with seven traits ($LES_{CG7traits}$), leaf carbon and oxygen isotope composition ($\delta^{13}C$, $\delta^{18}O$), leaf morphological (SLA, LDMC) and nutrient (N, P, K concentrations) traits measured in 14 rangeland species in the common garden experiment in 2012 (subscript cg) and the same leaf traits measured in the same set of species in natural rangelands in 2010 (subscript field). Shown are correlation lines and Spearman's rank rho (ρ) and p-values ($^{***}p < .001$; $^{**}p < .01$). Values are $M \pm 1\ SEM$. Abbreviations for species are given in Table 1

rangeland species were grown in monocultures and under non-limiting water supply. Thus, to test the generality of our results, we also measured leaf trait values and their covariation in 14 of the

same species growing in natural Mediterranean rangelands spanning a gradient of soil nutrients and water availability (Bernard-Verdier et al., 2012). Despite large between-site differences in

environmental and soil conditions, leaf trait syndromes (including leaf $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$) and resource-use strategies were remarkably conserved across sites. The species LES_{CG} scores in the common garden experiment were similar to the $\text{LES}_{\text{field}}$ scores of species in natural rangelands ($\rho = 0.85$), suggesting that trait covariations and the integration of leaf isotopes in the LES were largely independent of the growing conditions. Moreover, species values for all the individual leaf traits and nutrients (except leaf P) also showed similar relative rankings among species at both sites. The mean species trait values, however, differed between sites for some of the traits measured. Leaf $\delta^{18}\text{O}$ values were considerably more depleted in the natural rangelands than in the common garden experiment. This offset in $\delta^{18}\text{O}$ values can be explained by the difference in altitude between the common garden site (100 m.a.s.l.) and the INRA La Fage experimental station (790 m.a.s.l.) that would result in cooler and more humid climatic conditions at La Fage, as well as more depleted $\delta^{18}\text{O}$ values in rainwater and thus a more ^{18}O -depleted source water (Dansgaard, 1964). Similarly, species had lower leaf N, P and K concentrations and higher LDMC in natural grasslands than in the common garden, which likely resulted from a plastic adaptation to lower soil fertility and a higher herbivore pressure since these natural grasslands are subjected to sheep grazing (Bernard-Verdier et al., 2012). Leaf $\delta^{13}\text{C}$ and SLA values did not differ between the two contrasting sites. This is consistent with other studies reporting well-conserved species rankings in leaf traits between sites (or across scales), but with larger differences for LDMC and leaf nutrient concentrations than for $\delta^{13}\text{C}$ or SLA (Garnier et al., 2001). In the field, spatial heterogeneity in soil pH and nutrient availability (supplementary material in Pérez-Ramos et al., 2012) led to prevalence of species with similar strategies in poorer or richer plots, thereby dampening the observed relationships, which may explain why leaf nutrient concentrations were not as closely related to the LES (first axis of the PCA) as in the common garden.

4.4 | Dual isotopic approach ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$)

The present and previous studies (Moreno-Gutiérrez et al., 2012) demonstrate that a dual isotopic approach combining leaf $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ can be useful to assess the water-use strategies of plant species at local scales where climatic and environmental spatial variability is negligible. Leaf $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ can be easily measured, allowing for more extensive studies at broader temporal or spatial scales than conventional leaf gas exchange measurements. Moreover, species relative rankings for both leaf $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ were highly conserved across sites with contrasting climate and environmental conditions (despite large between-site offsets for $\delta^{18}\text{O}$ values), thereby supporting the interpretation of both leaf $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ as at least partly inherent species-specific traits (Wang et al., 1998). These advantages could make this approach suitable for broad-scale studies aiming at integrating leaf water use within the LES theory framework for large sets of species for which data on leaf traits are already available (e.g., Kattge et al., 2011). However, adopting such an approach across broader

spatiotemporal scales spanning large altitudinal and/or latitudinal gradients would require accounting for the effects of climatic variation and differences in plant source water $\delta^{18}\text{O}$, which can lead to large inter-site offsets in leaf $\delta^{18}\text{O}$ values.

In conclusion, our results indicate that leaf $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{13}\text{C}$ provide useful tools for assessing plant water-use strategies, and can be considered major components of functional diversity in Mediterranean rangeland plant communities, which may allow the inclusion of water as an additional complementary dimension of the LES (Craine & Dybzinski, 2013). Whether the strong patterns reported in this study could be generalizable to other plant functional and ecosystem types with different evolutionary pressures (e.g., wetter and/or more fertile environments) or across broader spatial and environmental gradients is an intriguing possibility that warrants further research.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Pascal Chapon and Alain Blanchard for their help in setting up and managing the common garden experiment, the technical staff of the experimental station "INRA La Fage" for the facilities and support provided during the fieldwork, the staff of the Plateforme d'Analyses Chimiques en Ecologie (PACE) and of the CEFÉ experimental field (technical facilities of the Labex Centre Méditerranéen de l'Environnement et de la Biodiversité, CEMEB) and Cyrille Violle for lending us the Li-Cor 6400. We are thankful to Todd Dawson, Stefania Mambelli and Wenbo Yang at the Centre for Stable Isotope Biogeochemistry (University of California, Berkeley, USA) for help with $\delta^{18}\text{O}$ analyses and to the Technical Platform of Functional Ecology (OC 081) at the Forest Ecology and Ecophysiology Unit (INRA, Toulouse, France) for $\delta^{13}\text{C}$ analyses. Iván Prieto acknowledges support from the "Juan de la Cierva" programme of the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (Grant Number FPD1-2013-16221). This work was funded by the Agence National de la Recherche (Projects O2LA, ANR-09-STRA-09 and Ecosfix, ANR-10-STRA-003-001), by the Agropolis Foundation (Rhizopolis Project No. 1001-005) and the Ministerio de Ciencia e Innovación (Grant Numbers CGL2010-21064 and CGL2013-48753-R).

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

I.P., F.V. and C.R. planned and designed the research; I.P., J.S. and C.R. conducted the fieldwork; I.P., C.R. and J.I.Q. measured, analysed and interpreted the data; J.S. helped constructing the phylogenetic tree; I.P. compiled and analysed the data and wrote the manuscript, and all authors contributed to the final version.

DATA ACCESSIBILITY

Data available from the Dryad Digital Repository <https://doi.org/10.5061/dryad.n848j> (Prieto, Querejeta, Segrestin, Volaire, & Roumet, 2017).

ORCID

Iván Prieto  <http://orcid.org/0000-0001-5549-1132>

José I. Querejeta  <http://orcid.org/0000-0002-9547-0974>

Jules Segrestin  <http://orcid.org/0000-0001-7661-6061>

Florence Volaire  <http://orcid.org/0000-0002-7011-6557>

Catherine Roumet  <http://orcid.org/0000-0003-1320-9770>

REFERENCES

- Angiosperm Phylogeny Group III. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161, 105–121.
- Bachmann, D., Gockele, A., Ravenek, J. M., Roscher, C., Strecker, T., Weigelt, A., & Buchmann, N. (2015). No evidence of complementary water use along a plant species richness gradient in temperate experimental grasslands. *PLoS ONE*, 10, e0116367. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116367>
- Badeck, F. W., Tcherkez, G., Nogués, S., Piel, C., & Ghashghaie, J. (2005). Post-photosynthetic fractionation of stable carbon isotopes between plant organs – A widespread phenomenon. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19, 1381–1391. [https://doi.org/10.1002/\(ISSN\)1097-0231](https://doi.org/10.1002/(ISSN)1097-0231)
- Barbour, M. M. (2007). Stable oxygen isotope composition of plant tissue: A review. *Functional Plant Biology*, 34, 83–94. <https://doi.org/10.1071/FP06228>
- Barbour, M. M. (2017). Understanding regulation of leaf internal carbon and water transport using online stable isotope techniques. *New Phytologist*, 213, 83–88. <https://doi.org/10.1111/nph.14171>
- Barbour, M. M., & Farquhar, G. D. (2000). Relative humidity- and ABA-induced variation in carbon and oxygen isotope ratios of cotton leaves. *Plant, Cell and Environment*, 23, 473–485. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2000.00575.x>
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S., Christensen, R. H. B., Singmann, H., ... Grothendieck, G. (2015) Linear mixed-effects models using “Eigen” and S4. R package version 1.1-11.
- Bernard-Verdier, M., Navas, M. L., Vellend, M., Violle, C., Fayolle, A., & Garnier, E. (2012). Community assembly along a soil depth gradient: Contrasting patterns of plant trait convergence and divergence in a Mediterranean rangeland. *Journal of Ecology*, 100, 1422–1433. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12003>
- Blonder, B., Vasseur, F., Violle, C., Shipley, B., Enquist, B. J., & Vile, D. (2015). Testing models for the leaf economics spectrum with leaf and whole-plant traits in *Arabidopsis thaliana*. *AoB Plants*, 7, plv049. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plv049>
- Blonder, B., Violle, C., & Enquist, B. J. (2013). Assessing the causes and scales of the leaf economics spectrum using venation networks in *Populus tremuloides*. *Journal of Ecology*, 101, 981–989. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12102>
- Brodribb, T. J., & Feild, T. S. (2010). Leaf hydraulic evolution led a surge in leaf photosynthetic capacity during early angiosperm diversification. *Ecology Letters*, 13, 175–183. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01410.x>
- Brodribb, T. J., Feild, T. S., & Jordan, G. J. (2007). Leaf maximum photosynthetic rate and venation are linked by hydraulics. *Plant Physiology*, 144, 1890–1898. <https://doi.org/10.1104/pp.107.101352>
- Cernusak, L. A., Winter, K., Aranda, J., Turner, B. L., & Marshall, J. D. (2007). Transpiration efficiency of a tropical pioneer tree (*Ficus insipida*) in relation to soil fertility. *Journal of Experimental Botany*, 58, 3549–3566. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm201>
- Chessel, D., Dufour, A. B., & Thioulouse, J. (2004). The ade4 package-I: One-table methods. *R News*, 4, 5–10.
- Craine, J. M., & Dybzinski, R. (2013). Mechanisms of plant competition for nutrients, water and light. *Functional Ecology*, 27, 833–840. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12081>
- Cramer, M., Hawkins, H.-J., & Verboom, G. (2009). The importance of nutritional regulation of plant water flux. *Oecologia*, 161, 15–24. <https://doi.org/10.1007/s00442-009-1364-3>
- Daget, P. (1977). Le bioclimat méditerranéen: caractères généraux, modes de caractérisation. *Vegetatio*, 34, 1–20. <https://doi.org/10.1007/BF00119883>
- Dansgard, B. W. (1964). Stable isotopes in precipitation. *Tellus*, 16, 436–468.
- Davies, T. J., Barraclough, T. G., Chase, M. W., Soltis, P. S., Soltis, D. E., & Savolainen, V. (2004). Darwin's abominable mystery: Insights from a supertree of the angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 1904–1909. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308127100>
- Dawson, T. E., Mambelli, S., Plamboeck, A. J., Templer, P. H., & Tu, K. P. (2002). Stable isotopes in plant ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33, 507–559. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.33.020602.095451>
- Díaz, S., Kattge, J., Cornelissen, J. H. C., Wright, I. J., Lavorel, S., Dray, S., ... Gorné, L. D. (2015). The global spectrum of plant form and function. *Nature*, 529, 1–17.
- Donovan, L. A., Maherali, H., Caruso, C. M., Huber, H., & de Kroon, H. (2011). The evolution of the worldwide leaf economics spectrum. *Trends in Ecology & Evolution*, 26, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.11.011>
- Farquhar, G. D., Ehleringer, I. J. R., Hubick, K. T., City, S. L., Farquhar, G. D., Ehleringer, I. J. R., & Hubick, K. T. (1989). Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40, 503–537. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.40.060189.002443>
- Ferrio, J. P., Pou, A., Florez-Sarasa, I., Gessler, A., Kodama, N., Flexas, J., & Ribas-Carbo, M. (2012). The Péclét effect on leaf water enrichment correlates with leaf hydraulic conductance and mesophyll conductance for CO₂. *Plant, Cell and Environment*, 35, 611–625. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02440.x>
- Field, C., Merino, J., & Mooney, H. (1983). Compromises between water-use efficiency and nitrogen-use efficiency in five species of California evergreens. *Oecologia*, 60, 384–389. <https://doi.org/10.1007/BF00376856>
- Flexas, J., Barbour, M. M., Brendel, O., Cabrera, H. M., Carriqui, M., Díaz-Espejo, A., ... Warren, C. R. (2012). Mesophyll diffusion conductance to CO₂: An unappreciated central player in photosynthesis. *Plant Science*, 193–194, 70–84. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.05.009>
- Flexas, J., Díaz-Espejo, A., Conesa, M. A., Coopman, R. E., Douthe, C., Gago, J., ... Niinemets, U. (2016). Mesophyll conductance to CO₂ and Rubisco as targets for improving intrinsic water use efficiency in C3 plants. *Plant, Cell and Environment*, 39, 965–982. <https://doi.org/10.1111/pce.12622>
- Flexas, J., Scoffoni, C., Gago, J., & Sack, L. (2013). Leaf mesophyll conductance and leaf hydraulic conductance: An introduction to their measurement and coordination. *Journal of Experimental Botany*, 64, 3965–3981. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert319>
- Flores, O., Garnier, E., Wright, I. J., Reich, P. B., Pierce, S., Díaz, S., ... Weiher, E. (2014). An evolutionary perspective on leaf economics: Phylogenetics of leaf mass per area in vascular plants. *Ecology and Evolution*, 4, 2799–2811. <https://doi.org/10.1002/ece3.1087>
- Fort, F., Volaire, F., Guillioni, L., Barkaoui, K., Navas, M. L., & Roumet, C. (2017). Root traits are related to plant water-use among rangeland Mediterranean species. *Functional Ecology*, 31, 1700–1709. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12888>
- Fox, J., Weisberg, S., Friendly, M., Hong, J., Andersen, R., Firth, D., & Taylor, S. (2014). Effect displays for linear, generalized linear, and other models. *Journal of Statistical Software*, 8, 1–27.

- Garnier, E., Laurent, G., Bellmann, A., Debain, S., Berthelier, P., Ducout, B., ... Navas, M. L. (2001). Consistency of species ranking based on functional leaf traits. *New Phytologist*, 152, 69–83. <https://doi.org/10.1046/j.0028-646x.2001.00239.x>
- Grams, T. E. E., Kozovits, A. R., Häberle, K. H., Matyssek, R., & Dawson, T. E. (2007). Combining $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ analyses to unravel competition, CO_2 and O_3 effects on the physiological performance of different-aged trees. *Plant Cell and Environment*, 30, 1023–1034. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01696.x>
- Harell, F. E. Jr (2015). Hmisc: Harrell miscellaneous. R package version 3.17-2.
- Holloway-Phillips, M., Cernusak, L. A., Barbour, M., Song, X., Cheesman, A., Munksgaard, N., ... Farquhar, G. D. (2016). Leaf vein fraction influences the Péclét effect and ^{18}O enrichment in leaf water. *Plant Cell and Environment*, 39, 2414–2427. <https://doi.org/10.1111/pce.12792>
- Hultine, K. R., & Marshall, J. D. (2000). Altitudinal trends in conifer leaf morphology and stable carbon isotope composition. *Oecologia*, 123, 32–40. <https://doi.org/10.1007/s004420050986>
- Kahmen, A., Simonin, K., Tu, K., Goldsmith, G. R., & Dawson, T. E. (2009). The influence of species and growing conditions on the ^{18}O enrichment of leaf water and its impact on effective path length? *New Phytologist*, 184, 619–630. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03008.x>
- Kahmen, A., Simonin, K., Tu, K. P., Merchant, A., Callister, A., Siegwolf, R., ... Arndt, S. K. (2008). Effects of environmental parameters, leaf physiological properties and leaf water relations on leaf water $\delta^{18}\text{O}$ enrichment in different *Eucalyptus* species. *Plant Cell and Environment*, 31, 738–751. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01784.x>
- Kattge, J., Díaz, S., Lavorel, S., Prentice, I. C., Leadley, P., Bönsch, G., ... Wirth, C. (2011). TRY – A global database of plant traits. *Global Change Biology*, 17, 2905–2935. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2011.02451.x>
- Larcher, L., Hara-Nishimura, I., & Sternberg, L. (2015). Effects of stomatal density and leaf water content on the ^{18}O enrichment of leaf water. *New Phytologist*, 206, 141–151. <https://doi.org/10.1111/nph.13154>
- Li, L., McCormack, M. L., Ma, C., Kong, D., Zhang, Q., Chen, X., ... Guo, D. (2015). Leaf economics and hydraulic traits are decoupled in five species-rich tropical-subtropical forests. *Ecology Letters*, 18, 899–906. <https://doi.org/10.1111/ele.12466>
- Masle, J., Farquhar, G. D., & Wong, S. C. (1992). Transpiration ratio and plant mineral content are related among genotypes of a range of species. *Australian Journal of Plant Physiology*, 19, 709–721. <https://doi.org/10.1071/PP9920709>
- Mason, C. M., & Donovan, L. A. (2015). Evolution of the leaf economics spectrum in herbs: Evidence from environmental divergences in leaf physiology across *Helianthus* (Asteraceae). *Evolution*, 69, 2705–2720. <https://doi.org/10.1111/evo.12768>
- Moreno-Gutiérrez, C., Dawson, T. E., Nicolás, E., & Querejeta, J. I. (2012). Isotopes reveal contrasting water use strategies among coexisting plant species in a Mediterranean ecosystem. *New Phytologist*, 196, 489–496. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04276.x>
- Nakagawa, S., & Schielzeth, H. (2013). A general and simple method for obtaining R^2 from generalized linear mixed-effects models. *Methods in Ecology and Evolution*, 4, 133–142. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210x.2012.00261.x>
- Navas, M. L., Roumet, C., Bellmann, A., Laurent, G., & Garnier, E. (2010). Suites of plant traits in species from different stages of a Mediterranean secondary succession. *Plant Biology*, 12, 183–196. [https://doi.org/10.1111/\(ISSN\)1438-8677](https://doi.org/10.1111/(ISSN)1438-8677)
- Paradis, E. (2012). *Analysis of phylogenetics and evolution with R*. New York, NY: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1743-9>
- Paradis, E., Claude, J., & Strimmer, K. (2004). APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*, 20, 289–290. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg412>
- Pérez-Harguindeguy, N., Díaz, S., Garnier, E., Lavorel, S., Poorter, H., Jaureguiberry, P., ... Cornelissen, J. H. C. (2013). New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany*, 61, 167.
- Pérez-Ramos, I. M., Roumet, C., Cruz, P., Blanchard, A., Autran, P., & Garnier, E. (2012). Evidence for a “plant community economics spectrum” driven by nutrient and water limitations in a Mediterranean rangeland of southern France. *Journal of Ecology*, 100, 1315–1327. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12000>
- Pinheiro, J. C., Bates, D. M., DebRoy, S., & Sarkar, D.; R Core Team. (2014). Linear and nonlinear mixed effects models. R package version 3.1-125.
- Prieto, I., Querejeta, J. I., Segrestin, J., Volaire, F., & Roumet, C. (2017). Data from: Leaf carbon and oxygen isotopes are coordinated with the leaf economics spectrum in Mediterranean rangeland species. *Dryad Digital Repository*, <https://doi.org/10.5061/dryad.n848j>
- R Development Core Team. (2013). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Development Core Team.
- Ramirez, D. A., Querejeta, J. I., & Bellot, J. (2009). Bulk leaf $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{13}\text{C}$ reflect the intensity of intraspecific competition for water in a semi-arid tussock grassland. *Plant Cell and Environment*, 32, 1346–1356. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02002.x>
- Reich, P. B. (2014). The world-wide “fast-slow” plant economics spectrum: A traits manifesto. *Journal of Ecology*, 102, 275–301. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12211>
- Revell, L. J. (2012). Phytools: An R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution*, 3, 217–223. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2011.00169.x>
- Roden, J., Kahmen, A., Buchmann, N., & Siegwolf, R. (2015). The enigma of effective path length for ^{18}O enrichment in leaf water of conifers. *Plant, Cell and Environment*, 38, 2551–2565. <https://doi.org/10.1111/pce.12568>
- Rozanski, K., Araguás-Araguás, L., & Gonfiantini, R. (1993). Isotopic patterns in modern global precipitation. *Climate Change in Continental Isotopic Records*, 78, 1–36.
- Sack, L., & Holbrook, N. M. (2006). Leaf hydraulics. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 361–381. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144141>
- Sack, L., & Scoffoni, C. (2013). Leaf venation: Structure, function, development, evolution, ecology and applications in the past, present and future. *New Phytologist*, 198, 983–1000. <https://doi.org/10.1111/nph.12253>
- Sandquist, D. R., & Cordell, S. (2007). Functional diversity of carbon-gain, water-use, and leaf-allocation traits in trees of a threatened lowland dry forest in Hawaii. *American Journal of Botany*, 94, 1459–1469. <https://doi.org/10.3732/ajb.94.9.1459>
- Scheidegger, Y., Saurer, M., Bahn, M., & Siegwolf, R. (2000). Linking stable oxygen and carbon isotopes with stomatal conductance and photosynthetic capacity: A conceptual model. *Oecologia*, 125, 350–357. <https://doi.org/10.1007/s004420000466>
- Scoffoni, C., Chatelet, D. S., Pasquet-kok, J., Rawls, M., Donoghue, M. J., Edwards, E. J., & Sack, L. (2016). Hydraulic basis for the evolution of photosynthetic productivity. *Nature Plants*, 2, 16072. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.72>
- Seibt, U., Rajabi, A., Griffiths, H., & Berry, J. A. (2008). Carbon isotopes and water use efficiency: Sense and sensitivity. *Oecologia*, 155, 441–454. <https://doi.org/10.1007/s00442-007-0932-7>
- Song, X., Barbour, M. M., Farquhar, G. D., Vann, D. R., & Helliker, B. R. (2013). Transpiration rate relates to within- and across-species variations in effective path length in a leaf water model of oxygen isotope enrichment. *Plant, Cell & Environment*, 36, 1338–1351. <https://doi.org/10.1111/pce.12063>
- Tomás, M., Flexas, J., Copolovici, L., Galmés, J., Hallik, L., Medrano, H., ... Niinemets, Ü. (2013). Importance of leaf anatomy in determining mesophyll diffusion conductance to CO_2 across species: Quantitative limitations and scaling up by models. *Journal of Experimental Botany*, 64, 2269–2281. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert086>

- Vitousek, P. M., Field, C. B., & Matson, P. A. (1990). Variation in foliar $\delta^{13}\text{C}$ in Hawaiian *Metrosideros polymorpha*: A case of internal resistance? *Oecologia*, 84, 362–370. <https://doi.org/10.1007/BF00329760>
- Wang, X. F., Yakir, D., & Avishai, M. (1998). Non-climatic variations in the oxygen isotopic compositions of plants. *Global Change Biology*, 4, 835–849. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2486.1998.00197.x>
- Werner, C., & Máguas, C. (2010). Carbon isotope discrimination as a tracer of functional traits in a mediterranean macchia plant community. *Functional Plant Biology*, 37, 467–477. <https://doi.org/10.1071/FP09081>
- Werner, C., Schnyder, H., Cuntz, M., Keitel, C., Zeeman, M. J., Dawson, T. E., ... Gessler, A. (2012). Progress and challenges in using stable isotopes to trace plant carbon and water relations across scales. *Biogeosciences*, 9, 3083–3111. <https://doi.org/10.5194/bg-9-3083-2012>
- Wikström, N., Savolainen, V., & Chase, M. W. (2001). Evolution of the angiosperms: Calibrating the family tree. *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences*, 268, 2211–2220. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1782>
- Wright, I. J., Reich, P. B., Cornelissen, J. H. C., Falster, D. S., Garnier, E., Hikosaka, K., ... Westoby, M. (2005). Assessing the generality of global leaf trait relationships. *New Phytologist*, 166, 485–496. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01349.x>
- Wright, I. J., Reich, P. B., Westoby, M., Ackerly, D. D., Baruch, Z., Bongers, F., ... Villar, R. (2004). The worldwide leaf economics spectrum. *Nature*, 428, 821–827. <https://doi.org/10.1038/nature02403>

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Prieto I, Querejeta JI, Segrestin J, Volaire F, Roumet C. Leaf carbon and oxygen isotopes are coordinated with the leaf economics spectrum in Mediterranean rangeland species. *Funct Ecol*. 2017;00:1–14. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13025>

Supplementary material

TABLE S1 | Trait loadings for the principal components analyses (PCAs) performed on species grown in the common garden experiment and in natural rangelands, using seven or five traits (excluding leaf isotopic traits, $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$). The percentage of variance explained by each of the first three axes in the PCAs is shown in brackets. Significant loadings are shown in bold according to Richmann et al. (1988).

Traits	Common garden experiment						Natural rangelands		
	PCA with 7 traits			PCA with 5 traits			PCA with 7 traits		
	PC1 (56.0%)	PC2 (16.4%)	PC3 (8.6%)	PC1 (60.8%)	PC2 (22.1%)	PC3 (8.5%)	PC1 (58.3%)	PC2 (14.5%)	PC3 (11.7%)
SLA	0.85	-0.31	-0.26	0.85	-0.40	0.21	0.84	0.23	0.03
LDMC	-0.90	0.06	-0.03	-0.88	0.12	-0.01	-0.92	-0.01	-0.23
Leaf N	0.77	-0.34	-0.42	0.79	-0.45	-0.31	0.55	0.69	-0.32
Leaf P	0.56	0.73	-0.04	0.62	0.68	-0.37	0.57	-0.28	-0.71
Leaf K	0.67	0.59	-0.10	0.73	0.52	0.38	0.57	-0.68	-0.09
$\delta^{13}\text{C}$	-0.72	0.14	-0.43	-	-	-	-0.77	0.17	-0.38
$\delta^{18}\text{O}$	-0.72	0.18	-0.41	-	-	-	-0.89	-0.12	-0.10

TABLE S2 | Summary statistics for the relationships between the oxygen isotope composition of leaves ($\delta^{18}\text{O}$) and leaf traits and leaf economic spectrum scores ($\text{LES}_{\text{CG5 traits}}$) across 15 rangeland species grown in the common garden experiment. The model is a general linear mixed model (GLMM) with each corresponding trait as a fixed continuous factor and *block* as a random effect. Chi-square (χ^2), degrees of freedom (df) and significance (*p*-value) are shown for the fixed effects and variance and standard deviation for random effects were below 0.0001 in all models. To comply with normality assumptions, leaf N was log-scaled and leaf K was squared root-scaled.

	All species (n=57-60)			Without <i>Helianthemum canum</i> (n=50-52)		
	χ^2	df	<i>p</i> -value	χ^2	df	<i>p</i> -value
SLA	87.85	1	<0.001	99.71	1	<0.001
LDMC	141.07	1	<0.001	136.01	1	<0.001
Leaf N	57.12	1	<0.001	54.95	1	<0.001
Leaf P	12.26	1	<0.001	12.27	1	<0.001
Leaf K	21.50	1	<0.001	20.92	1	<0.001
$\text{LES}_{5 \text{ traits}}$	144.1	1	<0.001	134.93	1	<0.001

TABLE S3 | Summary statistics, corrected phylogenetically (PICs), for the relationships between the oxygen isotope composition of leaves ($\delta^{18}\text{O}$) and leaf traits and leaf economic spectrum scores ($\text{LES}_{\text{CG5 traits}}$) across 15 rangeland species grown in the common garden experiment. F-values (**F**), degrees of freedom (df) and significance (*p*-value) are shown. Leaf N was log-scaled and leaf K was squared root-scaled.

	All species (n=15)			Without <i>Helianthemum canum</i> (n=14)		
	<i>Fixed effects</i>			<i>Fixed effects</i>		
	F	df	<i>p</i>-value	F	df	<i>p</i>-value
SLA	25.47	1	<0.001	22.65	1	<0.001
LDMC	17.30	1	<0.01	15.82	1	<0.01
Leaf N	9.70	1	<0.01	8.80	1	<0.05
Leaf P	5.06	1	<0.05	5.78	1	<0.05
Leaf K	31.38	1	<0.001	28.15	1	<0.001
LES_{5traits}	69.79	1	<0.001	64.61	1	<0.001

TABLE S4 | Summary statistics for the relationships between the carbon isotope composition of leaves ($\delta^{13}\text{C}$) and leaf traits and leaf economic spectrum scores ($\text{LES}_{\text{CG5traits}}$) across 15 rangeland species grown in the common garden experiment. The model is a general linear mixed model (GLMM) with each corresponding trait as a fixed continuous factor and *block* as a random effect. Chi-square (**χ^2**), degrees of freedom (df) and significance (*p*-value) are shown for the fixed effects and variance and standard deviation for random effects were below 0.0001 in all models. To comply with normality assumptions, leaf N was log-scaled and leaf K was squared root-scaled.

	All species (57-60)			Without <i>Helianthemum canum</i> (50-52)		
	<i>Fixed effects</i>			<i>Fixed effects</i>		
	χ^2	df	<i>p</i>-value	χ^2	df	<i>p</i>-value
SLA	24.70	1	<0.001	49.29	1	<0.001
LDMC	36.07	1	<0.001	49.83	1	<0.001
Leaf N	16.73	1	<0.001	19.02	1	<0.001
Leaf P	5.61	1	0.017	3.68	1	0.05
Leaf K	8.26	1	0.004	17.43	1	<0.001
LES_{5traits}	32.04	1	<0.001	48.40	1	<0.001

TABLE S5 | Summary statistics, corrected phylogenetically (PICs), for the relationships between the carbon isotope composition of leaves ($\delta^{13}\text{C}$) and leaf traits and leaf economic spectrum scores ($\text{LES}_{\text{CG5 traits}}$) across 15 rangeland species grown in the common garden experiment. F-values (**F**), degrees of freedom (df) and significance (*p*-value) are shown. Leaf N was log-scaled and leaf K was squared root-scaled.

	All species (n=15)			Without <i>Helianthemum canum</i> (n=14)		
	Fixed effects			Fixed effects		
	F	df	<i>p</i> -value	F	df	<i>p</i> -value
SLA	9.83	1	<0.01	19.82	1	<0.001
LDMC	4.59	1	<0.05	6.06	1	<0.05
Leaf N	2.18	1	0.16	2.90	1	0.11
Leaf P	1.52	1	0.24	1.13	1	0.31
Leaf K	6.02	1	<0.05	8.26	1	<0.05
LES_{5traits}	9.05	1	<0.05	13.35	1	<0.01

TABLE S6 | Pearson correlation coefficients (*r*) between leaf gas exchange variables (*A*, *g_s* and *WUEi*) measured in a subset of 10 rangeland species in 2016 and leaf traits measured in the same species in 2012 ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$, SLA, LDMC and Leaf N). Mean values per species were used. Abbreviations for traits are given in Figure 1 and Table 2. ****P*<0.001, ***P*<0.01, **P*<0.05, +*P*<0.10.

	All species (n=10)						
	<i>g_s</i>	<i>WUEi</i>	$\delta^{18}\text{O}$	$\delta^{13}\text{C}$	LDMC	SLA	Leaf N
A	0.30	0.08	-0.68*	-0.30	-0.60+	0.70*	0.69*
<i>g_s</i>		-0.87**	-0.67*	-0.90***	-0.61+	0.50	0.57+
<i>WUEi</i>			0.44	0.78***	0.45	-0.33	-0.28

	Without <i>Helianthemum canum</i> (n=9)						
	<i>g_s</i>	<i>WUEi</i>	$\delta^{18}\text{O}$	$\delta^{13}\text{C}$	LDMC	SLA	Leaf N
A	0.73*	-0.26	-0.74*	-0.83**	-0.70*	0.71*	0.76*
<i>g_s</i>		-0.80**	-0.83**	-0.85**	-0.69*	0.70*	0.69*
<i>WUEi</i>			0.58+	0.66*	0.52	-0.53	-0.37

TABLE S7 | Pearson correlation coefficients (r) among leaf traits measured in 14 rangeland species in 2010 in natural rangelands at La Fage experimental station (subscript field) ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$, SLA, LDMC, Leaf N, P and K, and LES). Abbreviations for traits are given in Figure 1 and Table 2. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, + $P < 0.10$.

	All species (n=53)					
	$\delta^{13}\text{C}_{\text{field}}$	LDMC _{field}	SLA _{field}	Leaf N _{field}	Leaf P _{field}	Leaf K _{field}
$\delta^{18}\text{O}_{\text{field}}$	0.65***	0.80***	-0.75***	-0.46***	-0.41**	-0.38**
$\delta^{13}\text{C}_{\text{field}}$		0.78***	-0.50***	-0.23+	-0.31*	-0.41**
LDMC _{field}			-0.73***	-0.45***	-0.37**	-0.50***
SLA _{field}				0.54***	0.34*	0.38**
Leaf N _{field}					0.28*	-0.02
Leaf P _{field}						0.44***

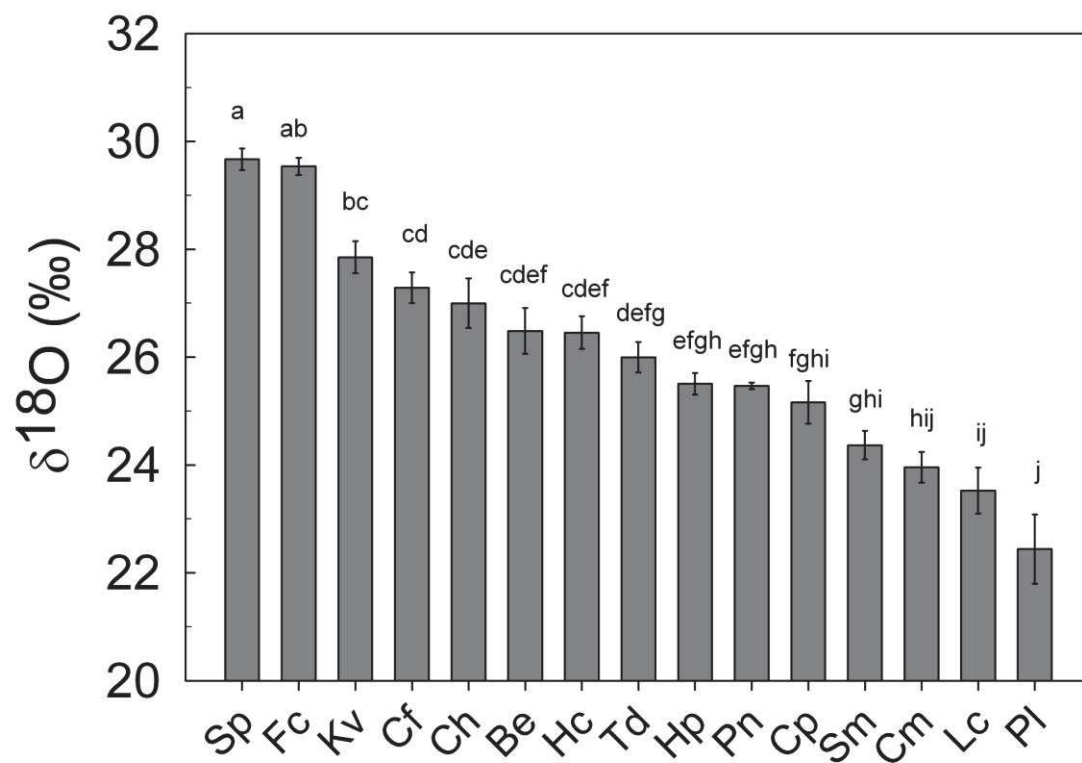


FIGURE S1 | Mean leaf oxygen isotope ratios (± 1 s.e.m) of the 15 rangeland species grown in the common garden experiment. Different letters indicate significant differences between individual species (Tukey post-hoc test at $P < 0.05$; species effect, $X^2 = 509.18$, $df = 14$, $P < 0.001$). Abbreviations for species are given in Table 1

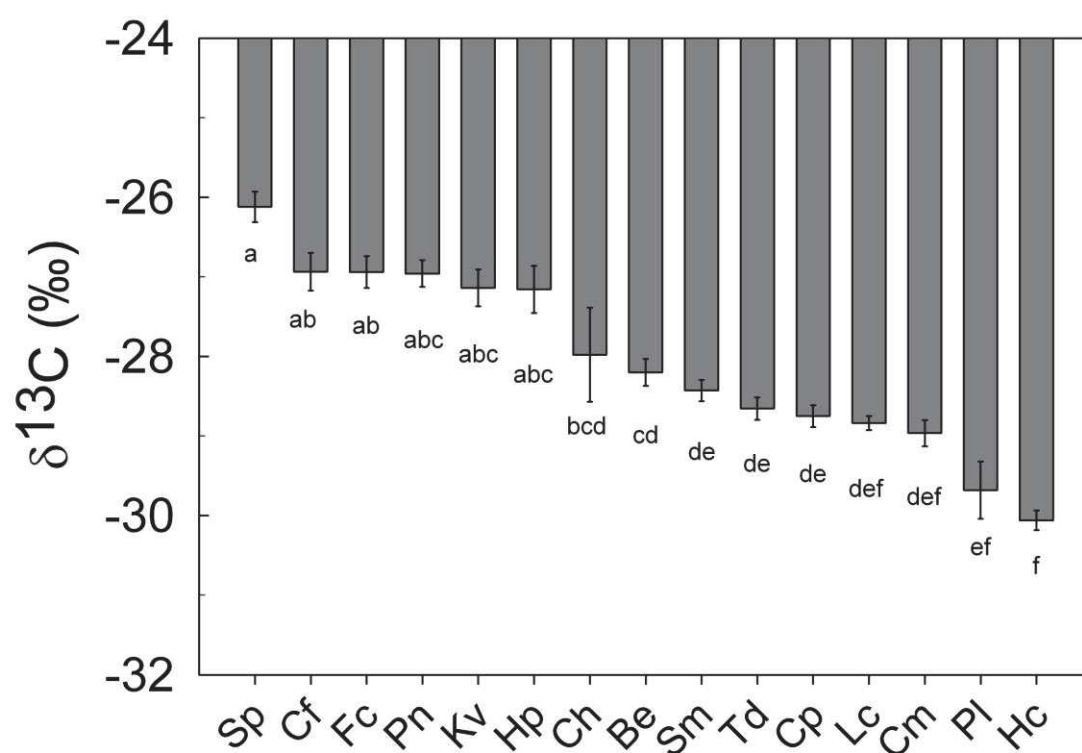


FIGURE S2 | Mean leaf carbon isotope ratios (± 1 s.e.m) of the 15 rangeland species grown in the common garden experiment. Different letters indicate significant differences between individual species (Tukey post-hoc test at $P < 0.05$; species effect, $X^2 = 302.1$, $df = 14$, $P < 0.001$). Abbreviations for species are given in Table 1.

Annex S1.

Material and methods for leaf gas exchange measurements

In a subset of ten target species, we measured leaf net photosynthetic rate (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) and leaf stomatal conductance (g_s , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) in June 2016, at the peak of vegetative growth. Individual plants of each species ($n=8$) were grown in pots 25 cm height x 20 cm diameter (~8 liters volume). Pots contained a 2:1 soil mixture of soil collected from the common garden where the experiment took place (see main text) and gardening substrate, respectively. Pots were irrigated regularly during plant growth and every day during gas exchange measurements to ensure plants were under optimal growth conditions. Leaf A and g_s were measured using a portable photosynthesis system (LI-6400, LICOR, Inc., Lincoln, NE, USA) equipped with a LI-6400-02B LED light leaf chamber and a LICOR 6400-01 CO_2 injector. Leaf gas exchange was measured on mature, fully sun-exposed leaves. The CO_2 concentration in the cuvette was maintained at $400 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{ CO}_2$ and measurements were performed at a saturating light intensity of $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and at ambient air temperature and relative humidity. The air-flow was set to $350 \mu\text{mol s}^{-1}$. Intrinsic water use efficiency (WUE_i) was calculated as A/g_s . To test for causal relationships between WUE_i and $\delta^{13}\text{C}$ and between g_s and $\delta^{18}\text{O}$, respectively, we performed linear regression models. Additionally, to test for relationships between leaf traits (including the LES and leaf isotopic composition) measured in 2012 and leaf gas exchange parameters measured in 2016 (A , g_s and WUE_i) we used Pearson correlations. These analyses were performed within the subset of 10 species in which leaf gas exchange was measured in 2016 using mean values per species.

Annexe 2

PhenoSpace : une application shiny pour le
spectre global de forme et fonction des
plantes

PHENOSPACE : A SHINY APPLICATION TO VISUALIZE TRAIT DATA IN THE PHENOTYPIC SPACE OF THE GLOBAL SPECTRUM OF PLANT FORM AND FUNCTION

J. Segrestin*^a, K. Sartori^a, & E. Garnier^a

^a CEFE UMR 5175, Université de Montpellier – Université Paul Valéry – EPHE, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France

* Corresponding author: jsegrestin@gmail.com

Key-words: comparative plant ecology; functional dimensions; intra- and inter-specific trait variation; plant phenotypes; plant traits; user-friendly application.

ABSTRACT

1. A recent worldwide analysis of variation in six major traits conducted on a large sample of vascular plant species showed that three quarters of trait variation was captured in a two-dimensional global spectrum of plant form and function (“global spectrum” hereafter). We developed the PhenoSpace application, whose aim is to visualize the position of any species/population in the phenotypic space of the global spectrum.
2. PhenoSpace is a Shiny application - Shiny is an *R* package that makes it easy to build interactive web applications from *R* - designed to help users manipulate and visualize data pertaining to the global spectrum of plant form and function. It is freely accessible at the following URL: <http://testsie.cefe.cnrs.fr:3838/shinyapps/BlobYourData/>.
3. PhenoSpace has two main functionalities: (1) the visualization of various avatars of the phenotypic space of the global spectrum: it allows one to run analyses using different combinations of traits and/or growth forms selected from the original data set with which the global spectrum has been identified, and (2) to project trait data from any user-defined data set onto the phenotypic space of the global spectrum, provided that at least two of the six traits are available.
4. PhenoSpace practically fulfils the goal of positioning plants quickly and simply in the phenotypic space of the global spectrum, making it possible to compare trait variation at any level of organization against the worldwide background. This serves a major aim of comparative plant ecology, which is to put specific sets of species/populations into a broader context, allowing one to synthesize results across different continents and environments using relevant indicators plant functioning.

1 INTRODUCTION

As measurable properties of individuals related to their functioning and modulating their fitness (McGill *et al.* 2006; Violle *et al.* 2007), traits are key to a functional, non-taxonomic approach to biodiversity (Lavorel *et al.* 2007; Enquist *et al.* 2015; Garnier, Navas & Grigulis 2016 for reviews). In plants, a long standing stream of research has been devoted to the identification of key traits allowing one to describe phenotypes in a way that is relevant to their functioning and ecology (Grime 1977; Westoby 1998; Weiher *et al.* 1999; Laughlin 2014). A recent worldwide analysis conducted on the largest sample of vascular plant species ever compiled using six major traits critical to growth, survival and reproduction, showed that three-quarters of trait variation could be captured in a two-dimensional “global spectrum of plant form and function” (“global spectrum” hereafter: Díaz *et al.* 2016). One major dimension reflects the size of whole plants and their parts, while the other represents the leaf economics spectrum (Wright *et al.* 2004), which runs from quick to slow return on investments of nutrients and dry mass in leaves. As a major advance in our understanding of plant phenotypes, this global spectrum provides a backdrop for qualifying species from a functional perspective using relevant axes of variation (discussed in Westoby *et al.* 2002; Díaz *et al.* 2016). Here, we describe a Shiny application which allows one to: (1) visualize the outcome of various multivariate analyses run with the original data set compiled by Díaz *et al.* (2016) or subsets thereof, and (2) project and visualize any user-defined data set in the phenotypic space of the global spectrum.

2 THE FUNCTIONALITIES OF PHENOSPACE

Shiny is an *R* package that makes it easy to build interactive web applications from *R*. PhenoSpace, the Shiny application presented here, is designed to help users manipulate and visualize data pertaining to the global spectrum of plant form and function. It is available at the following URL: <http://testsie.cefe.cnrs.fr:3838/shinyapps/BlobYourData/>. Its functionalities, accessible from two different tabs, are described below.

2.1 Visualizing the phenotypic space of the global spectrum

The first functionality of PhenoSpace (“Customize the PCA” tab) is to display the outcomes of multivariate analyses based on the original data set explored by Díaz *et al.* (2016). Six traits are involved to define the phenotypic space of the global spectrum (Table 1 for definitions and functional significance): adult plant height (PH), stem specific density (SSD),

the area of a leaf (LA), leaf mass *per* area (LMA), leaf nitrogen content *per* unit mass (LNC_m) and seed dry mass (SM).

PhenoSpace allows a dynamic visualization of data projected in planes defined by any combination of the first three components of Principal Components Analyses (PCA) run either on these six traits or on any user-defined subsets of these traits. When the application is launched, the plane defined by Principal Component Axes 1 and 2 using all six traits is displayed (Fig. 1A), which corresponds to Fig. 2a shown in Díaz *et al.* (2016). In addition to the figure showing the projection in PCA planes, the ranges of variation of values for the traits selected to run the PCA are shown at the top of the page (Fig. 1).

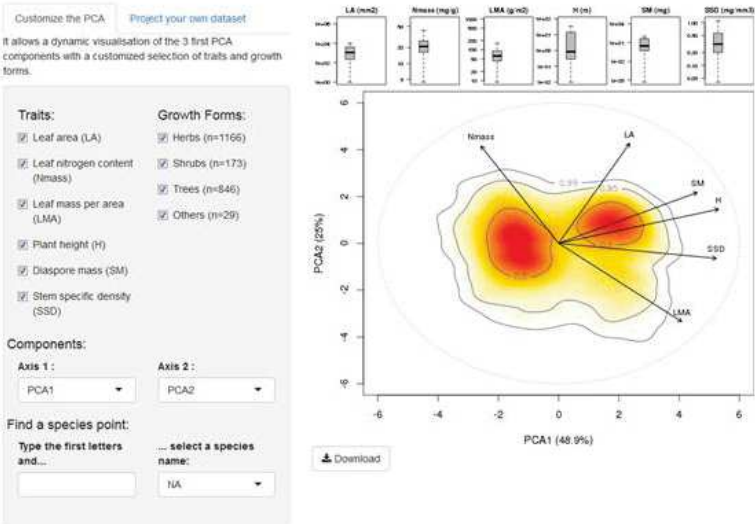
The user can also choose to display data for species from all growth forms available in the original data set (herbs, shrubs, trees, others), or only for a selection of these growth forms: Fig. 1B shows an example in which only four traits (PH, LA, LMA and SM) and one growth form (herbaceous species) are used. Finally, the position of each the 2,214 species whose trait data are available in the original data set can be plotted in the dynamically displayed phenotypic space (Fig. 1C for examples).

Once all required options are settled, clicking the download button at the bottom of the page exports graphics (boxplots and the graph of the PCA) as an image file (.png) for further use.

FIGURE 1 Screen shots showing the PhenoSpace page displays (“Customize the PCA” tab) for different selections of variables and species groups. A: all traits and species from the original data set analyzed in Díaz *et al.* (2016); this page shows when the application is launched; B: plots for herbaceous species using only four traits: Plant height (PH), Leaf area (LA), Leaf mass per area (LMA) and Seed dry mass (SM); C: positions of four species (*Arabidopsis thaliana*, *Datura stramonium*, *Quercus alba* and *Sequoia giganteum*) in the plane defined by the first two components of the PCA run on the whole data set.

Blob Your Data

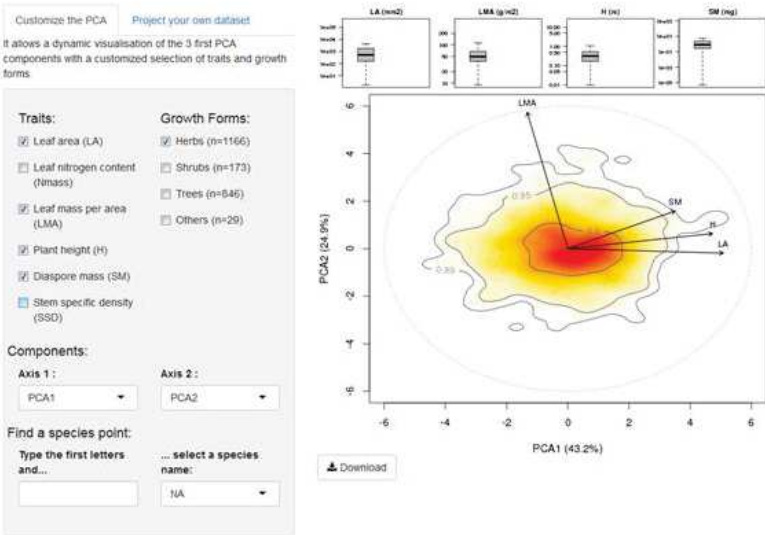
Blob Your Data is a shiny app using the dataset from Diaz et al. 'The global spectrum of plant form and function.' Nature, doi:10.1038/nature16489 (2015).



Blob Your Data

Blob Your Data is a shiny app using the dataset from Diaz et al. 'The global spectrum of plant form and function.' Nature, doi:10.1038/nature16489 (2015).

B



Blob Your Data

Blob Your Data is a shiny app using the dataset from Diaz et al. 'The global spectrum of plant form and function.' Nature, doi:10.1038/nature16489 (2015).

C

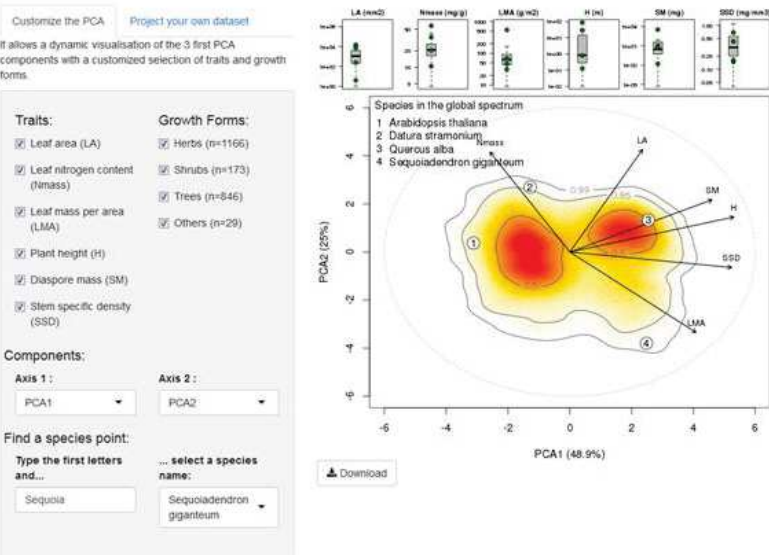


TABLE 1 Traits involved in the phenotypic space of the global spectrum of plant form and function (Díaz *et al.* 2016) and their functional significance (Pérez-Harguindeguy *et al.* 2013; Garnier, Navas & Grigulis 2016 for details), together with their abbreviations and units. Definitions are taken from the thesaurus of plant characteristics (TOP: Garnier *et al.* 2017).

Trait	Definition	Functional significance	Abbreviation	Unit	Range of variation in the Díaz et al.(2016) data set
Adult plant height	the shortest distance between the upper boundary of the photosynthetic tissues of an adult plant and the ground level	Light capture, above-ground competition, dispersal distance of seeds	PH	m	0.001 to 90
Stem specific density	the ratio of the mass of the stem or a unit thereof assessed after drying to its volume assessed without drying	Growth potential vs. mortality risk from biomechanical or hydraulic failure	SSD	mg mm ⁻³	0.06 to 1.39
Leaf area	the area of a leaf in the one sided projection	Light interception, energy balance	LA	mm ²	0.79 to 2.79 × 10 ⁶
Leaf mass per area	the ratio of the dry mass of a leaf to its area	Photosynthetic rate, leaf longevity, seedling relative growth rate	LMA	g m ⁻²	4.9 to 1,507
Leaf nitrogen content per unit mass	the ratio of the quantity of nitrogen in the leaf per unit dry mass	Protein content (RubisCo), photosynthetic rate	LNC _m	mg g ⁻¹	2.48 to 68.98
Seed dry mass	the mass of a seed assessed after drying	Dispersal and regeneration strategy, seedling competition	SM	mg	3.0 × 10 ⁻⁴ to 2.05 × 10 ⁷ #

excluding pteridophytes

2.2 Plotting a data set onto the phenotypic space of the global spectrum

The second functionality of PhenoSpace (“Project your own data set” tab) allows one to project species from any data set onto user-defined avatars of the phenotypic space of the global spectrum. Values for at least two of the six traits listed in Table 1 should be available for these species.

The first step is to prepare a csv file with the data to be projected. Trait values should be organized in columns whose headings correspond to the abbreviations of trait names spelled out exactly as shown in Table 1. Extra columns are allowed, which can subsequently be used to identify subsets of data on the plot (see below). The second step is to select the traits for which data are available by unticking the appropriate boxes on the “Customize the PCA” tab (cf. Fig. 1). The csv file can then be imported by clicking on the “Browse” button” on the “Project your own data set” tab (Fig. 2).

Once the importation is completed, trait values available in the imported data set are visualized: (1) as boxplots drawn for each trait, displayed next to those showing the distribution of trait values from the original global spectrum data set, and (2) as

supplementary data points appearing on the selected plane of the PCA (Fig. 2A). The imported data are treated as inactive variables in the PCA: the position of each species in the PCA planes displayed is calculated using the coefficients of the linear combinations of trait values established with the global spectrum data set. Trait loadings of principal components obtained with the original data set are thus not modified, which implies that the background plane of the PCA onto which the data are projected is unaltered.

The facultative extra columns in the data file can be used to color data points according to the attributes of the criteria (which can be quantitative or qualitative) specified in the column (Fig. 2B).

As explained above, the download button exports graphics as an image file.

3 DISCUSSION AND CONCLUSION

The final sentence of the Díaz *et al.* (2016) paper reads: “The global spectrum of plant form and function is thus, in a sense, a galactic plane within which we can position any plant -from star anise to sunflower - based on its traits”. PhenoSpace practically fulfils this goal of positioning plants quickly and simply in this phenotypic space, making it possible to compare trait variation at any level of organization against the worldwide background. This can indeed be done not only for species, but also for populations and/or genotypes within species, or even communities. For example, a currently highly debated question concerns the extent of intra- vs. interspecific variation in trait values. Using PhenoSpace would allow one to quickly visualize how trait variation of, say, a wide range of genotypes of the model species *Arabidopsis thaliana* compares to the range spanned by plant species across the tree of life. The answer will likely differ for the two major dimensions identified in the global spectrum, as trait variation appears to be very large on the LMA/LNC_m axis (cf. Vasseur *et al.* 2012), while variation on the size axis (first axis of the PCA) is likely to be much smaller relative to the whole spectrum spanned across species. This suggests that radically different evolutionary and/or structural constraints operate on the different dimensions of the phenotype.

Blob Your Data

Blob Your Data is a shiny app using the dataset from Díaz et al. 'The global spectrum of plant form and function' Nature, doi:10.1038/nature16489 (2015).

A

Customize the PCA **Project your own dataset**

An extra dataset can be projected in the PCA by uploading a csv file.

The file must contain 2 to 6 traits values by columns. Extra columns are allowed.

The column names must be LA for Leaf area, Nmass for Leaf nitrogen content, LMA for Leaf mass per area, H for Plant height, SM for Diaspore mass and SSD for Stem specific density.

The traits values must be expressed in mm² (LA), mg/g (Nmass), g/m² (LMA), m (H), mg (SM) and mg/mm³ (SSD).

The csv file can also contain an extra column with qualitative or quantitative values used as colours.

Choose CSV File

Browse... FloraTest_TraitMeans.csv

Upload complete

All selected traits found in the uploaded file for 120 rows. 0 incomplete rows omitted.

Separator **Decimal**

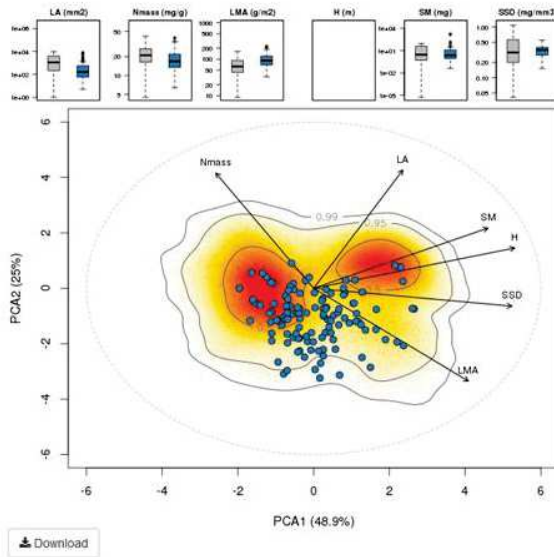
☒ Semicolon ☒ Dot

☐ Comma ☐ Comma

☐ Tab

Select a column for colors

none



Blob Your Data

Blob Your Data is a shiny app using the dataset from Díaz et al. 'The global spectrum of plant form and function' Nature, doi:10.1038/nature16489 (2015).

B

Customize the PCA **Project your own dataset**

An extra dataset can be projected in the PCA by uploading a csv file.

The file must contain 2 to 6 traits values by columns. Extra columns are allowed.

The column names must be LA for Leaf area, Nmass for Leaf nitrogen content, LMA for Leaf mass per area, H for Plant height, SM for Diaspore mass and SSD for Stem specific density.

The traits values must be expressed in mm² (LA), mg/g (Nmass), g/m² (LMA), m (H), mg (SM) and mg/mm³ (SSD).

The csv file can also contain an extra column with qualitative or quantitative values used as colours.

Choose CSV File

Browse... FloraTest_TraitMeans.csv

Upload complete

All selected traits found in the uploaded file for 120 rows. 0 incomplete rows omitted.

Separator **Decimal**

☒ Semicolon ☒ Dot

☐ Comma ☐ Comma

☐ Tab

Select a column for colors

LifeForm1

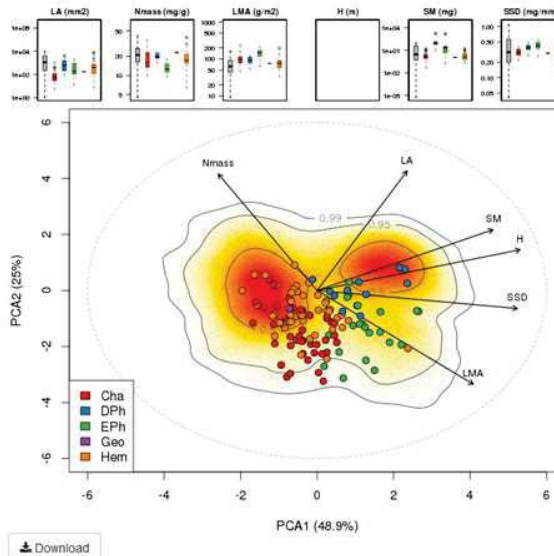


FIGURE 2 Screen shots showing the PhenoSpace page displays ("Project your own data set" tab) after uploading the FloraTest_TraitMeans.csv data set, which contains trait data for the six traits of the global spectrum measured on species from different life forms present in three sites differing in aridity (Garnier *et al.*, in review). In A, only the columns with trait data are taken into account (boxplots and data points in blue). In B, the points are colored according to the Raunkiaer life form of species (Cha: chamaephytes; DPh: deciduous phanerophytes; EPh: evergreen phanerophytes; Geo: geophytes; Hem: hemicryptophytes), provided in the "LifeForm" column (facultative) of the data file.

PhenoSpace could be further developed to position species and/or populations in phenotypic spaces defined with sets of traits different from those of the global spectrum. Two schemes would be particularly interesting in this perspective. The first one is that of the leaf economics spectrum (Wright *et al.* 2004), which is extensively used to position species along an axis of resource acquisition and conservation, and involves the six following leaf traits: photosynthetic and respiration rates, LMA, LNC_m, leaf phosphorus content *per* unit mass and leaf life span). The second one is the CSR ecological strategy scheme (Grime 1977; Grime 2001), in which species and/or populations are assigned scores on axes characterizing their degree of competitive ability (C), stress-tolerance (S) and ruderality (R) from the values of their traits. Using either the algorithm developed by Hodgson *et al.* (1999) based on seven traits, or that recently proposed by Pierce *et al.* (2013) based on three leaf traits, any species could then be positioned in the CSR triangular ordination in a way similar to what has been done here to place species in the PCA planes.

The current and future versions of PhenoSpace will serve a major aim of comparative plant ecology, which is to put specific sets of species/populations into a broader context, allowing one to synthesize results across different continents and environments using relevant indicators plant functioning (cf. Westoby *et al.* 2002). Future developments will not only be based on existing schemes of phenotypic spaces but will also incorporate other relevant functional dimensions as our understanding of plant phenotypes improves.

4 REFERENCES

- Díaz, S., Kattge, J., Cornelissen, J.H.C., Wright, I.J., Lavorel, S., Dray, S., Reu, B., Kleyer, M., Wirth, C., Colin Prentice, I., Garnier, E., Bönsch, G., Westoby, M., Poorter, H., Reich, P.B., Moles, A.T., Dickie, J., Gillison, A.N., Zanne, A.E., Chave, J., Wright, J.S., Sheremet'ev, S.N., Jactel, H., Baraloto, C., Cerabolini, B., Pierce, S., Shipley, B., Kirkup, D., Casanoves, F., Joswig, J.S., Günther, A., Falczuk, V., Rüger, N., Mahecha, M.D. & Gorné, L.D. (2016) The global spectrum of plant form and function. *Nature*, 529, 167-171.
- Enquist, B.J., Norberg, J., Bonser, S.P., Violle, C., Webb, C.T. & Savage, V.M. (2015) Scaling from traits to ecosystems: Developing a general Trait Driver Theory via integrating trait-based and metabolic scaling theories. *Advances in Ecological Research*, 52, 249-318.
- Garnier, E., Navas, M.-L. & Grigulis, K. (2016) *Plant Functional Diversity - Organism Traits, Community Structure, and Ecosystem Properties*. Oxford University Press, Oxford.
- Garnier, E., Stahl, U., Laporte, M.-A., Kattge, J., Mougnot, I., Kühn, I., Laporte, B., Amiaud, B., Ahrestani, F.S., Bönsch, G., Bunker, D.E., Cornelissen, J.H.C., Díaz, S., Enquist, B.J., Gachet, S., Jaureguiberry, P., Kleyer, M., Lavorel, S., Maicher, L., Pérez-Harguindeguy, N., Poorter, H.,

- Schildhauer, M., Shipley, B., Violle, C., Weiher, E., Wirth, C., Wright, I.J. & Klotz, S. (2017) Towards a thesaurus of plant characteristics: an ecological contribution. *Journal of Ecology*, 105, 298-309.
- Garnier, E., Vile, D., Roumet, C., Lavorel, S., Grigulis, K., Navas, M.-L. & Lloret, F.. Inter- and intra-specific trait shifts in sites differing in aridity at the north western edge of the Mediterranean Biogeographic Region. *Flora* (in review).
- Grime, J.P. (1977) Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *The American Naturalist*, 111, 1169-1194.
- Grime, J.P. (2001) *Plant Strategies, Vegetation Processes, and Ecosystem Properties*, 2nd Edition edn. John Wiley & Sons, Chichester.
- Hodgson, J.G., Wilson, P.J., Hunt, R., Grime, J.P. & Thompson, K. (1999) Allocating C-S-R plant functional types: a soft approach to a hard problem. *Oikos*, 85, 282-294.
- Laughlin, D.C. (2014) The intrinsic dimensionality of plant traits and its relevance to community assembly. *Journal of Ecology*, 102, 186-193.
- Lavorel, S., Díaz, S., Cornelissen, J.H.C., Garnier, E., Harrison, S.P., McIntyre, S., Pausas, J., Pérez-Harguindeguy, N., Roumet, C. & Urcelay, C. (2007) Plant functional types: Are we getting any closer to the Holy Grail? *Terrestrial Ecosystems in a Changing World* (eds J. Canadell, D. Pataki & L. Pitelka), pp. 149-164. Springer-Verlag, Berlin.
- McGill, B.J., Enquist, B.J., Weiher, E. & Westoby, M. (2006) Rebuilding community ecology from functional traits. *Trends in Ecology and Evolution*, 21, 178-185.
- Pérez-Harguindeguy, N., Díaz, S., Garnier, E., Lavorel, S., Poorter, H., Jaureguiberry, P., Bret-Harte, M., Cornwell, W.K., Craine, J.M., Gurvich, D.E., Urcelay, C., Veneklaas, E.J., Reich, P.B., Poorter, L., Wright, I.J., Ray, P., Enrico, L., Pausas, J.G., de Vos, A.C., N., B., Funes, G., Quetier, F., Hodgson, J.G., Thompson, K., Morgan, H.D., ter Steege, H., van der Heijden, M.G.A., Sack, L., Blonder, B., Poschlod, P., Vaieretti, V., Conti, G., Staver, A.C., Aquino, S. & Cornelissen, J.H.C. (2013) New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal Botany*, 61, 167–234.
- Pierce, S., Brusa, G., Vagge, I. & Cerabolini, B.E.L. (2013) Allocating CSR plant functional types: the use of leaf economics and size traits to classify woody and herbaceous vascular plants. *Functional Ecology*, 27, 1002-1010.
- Vasseur, F., Violle, C., Enquist, B.J., Granier, C. & Vile, D. (2012) A common genetic basis to the origin of the leaf economics spectrum and metabolic scaling allometry. *Ecology Letters*, 15, 1149-1157.
- Violle, C., Navas, M.-L., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I. & Garnier, E. (2007) Let the concept of trait be functional! . *Oikos*, 116, 882-892.

- Weiher, E., van der Werf, A., Thompson, K., Roderick, M., Garnier, E. & Eriksson, O. (1999) Challenging Theophrastus: A common core list of plant traits for functional ecology. *Journal of Vegetation Science*, 10, 609-620.
- Westoby, M. (1998) A leaf-height-seed (LHS) plant ecology strategy scheme. *Plant and Soil*, 199, 213-227.
- Westoby, M., Falster, D.S., Moles, A.T., Vesk, P.A. & Wright, I.J. (2002) Plant ecological strategies: Some leading dimensions of variation between species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33, 125-159.
- Wright, I.J., Reich, P.B., Westoby, M., Ackerly, D.D., Baruch, Z., Bongers, F., Cavender-Bares, J., Chapin, F.S., III, Cornelissen, J.H.C., Diemer, M., Flexas, J., Garnier, E., Groom, P.K., Gulias, J., Hikosaka, K., Lamont, B.B., Lee, T., Lee, W., Lusk, C., Midgley, J.J., Navas, M.-L., Niinemets, Ü., Oleksyn, J., Osada, N., Poorter, H., Poot, P., Prior, L., Pyankov, V.I., Roumet, C., Thomas, S.C., Tjoelker, M.G., Veneklaas, E. & Villar, R. (2004) The worldwide leaf economics spectrum. *Nature*, 428, 821-827.

La phénologie et la défense affectent directement la croissance, la survie et la reproduction des plantes. Cependant, ces deux aspects sont rarement intégrés dans une description synthétique de leurs stratégies écologiques. Une grande attention a été portée aux dimensions de gestion des ressources, de reproduction ou encore de stature des végétaux, mais nous avons encore peu d'idées sur la façon dont s'articulent la phénologie et la défense par rapport à ces dimensions. Ainsi, les traits couramment mesurés (traits foliaires, hauteur, masse de graine, etc...) et des marqueurs fonctionnels de la phénologie et de la défense ont été utilisés pour caractériser l'espace phénotypique occupé par différentes espèces de la région méditerranéenne du sud de la France. Les travaux effectués combinent deux types d'approches : (a) une démarche de synthèse scientifique qui assemble et analyse des données issues de plusieurs expérimentations réalisées dans différents sites méditerranéens. Le jeu de données constitué est l'un des premiers à décrire la séquence temporelle des événements reproductifs pour plus de 130 espèces représentant différentes formes de croissance et modes de pollinisation et de dispersion. Il nous a permis de montrer un fort effet de la saisonnalité du climat, en particulier de la disponibilité en eau, sur les patrons phénologiques, avec des variations selon les formes de croissance. Des corrélations entre les traits de la phénologie de la reproduction suggèrent l'existence d'un continuum lent-rapide décrivant les rythmes de développement chez les espèces considérées. Ces traits de phénologie reproductive ont été mis en relation avec plusieurs traits largement utilisés pour caractériser le phénotype en écologie comparative : la date de floraison dépend de la hauteur de la plante, la période de maturation d'une graine conditionne sa masse, et l'intensité de la sécheresse pendant la production de graines est corrélée à certains traits foliaires. (b) une démarche expérimentale fondée sur des mesures plus détaillées du phénotype d'un ensemble d'espèces plus restreint. Les données collectées ont permis de décrire en détail la dynamique de production de feuilles, fleurs et fruits au cours du temps chez 23 espèces et montrent leur degré de coordination. Il révèle notamment des corrélations rarement testées entre la phénologie végétative et reproductive. Sur ces 23 espèces, la fonction de défense a été évaluée par la mesure de plusieurs caractéristiques biomécaniques, de traits morpho-anatomiques et de composition en fibre des feuilles. L'épaisseur des feuilles, leur système de nervation et leur teneur en fibres ont une influence significative sur les propriétés mécaniques des feuilles, mais l'importance relative de ces traits varie selon le test biomécanique réalisé. Enfin, nous avons montré que les traits biomécaniques permettaient de faire le lien entre les concepts du compromis croissance-défense et du syndrome d'économie foliaire. Nos travaux mettent en avant la pertinence d'utiliser des traits associés à la phénologie et à la défense comme axes de spécialisation des plantes dans les études comparatives, nous permettant de réévaluer leur importance dans la description des stratégies écologiques.

Mots clés : Ecologie comparative, Traits fonctionnels, Espace phénotypique, Phénologie, Biomécanique, Climat méditerranéen

Integration of phenology and mechanical defence in the plant phenotypic space

Phenology and defence are key for the evolutionary and ecological successes of plants, by affecting their growth, survival and reproduction. Surprisingly, these two aspects of plant functioning are rarely integrated into a synthetic description of plant ecological strategies. Much effort has been devoted to the description of plant resource acquisition and use, reproductive capacities and stature, but we lack knowledge about how these are connected to phenology and defence. Therefore, plant traits commonly used in comparative analyses (leaf traits, plant height, seed mass...) and functional markers of phenology and defence have been used to characterize the phenotypic space occupied by plant species found in the Mediterranean region of southern France. The work is based on two types of approaches: (a) The synthesis of trait data collected during several independent experiments conducted in different Mediterranean sites. This resulted in the constitution of one of the first dataset describing the temporal sequence of reproductive events and their covariations in a large number of species differing in life cycles, pollination and dispersal modes. We found a clear association between the temporality of these phases and the strong seasonality of climatic conditions in the Mediterranean, especially in relation to water availability, with some variations between groups of species. Correlations between traits of the reproductive phenology phases suggest that species can be distributed along a fast-slow continuum of reproductive events. We also found relationships between reproductive phenology and other traits commonly used for the description of plant phenotypes in comparative analyses: the flowering date depends on plant height, the seed maturation period affects the seed mass and the drought intensity during seed production correlates with several leaf traits. (b) An experimental approach based on a more detailed description of the plant phenotype on a restricted number of species. This dataset includes measurements of leaf production rate and describes the dynamics of flower and seed production for 23 species. We tested the level of coordination between phenological phases and revealed some rarely tested correlations between vegetative and reproductive phenology. On these 23 species, plant defence was characterized by several biomechanical properties, morphological traits and fibre content of leaves. The leaf thickness, venation network and fibre content have a significant influence on leaf mechanical properties but their relative effects depend on the biomechanical test performed. Finally, we showed that biomechanical properties could be used to understand the links between the concepts of the growth-defence trade-off and the leaf economics spectrum. This study confirms the value of using phenological and defence traits in comparative approaches, putting back these two fundamental dimensions into the broader context of plant ecological strategies.

Key words: Comparative ecology, Functional traits, Phenotypic space, Phenology, Biomechanics, Mediterranean climate