Nancy-Université
Université Henri Poincaré

AVERTISSEMENT

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

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

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

➢ Contact SCD Nancy 1 : theses.sciences@scd.uhp-nancy.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

U.F.R Sciences & Techniques Biologiques
Ecole Doctorale Ressource Procédés, Produits, Environnement
D.F.D Biologie Végétale Forestière

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-Université
en Biologie Végétale et Forestière

par Rana EL ZEIN

Dynamiques saisonnières des réserves carbonées et azotées chez le chêne sessile (*Quercus petraea*) et le hêtre (*Fagus sylvatica*) adultes.

Soutenance publique le 24 Janvier 2011

Membres du Jury :

Rapporteurs	Marie Pascale Prud'homme	Professeur, UCBN, Caen
	Agnès Guilliot	Maître de Conférences, UBP, Clermont Ferrand
Examinateurs	Marie Odile Jordan	Chargée de Recherche, INRA, Avignon
	Michel Chalot	Professeur, UHP, Nancy-Université
	Jean François Morot Gaudry	Directeur de recherche, INRA, Versailles
Directrice de thèse	Nathalie Bréda	Directrice de recherche, INRA, Nancy
Co-encadrantes	Dominique Gérant	Maître de Conférences, UHP, Nancy-Université
	Pascale Maillard	Chargée de Recherche, INRA, Nancy

IFR 110 - UMR 1137 Ecologie et Ecophysiologie Forestières INRA-UHP
Centre INRA de Nancy F-54280 Champenoux
Faculté des Sciences & Techniques, BP 239 F-54506 Vandoeuvre lès Nancy

Remerciements

Je tiens à exprimer ma gratitude profonde à mes encadrantes: Nathalie Bréda, Dominique Gérant et Pascale Maillard. Merci pour votre confiance, pour toutes les compétences que vous m'avez transmises, pour votre disponibilité et accessibilité, pour vos encouragements et surtout pour votre côté humain.

Ça y est, maintenant j'ai tout le bagage pour décoller en qualité!

Je remercie sincèrement tous les membres du jury et particulièrement M.P. Prudhomme et A. Guilliot pour avoir accepté de juger ce mémoire en tant que rapporteurs.

Un grand merci à tout le personnel de l'UMR 1137, aussi bien à l'INRA qu'à la fac. Ça n'aurait pas été pareil sans votre gentillesse et votre amabilité. Je me suis vraiment sentie entourée par une grande famille et ça a compté beaucoup pour moi au cours de ces années, MERCI !

Un clin d'œil à la Phyto et à Arbeco, mes équipes de cœur !

Je tiens à remercier toutes les personnes avec qui j'ai travaillé et celles qui ont contribué significativement au travail de terrain et aux analyses biochimiques et isotopiques: B. Zeller, J. Marchand (Super Jaja), P. Riveron, P. Courtois, J.M. Gioria, B. Clerc et C. Hossann.

Un merci spécial à mon papa forêt « François ». Merci pour tous ces moments inoubliables, pour ton implication dans toutes mes expériences de terrain et pour l'attention avec laquelle tu as toujours prélevé ces carottes riches en protéines! Grâce à toi, je sais maintenant tirer au fusil et bûcheronner comme une pro, mais quel plaisir !

Rosine, merci pour ta gentillesse tout au long de ces années. Je te suis reconnaissante pour le soin et l'attention avec lesquels tu a suivi mon dossier un peu trop compliqué à la fin.

M. le chef, P. Dizengremel, il y a cinq ans, tu m'as connu jeune et inquiète mais déterminée : « je vais y arriver» et me voilà ! Merci pour ton soutien depuis mes premiers pas en Master et jusqu'au bout !

Dany et Mireille : merci pour votre gentillesse et votre hospitalité. Dany, merci pour ton soutien et ton écoute. C'est à toi que je dois mes premiers pas dans le monde de la recherche, MERCI !

A tous les copains du chemin: Nicolas, Anne Sophie, Rémy, Cyril, Hélène, Nianguiri, Daniel, Pti Clém, Sylvère, Jennifer, Julien, Fahed, Emilie, Morgane…Je vous souhaite une très bonne continuation.

Ma Pauline, ça avait un autre goût de se motiver, de s'énerver et de relativiser à deux! Et voilà nous y sommes arrivées! Merci pour ta gentillesse et pour tous ces moments passés ensemble.

A tous mes amis, merci pour votre fidélité, votre soutien et d'avoir été toujours fiers de votre petite Rana. Une pensée spéciale à Soraya, Maya, Hassan et My special one…

Nour, merci d'avoir été toujours à mes côtés, de m'avoir soutenue, écoutée et encouragée. A quel point notre amitié ensoleille ma vie!

Mes grands chênes et hêtres, pilier de ma thèse ! Je vous dois un grand merci!

Ma petite France, merci pour ta générosité et ton hospitalité ! Ces cinq ans ont enrichi et teinté ma vie des plus belles des couleurs ! Ce n'est pas un au revoir, parce que notre histoire ne fait que commencer.

Papa, Maman et Raja: je suis là grâce à votre amour, votre soutien et votre confiance. Merci d'avoir facilité ma vie, de m'avoir encouragée et soutenue dans toutes mes décisions et surtout d'avoir cru en moi.

Papa, mon homme à jamais; Maman, le soleil de ma vie, Rajouj, mon ange capricieux : c'est à vous que je dédie le fruit de ces années de persévérance.

Mon Liban, ouvre moi tes bras, je suis de retour !

A mes trois amours,

Papa, Maman et Raja

C/N	Carbon/ nitrogen ratio
C130	Circumference at breast height
CO2	Carbone dioxide
D130	Diameter at breast height
DBB	Day from Bud Burst
DBH	Diameter at Breast Height
DM	Dry Matter
DTT	Dithiothreitol
Exp	exponential
HCl	Hydrochloridric acid
KCl	Potassium chloride
$KHSO_4$	Potassium sulfate
LAI	Leaf Area Index
Ln	Logarithm
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-oxidase
NaOH	Sodium Hydrocide
NSC	Non Structural Polypeptides
NSNC	Non Structural Nitrogen Compounds
OR	Oldest Rings
PP	PolyPeptides
RR	Recent Rings
RSA	Relative Specific Allocation
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TCA	Trichloroacetic acid
v/v	volume/ volume
VSP	Vegetative Storage Protein

SOMMAIRE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 1

LES ARBRES ET LES FORETS 1

Importance dans le cycle du carbone 1

Importance dans le cycle de l'azote 2

Face aux changements climatiques 3

LA MISE EN RESERVE CHEZ LES ARBRES 5

LES COMPOSES DE RESERVE 6

Les réserves carbonées 6

Les composés carbonés non-structuraux (NSC) 6

Les composés carbonés structuraux mobiles: les hémicelluloses 7

Les lipides 9

Les réserves azotées 10

Les acides aminés 11

Les protéines de réserves 13

LOCALISATION DES RESERVES ET DISTRIBUTION A L'ECHELLE DE L'ARBRE 17

ROLE DES RESERVES 21

Rythme saisonnier 21

Contraintes biotiques et abiotiques 22

Indicateurs de vitalité des arbres 22

DYNAMIQUES SAISONNIERES 23

Les composés carbonés non-structuraux (NSC) 23

Les réserves azotées 25

Les lipides 27

LE CHENE SESSILE ET LE HETRE 29

Généralités 29

Anatomie du bois et activité cambiale 29

Phénologie et croissance 31

Caractéristiques écophysiologiques 32

CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIFS 36

ARE SEASONAL FLUCTUATIONS OF CARBON AND NITROGEN NON-STRUCTURAL COMPOUNDS COUPLED WITHIN THE STEM SAPWOOD OF 50-YEAR-OLD SESSILE OAK AND BEECH TREES? 47

SUMMARY 49
INTRODUCTION 50
MATERIALS AND METHODS 52
RESULTS 56
DISCUSSION 59
REFERENCES 64

N SOURCES FOR CURRENT-YEAR SHOOT GROWTH IN 50-YEAR-OLD SESSILE OAK TREES: AN IN SITU ^{15}N LABELING APPROACH 73

ABSTRACT 74
INTRODUCTION 75
MATERIALS AND METHODS 77
RESULTS 82
DISCUSSION 85
REFERENCES 90

DISTRIBUTION OF NON-STRUCTURAL CARBON AND NITROGEN COMPOUNDS AT THE TREE LEVEL IN ADULT SESSILE OAK AND BEECH IN WINTER AND LATE SPRING 102

ABSTRACT 103
INTRODUCTION 104
MATERIALS AND METHODS 106
RESULTS 110
DISCUSSION 113
REFERENCES 119

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES 133

REFERENCES 141

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Synthèse bibliographique

LES ARBRES ET LES FORETS

Importance dans le cycle du carbone

Les arbres et les forêts couvrent plus de 4.1 x 10^9 hectares et représentent 30% de la surface terrestre (Dixon et al. 1994). Les arbres représentent un quart des ≈ 400 000 espèces de plantes vasculaires sur terre et peuvent atteindre des hauteurs élevées (jusqu'à 114 m) et sont caractérisés par une longévité considérable (jusqu'à 4000 ans, Schulman, 1958, Raven et Crane, 2007). L'importance des arbres se reflète par leur productivité, fournissant du matériau bois fortement utilisé, mais aussi par leur rôle dans le cycle du carbone (Schneider, 1989, Dixon et al. 1991, Roberntz et Linder, 1999).

Les écosystèmes forestiers fixent par la photosynthèse un bilan net de 1.5 Gt de carbone, représentant ainsi 20% des émissions humaines de CO_2 (Mortier, 2005). Ils constituent le stock de carbone terrestre le plus important et contiennent plus de 60% du carbone stocké dans la biosphère terrestre (Van Walle et al. 2001). Le carbone stocké dans les arbres varie suivant les espèces forestières de 23 à 82% du stock total de carbone de l'écosystème (Vande Walle et al. 2001). Les forêts tempérées, par exemple, couvrent environ 10 millions km^2 (25% de la surface forestière terrestre, IPCC, 1998), ce sont des puits de carbone estimés entre 1.4 à 2 tonnes C. $ha^{-1}.an^{-1}$ (Nabuurs et al. 1997, Brown et Schroeder, 1999).

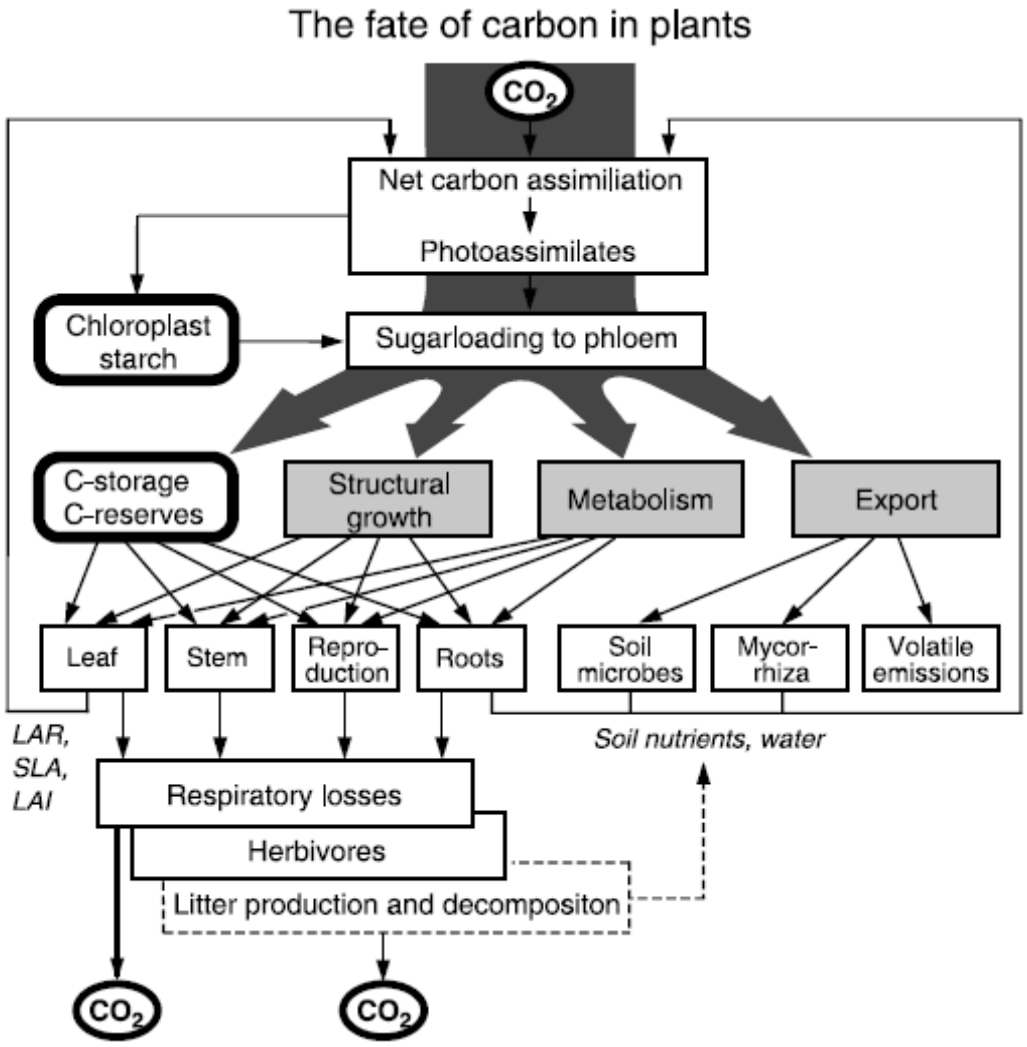


Figure 1. Le devenir du carbone assimilé par les arbres et son allocation vers les différentes fonctions physiologiques (LAR, leaf area ratio; SLA, specific leaf area; LAI, leaf area index, Körner, 2003).

Importance dans le cycle de l'azote

L'azote (N), le phosphore et l'eau sont les éléments limitant la productivité des écosystèmes forestiers des régions tempérées (Schneider et al. 1996). Les plantes assimilent principalement l'azote inorganique (ammonium NH_4^+, nitrate NO_3^-), qui représente 1% de l'azote du sol (Marschner et Dell, 1994). La plus grande partie de l'azote du sol est stockée sous forme organique (protéines, acides nucléiques, peptides, acides aminés) et qui peut représenter jusqu'à 90% de l'azote soluble total (Haynes, 1986). L'azote minéral est préférentiellement absorbé, il est assimilé en composés organiques (acides aminés, protéines et acides nucléiques) assurant des fonctions essentielles au développement des arbres. L'azote est aussi essentiel au fonctionnement de la photosynthèse (chlorophylles, rubisco, par

exemple). Dans des conditions où la minéralisation de l'azote est faible, les plantes développent une capacité à absorber l'azote organique, facilitée par la présence de mycorhizes. Dans les forêts décidues tempérées, la chute de la litière à l'automne est un des flux essentiels participant au recyclage des éléments nutritifs des écosystèmes forestiers.

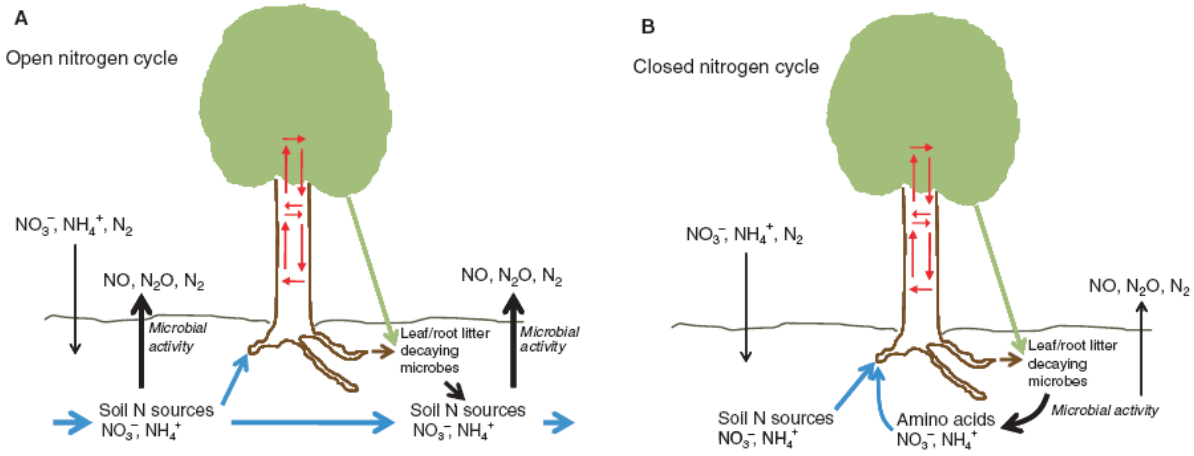


Figure 2. Le cycle de l'azote dans l'arbre dans un écosystème avec un cycle d'azote ouvert (A), et dans un écosystème caractérisé par un cycle d'azote fermé (B). Les flèches noires indiquent les flux entre le sol et l'atmosphère ainsi que dans le sol associés avec l'activité microbienne. Les flèches bleues représentent les flux depuis l'eau du sol vers les racines des arbres (A et B) et dans la nappe phréatique (A). Les flèches rouges illustrent le recyclage interne de l'azote dans l'arbre (Rennenberg et al. 2010).

Face aux changements climatiques

Du fait de leur longévité, les arbres sont soumis aux changements climatiques mettant à l'épreuve leurs capacités d'acclimatation. Bien que cette stratégie de longévité caractérisant les ligneux ait nécessité durant l'évolution de fortes capacités d'acclimatation et d'adaptation aux conditions changeantes de l'environnement (Ceulemans et Mousseau, 1994, Saxe et al. 1998), les évolutions climatiques rapides prévues pourraient augmenter les risques d'inadaptation et de dépérissement (Chemillier, 1997). Les effets des changements globaux sur les écosystèmes forestiers ont été d'abord positifs et ont contribué à augmenter leur productivité : augmentation des températures et conséquences sur la phénologie, augmentation de la concentration en CO_2 atmosphérique et effet positif sur la photosynthèse, et les dépôts azotés et effet fertilisant associé. Cependant, on peut craindre une augmentation de la vulnérabilité des écosystèmes aux aléas climatiques en particulier (sécheresse, tempête …) dont la fréquence et l'intensité pourraient également augmenter dans le futur proche. Ainsi, le délai de rentabilité économique et la longue durée de vie des espèces forestières nécessitent une anticipation importante des évolutions climatiques, en tendance et en

extrêmes, et de leurs conséquences biologiques de manière à adapter la sylviculture dès à présent (Bréda et al. 2000, Lebourgeois et al. 2001). Les arbres jouent un rôle important dans la séquestration du CO_2 et ainsi contribuent à l'atténuation de l'effet de serre. Certaines estimations suggèrent que la réduction de taux de la coupe à zéro dans les forêts tropicales et le reboisement de 250 millions d'hectares dans les tropiques (ou l'équivalent de 400 millions d'hectares dans les régions tempérées), pourraient séquestrer 25 billions tonnes de carbone dans les prochains 50 ans, ce qui est égal à $1/7^{ème}$ du total requis pour stabiliser la concentration du CO_2 atmosphérique à 500 ppm, le niveau actuel étant à 375 ppm (Raven et Crane, 2007).

Pour ce qui concerne l'azote, des apports passifs d'azote minéral se font via les dépôts humides (NO_3^-, $NH4^+$ et HNO_3) et secs (NH_3 et NO_x). L'origine des dépôts d'azote est essentiellement la pollution automobile, l'industrie et l'élevage. Dans les forêts françaises, la quantité totale d'azote apportée sous forme de dépôts varie en moyenne entre 2,5 à 20 kg d'N. ha^{-1}. an^{-1} pour NH_x et entre 2 à 27 kg d'N. ha^{-1}. an^{-1} pour le NO_x (Landmann et al. 1991). Dans les régions polluées, les apports d'azote atmosphérique sont parfois supérieurs aux besoins des peuplements forestiers. Ces apports excessifs peuvent avoir des conséquences néfastes telles que la toxicité directe au niveau des feuilles (Skeffington et Wilson, 1988) et l'acidification du sol (Dambrine et al. 1991).

LA MISE EN RESERVE CHEZ LES ARBRES

Chez les arbres, la mise en réserve est une des fonctions physiologiques majeures parmi l'acquisition des ressources, l'entretien, le transport, la croissance, la défense et la reproduction. Les réserves sont des ressources qui sont constituées par l'arbre et qui peuvent être remobilisées ultérieurement afin d'alimenter les biosynthèses nécessaires à la croissance et à diverses fonctions (Chapin et al. 1990).

Il existe 3 grandes catégories de mise en réserve :

1. **L'accumulation** de composés qui n'alimentent pas directement la croissance, cette accumulation a lieu quand l'acquisition des ressources excède la demande pour la croissance et l'entretien (Millard, 1988).
2. **La formation de réserves** impliquant une synthèse de composés de stockage pouvant alimenter directement la croissance. La formation des réserves est régulée métaboliquement, elle est cependant en compétition directe pour les ressources avec la croissance et la défense (Rappoport et Loomis, 1985).
3. **Le recyclage** de composés dont la fonction physiologique immédiate contribue à la croissance et à la défense, mais qui peuvent être remobilisés ultérieurement pour alimenter la croissance (Chapin et al. 1990).

La mise en réserve est également un mécanisme adaptatif qui assure la survie et la longévité des arbres face à un environnement aux conditions variables (Sauter et Van Cleve, 1994). Pendant longtemps, la mise en réserve fut considérée comme un processus passif résultant uniquement d'un excès de ressources assimilées après avoir satisfait les besoins de la croissance et de la respiration (Kozlowski et al. 1991, Körner, 2003). Cependant des études montrent le processus stockage comme un puits actif pouvant concurrencer d'autres puits tels que la croissance (Chapin et al. 1990, Silpi et al. 2007). Le concept classant la mise en réserve en tant que processus passif est donc simpliste (Cannell et Dewar, 1994, Lacointe, 2000, Le Roux et al. 2001). Par ailleurs, des études récentes chez le noyer ont montré que le ratio entre la croissance et la mise en réserve est légèrement affecté par l'ombrage (Lacointe et al. 2004), indiquant que les réserves peuvent être un puits concurrent pour le carbone. Ainsi les réserves constituent un réservoir important à considérer dans les bilans de carbone et d'azote des espèces pérennes.

LES COMPOSES DE RESERVE

Il existe deux grandes familles de composés de réserves chez les arbres: les réserves carbonées et azotées.

Les réserves carbonées

Cette catégorie est constituée par les composés carbonés non-structuraux (NSC) également appelés réserves glucidiques, les composés carbonés structuraux mobiles (les hémicelluloses) et les lipides.

Les composés carbonés non-structuraux (NSC)

Les NSC ou réserves glucidiques sont stockés essentiellement sous forme d'amidon et de sucres solubles (Tromp, 1983, Chapin et al. 1990), ils représentent jusqu'à 10% de la biomasse d'un arbre adulte (Barbaroux, 2002) et environ 35% de la matière sèche des jeunes plants feuillus (Nelson et Dickson, 1981, Tromp, 1983, Dickson, 1991).

L'amidon est le composé carboné le plus abondant et la forme privilégiée de stockage du carbone chez les plantes herbacées et les arbres (Nelson et Dickson, 1981, Stassen et al. 1981, Tromp, 1983). Sa composition simple, exclusivement des polymères de glucose liés en α (1→6) et en α (1→4), permet une synthèse et une dégradation rapide et non coûteuse, ce qui le rend idéal pour le stockage de carbone à court et moyen terme (Hoch, 2007). C'est aussi un polysaccharide insoluble dans l'eau qui présente l'avantage d'être métaboliquement inactif contrairement aux glucides de plus petite taille.

Les sucres solubles regroupent les monosaccharides, les disaccharides, les oligosaccharides, et les polyalcools (*e.g.* Monson et al. 2006). La fraction soluble participant au stockage du carbone est constituée principalement du disaccharide saccharose, qui est la forme de transport majoritaire chez de nombreuses espèces, et secondairement par les monosaccharides glucose et fructose (Kramer et Kozlowski, 1979). Chez certaines espèces, il existe d'autres formes solubles qui peuvent être prédominantes, comme le raffinose chez le mûrier et ses polymères chez le marronnier, le stachyose chez le frêne ou certains pins, ou des polyalcools chez le pommier et certains conifères (Bory et Clair-Maczulajtys, 1988). Les sucres solubles peuvent être recyclés afin d'alimenter la croissance, ils sont aussi impliqués dans d'autres fonctions métaboliques telles que les processus de biosynthèse et de maintenance des cellules et des tissus, le transport et la régulation osmotique. Les sucres

solubles agissent comme des agents osmotiques, ils permettent d'augmenter le potentiel osmotique des cellules afin de prévenir la déshydratation des tissus lors d'un déficit hydrique (Chaves, 1991). Lors d'un gel hivernal, les sucres solubles abaissent le point de congélation des tissus contribuant ainsi à la tolérance au froid des arbres (Sakai et Larcher, 1987). L'implication des sucres solubles dans la tolérance au froid est bien établie (Wanner et Junttila, 1999, Uemura et al. 2003). Chez nombreuses espèces ligneuses, la tolérance au froid est corrélée à la concentration des sucres solubles (Palonen et al. 2000, Lennartsson et Ögren, 2003, Poirier, 2008).

Les composés carbonés structuraux mobiles: les hémicelluloses

Certains composés carbonés structuraux comme les hémicelluloses sont reconnus récemment comme étant des réserves mobiles de carbone, en plus de leur fonction structurale (Hoch, 2007). Après la cellulose, les hémicelluloses sont les polysaccharides les plus abondants dans les tissus végétaux. Ce sont des composants de la paroi cellulaire primaire et secondaire, ils sont insolubles dans l'eau. Les hémicelluloses sont groupés en quatre classes suivant leur sucre principal: les xylanes, les xyloglucanes, les mannanes et les β-glucanes (*e.g.* Ebringerova et al. 2005). Les hémicelluloses sont considérées comme des polysaccharides multifonctionnels: ce sont d'abord des composés structuraux, mais ils peuvent être recyclés et utilisés comme des réserves de carbone pendant des périodes de fourniture réduite en carbone par la photosynthèse et peuvent être aussi recyclés des feuilles sénescentes avant leur chute en automne (Schädel et al. 2009).

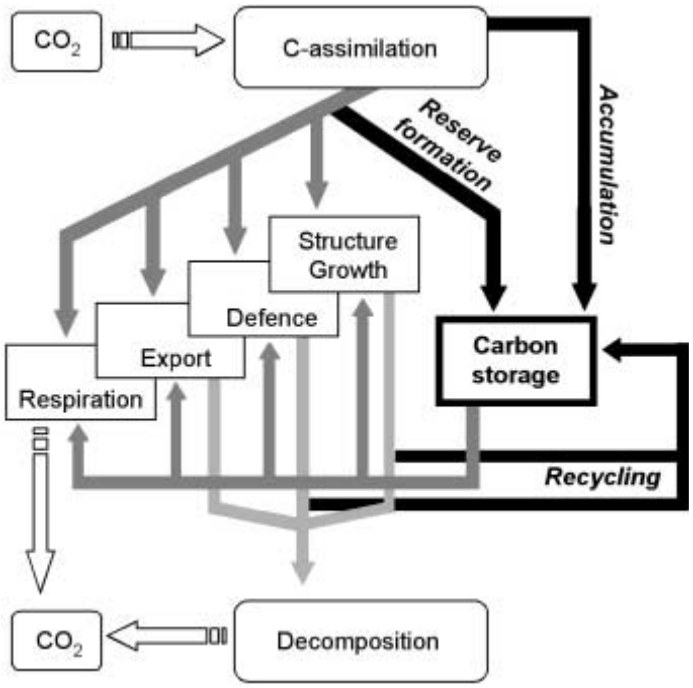


Figure 3. Chez les arbres, le carbone mobile peut être construit par une formation active, par une accumulation passive ou par recyclage de différents composés carbonés (flèches noires). Les hémicelluloses contribuent à la croissance structurale, mais certains groupes d'hémicelluloses peuvent faire aussi partie du stock de réserves de carbone (Hoch, 2007).

Dans les graines, les polysaccharides des parois cellulaires peuvent être des sources de carbone pendant la germination (Brett et Wladron, 1996, Buckeridge et al. 2000b). Ces polysaccharides de réserves sont identifiés comme étant des mannanes, des xyloglucanes, des β-glucanes, des galactanes pectiques ainsi que des arabinanes et ceci chez une multitude de familles végétales (*e.g. Arecaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Convolvulaceae, Fabaceae, Poaceae, Rubiacea, Solanaceae*). Ils sont stockés soit au niveau de l'endosperme, soit au niveau des cotylédons (Brett et Wladron, 1996), leur concentration diminue rapidement après la germination (Buckeridge et al. 2000b). Dans les tissus non-reproducteurs, Gäumann (1935) a été le premier à mettre en évidence des variations saisonnières de la concentration en hémicelluloses dans les bourgeons et les jeunes branches de hêtre. Par la suite, de nombreuses études ont montré des variations saisonnières en hémicelluloses chez différentes espèces de conifères et d'angiospermes *e.g. Abies, Taxus, Eucalyptus, Malus* et *Quercus* (Kozlowski, 1992), ainsi que chez une douzaine d'espèces de toundra (Chapin et al. 1986). Par ailleurs, plusieurs études ont étudié la mobilité des hémicelluloses en changeant la relation source-puits de carbone dans les plantes. Les réactions quantitatives des hémicelluloses mettent en évidence la mobilité de ces composés pariétaux suite aux différents traitements *e.g.* l'obscurité, des concentrations élevées en CO_2, la disponibilité des nutriments, la fertilisation,

la dessiccation, la sécheresse et les basses températures (pour plus de détails cf. la revue par Hoch, 2007).

Pendant le débourrement au printemps, la demande élevée en carbone, peut excéder la fourniture par la photosynthèse, chez les espèces décidues aussi bien que chez les espèces à feuilles persistantes. Plusieurs études ont montré que les hémicelluloses dans les aiguilles (ou les feuilles) de l'année précédente et dans l'aubier réagissent de la même façon que les composés carbonés non-structuraux, particulièrement l'amidon, aux besoins élevés en carbone pour la nouvelle croissance (Glerum et Balatinecz, 1980, Chapin et al. 1986, Kozlowski, 1992, Renault et Zwiazek, 1997). De même, la concentration en hémicelluloses dans le bois de certains conifères a montré une tendance à la baisse suite à une croissance active après fertilisation, période caractérisée par une forte activité des puits de carbone (Anttonen et al. 2002, Kilpeläinen et al. 2003, Kaakinen et al. 2004). Schädel et al. (2009) ont montré récemment que les hémicelluloses dans les jeunes branches de deux espèces décidues (*Carpinus betulus* L. et *Fagus sylvatica* L.) et de deux conifères (*Picea abies* L. et *Pinus sylvestris* L.) sont majoritairement des composés structuraux mais peuvent servir en tant que sources supplémentaires de carbone mobile pendant des périodes caractérisées par de fortes demandes en carbone telles que le débourrement et la fructification.

Les lipides

En plus des polysaccharides, certaines espèces accumulent des lipides neutres qui se trouvent en concentrations élevées dans les graines et les tissus non-reproducteurs tels que les aiguilles et les tissus parenchymateux du bois et de l'écorce (Esau, 1980, Lotova, 1987, Kozlowski et Pallardy, 1997). Ces arbres sont classés comme des « fat trees » par opposition aux « starch trees », *e.g. Quercus* et *Fagus*, accumulant principalement de l'amidon (Sinnott, 1918). Les lipides sont essentiellement accumulés sous forme de triacylglycérols, de phospholipides et de galactolipides (Bory et Clair-Maczulajtys, 1988).

Au niveau des graines, le stockage des lipides se fait au niveau des tissus de l'endosperme et du cotylédon, et préférentiellement dans le méga-gamétophyte (Grivova et al. 2007). Les lipides comptent jusqu'à 30 à 50% de la masse sèche des graines chez certains conifères *e.g. Abies alba* (Kovac et Kregar, 1989), *Picea abies* (Feirer et al. 1989) et *Picea taeda* (Krasowski et Owens, 1993). Ce sont aussi les composés de réserve les plus importants pour le développement des embryons de *Picea abies* et *Abies alba*, comptant pour environ 50 et

48% de la masse fraîche des graines respectivement (Feirer et al. 1989, Kovaè et Kregar, 1989, Attree et al. 1992).

De fortes concentrations en lipides ont été mises en évidence dans les tissus ligneux de certains conifères (*e.g. Pinus*), ainsi que chez des arbres décidus du genre *Tilia* et *Betula*, qui peuvent même excéder celles de l'amidon (Hoch et al. 2003). Dans l'aubier de *Pinus sylvestris* par exemple, la concentration en triacylglycérols peut atteindre jusqu'à 3.5% de la masse sèche (Saranpää et Piispanen, 1994). Chez les conifères, la concentration des lipides peut atteindre entre 50 et 70% du carbone non-structural au niveau de l'aubier (Körner, 2003). Cependant, l'amplitude des variations saisonnières du stock de lipides est faible (Nelson et Dickson, 1981, Fisher et Höll, 1992, Hoch et al. 2003), ce qui suggère qu'une fraction majeure de ce stock de carbone n'est pas utilisée dans la nouvelle croissance mais stockée suite à un surplus de carbone (Hoch et al. 2002). La synthèse et la remobilisation des lipides étant énergétiquement plus coûteuses que celles de l'amidon, ces composés carbonés sont probablement des réserves de long terme (Hoch et Körner, 2003). Le rôle protecteur de ces composés est particulièrement important pour les conifères subissant de basses températures hivernales. Les pins poussant dans les hautes altitudes alpines de la zone de limite des arbres (treeline) accumulent de fortes teneurs en lipides (exclusivement des triacylglycérols), c'est une réserve de carbone stable car elle est osmotiquement protégée (Sudachkova et al. 2004). Hoch et al. (2002) ont montré de faibles variations saisonnières des lipides dans les organes ligneux pérennes de *Pinus crenata* des hautes altitudes de la limite des arbres « treeline » suisse, alors que des pins du même site ont montré une réduction de 20 à 30% du stock de lipides du tronc et des branches après une défoliation complète comparé à des arbres témoins (Li et al. 2002, non publié, cité dans Hoch et Körner, 2003). Il semblerait que des stress contraignant la fixation du carbone tels qu'une défoliation complète pourraient entraîner la remobilisation d'une partie de ce stock. A l'exception de perturbations massives, la concentration élevée en lipides reste stable chez les trois espèces de pins étudiés à la limite altitudinale, ce qui semble refléter une réponse à un excédent de carbone.

Les réserves azotées

Les réserves azotées sont stockées principalement sous forme d'acides aminés et de protéines chez les plantes pérennes (Dickson, 1989). Les réserves azotées présentent une fraction plus faible par rapport aux réserves carbonées puisque l'azote représente moins de 1% de la biomasse d'un arbre (Sauter et al. 1988, Cheng et Fuchigami, 2002).

Les acides aminés

Le stockage de l'azote sous forme protéique implique des processus consommateurs d'énergie tels que la synthèse de polypeptides, l'assemblage des sous unités, le renouvellement (turnover) des ARN et des ribosomes, la protéolyse puis la conversion en acides aminés qui sont la forme préférentielle de transport des sites de stockage aux sites puits (Millard, 1988). Il est donc plus avantageux de stocker en plus de l'azote sous forme d'acides aminés qui est une forme de stockage plus facilement accessible.

L'arginine (4 moles N/mole) et les amides asparagine et glutamine (2 moles N/mole) ainsi que la proline sont les acides aminés les plus fréquemment cités comme étant impliqués dans le stockage de l'azote (Dickson, 1989).

Les arbres sont classés en trois groupes suivant le composé aminé dominant dans la sève du xylème: certains transportent préférentiellement l'allantoïne, d'autres des amides et d'autres la citrulline (Sauter, 1981). Les conifères, par exemple, transportent essentiellement des amides (Stoerner et al. 1997, Plassard et al. 2000) malgré leur capacité à accumuler des quantités importantes d'arginine dans leurs tissus en réponse à une fertilisation azotée au niveau sol (Stoerner et al. 1997) et aux dépôts atmosphériques azotés (Näsholm et al. 1997).

Pendant la phase de dormance hivernale, les acides aminés sont stockés au niveau du xylème et du phloème (Gessler et al. 1998a). La croissance printanière est souvent caractérisée par l'augmentation de la concentration de l'un ou de plusieurs acides aminés dans la sève du xylème après le début du débourrement (Frak et al. 2002). Les tissus puits de l'azote comme le cambium du tronc, les feuilles, les fruits et les bourgeons s'alimentent à partir du stock d'acides aminés circulant dans le xylème pour la synthèse de protéines et de composés organiques contenant de l'azote (Gessler et al. 2004). Les acides aminés non utilisés dans le xylème sont alors réalloués dans le phloème. Des expériences sur *Picea abies* ont montré que plusieurs composés aminés subissent un échange bidirectionnel entre le xylème et le phloème au niveau des pousses, spécialement quand il n'y a plus de tissus puits pour l'azote (Gessler et al. 2003). Les acides aminés chargés dans le phloème sont ensuite distribués de façon basipète dans l'arbre. Quand l'assimilation et le transport de l'azote au niveau de l'arbre excèdent la demande, le stock des acides aminés du phloème s'étend. Par conséquent, l'augmentation du stock d'acides aminés dans les racines inhibe l'assimilation du nitrate (Youssefi et al. 2000). La glutamine transportée dans le phloème est l'acide aminé primaire impliqué dans l'inhibition de l'assimilation du nitrate en régulant son assimilation suivant la demande (Cooper et Clarkson, 1989, Muller et al. 1996, Kreuzwieser et al. 1997,

Gessler et al. 1998c). Chez plusieurs espèces, d'autres composés aminés tels que l'arginine, l'alanine, l'asparagine, le glutamate, la méthionine et l'asparagine peuvent aussi inhiber le transport du nitrate (Muller et Tourraine, 1992).

L'arginine est l'acide aminé utilisé préférentiellement pour le stockage de l'azote en hiver. Ceci est avantageux pour les arbres, car l'arginine contient 4 moles d'azotes par mole, ce qui minimise par conséquent les besoins en carbone pour le stockage de l'azote (Rennenberg et al. 2010). Chez le peuplier, l'arginine est dominante en hiver, sa concentration représente jusqu'à 81% de la concentration totale en acides aminés dans la partie ligneuse des pousses (Rennenberg et al. 2010). Lors de la remobilisation printanière de l'azote, on observe une baisse de la concentration en arginine parallèlement à une augmentation de celle de la glutamine, qui devient alors l'acide aminé le plus abondant dans la sève du xylème (Sauter et Van Cleve, 1992, Schneider et al. 1994). L'augmentation de la concentration en glutamine est associée à la dégradation des protéines de réserve stockées au niveau des rayons parenchymateux (Sauter et Van Cleve, 1994). Les auteurs ont suggéré que la glutamine était un composant mineur des protéines de réserve (1.3%), mais la forme prédominante d'azote dans la sève du xylème (75%) suite à une transformation des acides aminés composant la VSP en glutamine précédant leur transport dans le xylème (Titus et Kang, 1982).

La glutamine est considérée comme le composé azoté majoritaire qui est transporté dans l'arbre chez plusieurs espèces (Sauter et Van Cleve, 1992, Malaguti et al. 2001, Grassi et al. 2002), elle est fréquemment échangée entre le xylème et le phloème (Gessler et al. 2004). Une dominance de la glutamine dans la sève du xylème au printemps a été reportée chez plusieurs espèces, comme *Prunus* spp. (Andersen et al. 1995, Grassi et al. 2002), *Populus* et *Salix* spp. (Sauter, 1981, Sauter et Van Cleve, 1994, Schneider et al. 1994), *Eucalyptus spp.* (Adams et al. 1995), *Vitis vinifera* (Peuke, 2000), *Pinus spp.* (Plassard et al. 2000), *Picea abies* (Schneider et al. 1996, Weber et al. 1998) et *Fagus sylvatica* (Schneider et al. 1996, Gessler et al. 1998c).

L'asparagine a été reportée comme étant l'acide aminé prédominant dans la sève du xylème de *Prunus dulcis* (Youssefi et al. 2000), *Malus domestica* (Tromp et Ovaa 1985, Malaguti et al. 2001), *Sorbus aucuparia* (Prima-Putra et Botton, 1998) et *Juglans nigra* * *regia* (Frak et al. 2002). Chez des jeunes plants de *Fagus sylvatica* soumis à une sécheresse sévère, l'asparagine s'accumule dans les tissus suite à une dégradation des protéines agissant ainsi comme un osmoprotecteur (Fotelli et al. 2002b).

La citrulline, qui est le précurseur de l'arginine, est le composé azoté prédominant dans la sève du xylème dans certaines espèces dont *Alnus* spp. (Lewis, 1986), *Betula pendula* (Millard et al. 1998) et *Juglans* spp. (Prima-Putra et Botton, 1998).

La proline est un acide aminé cyclique dont l'efficience de stockage de l'azote est faible (C/N : 5/1). Cependant, la proline peut être abondante dans certains tissus dormants (Dickson, 1989), c'est aussi l'un des acides aminés majeurs transportés dans le xylème et le phloème (Brugière et al. 1999). Outre sa fonction de stockage, la proline agirait comme un osmoprotecteur (ou cryoprotecteur) particulièrement lors d'un déficit hydrique (Bode et al. 1985, Rowland et al. 1988, Fotelli et al. 2002b, Gessler et al. 2005a). La proline est aussi accumulée dans les tissus des plantes suite à une variété de contraintes induits par la sécheresse, la salinité, les températures élevées ou basses et les métaux lourds (Munns, 2005, Sharma et Dietz, 2006).

Le stockage d'azote sous forme d'acides aminés chez les arbres n'est pas uniquement pertinent dans le contexte de la saisonnalité, mais aussi lorsque l'apport en azote excède la demande pour la croissance et le développement (Rennenberg et al. 2010). Dans les écosystèmes forestiers, un excès de nutrition azotée est d'origine anthropique. Cet excès résulterait du ruissellement de l'azote utilisé dans les engrais azotés et des dépôts atmosphériques de NO_x et de NH_3 provenant essentiellement des activités agricoles. La nutrition azotée de *Picea abies* et de *Fagus sylvatica*, par exemple, a été étudiée sous l'effet de dépôts azotés atmosphériques élevés par Rennenberg et al. (1998) et Rennenberg et Gessler (1999). Ces études ont montré un rôle majeur de l'arginine dans le stockage de l'azote sous ces conditions d'apport excessif d'azote.

Les protéines de réserve

Définition

Chez les plantes annuelles et pérennes, les protéines spécialisées dans le stockage de l'azote dans les tissus végétatifs ou VSP pour « Vegetative Storage Proteins » sont considérées comme étant la forme majeure de stockage de l'azote sous forme réduite (Staswick, 1994, Stepien et al. 1994). Selon O'Kennedy et Titus (1979), les VSP sont stockées de façon abondante dans les organes pérennes à l'automne et en hiver, puis disparaissent à la reprise de la croissance au printemps.

Actuellement deux définitions des VSP coexistent (Cooke et Weih, 2005):

1) Dans une perspective plus large, les VSP sont synthétisées à partir de ressources qui pourraient être allouées pour promouvoir les processus de croissance ou pouvant être remobilisées ultérieurement pour alimenter une croissance future (Chapin et al. 1990).
2) Sensu stricto, les VSP sont des protéines dont le métabolisme est induit par une demande pour former des réserves azotées plutôt que par une activité enzymatique. Ces protéines sont métaboliquement inactives pendant la période de stockage (Staswick, 1994).

Suivant la première définition, la Rubisco est considérée comme une VSP en plus de ses fonctions photosynthétiques et photorespiratoires (Cooke et Weih, 2005). La Rubisco, qui compte pour la moitié des protéines foliaires (Titus et Kang, 1982), agirait comme une réserve d'azote pendant les périodes de croissance active. Elle est dégradée pendant la sénescence foliaire, et les acides aminés issus de sa dégradation sont soit utilisés pour la synthèse *de novo* de protéines, soit impliqués dans d'autres processus métaboliques (Masclaux et al. 2001, Hörtensteiner et Feller, 2002). Cependant, les études mettant en évidence un rôle de la Rubisco dans le stockage de l'azote sont encore manquantes (Millard et al. 2007). Les VSP ont d'abord été étudiées chez le pommier (Tromp, 1970, Tromp et Ovaa, 1971, O'Kennedy et Titus, 1979). Les VSP *sensu stricto* ont été décrites pour la première fois chez le soja comme étant des protéines de stockage transitoire de l'azote qui s'accumulaient lorsque le transport du phloème est bloqué (Wittenbach, 1983, Staswick, 1989). Ensuite, elles ont été étudiées chez plusieurs espèces d'arbres (fruitiers, décidus et conifères): *Populus* (*e.g.* Langheinrich et Tischner, 1991, Stepien et Sauter, 1994), *Acer*, *Salix* (Wetzel et al. 1989), *Betula papyrifera*, *Robinia pseudoacacia*, *Gleditsia triacanthos* (Wetzel et Greenwood, 1991), *Prunus persica* (Gomez et Faurobert, 2002, Wisniewski et al. 2004), *Switenia macrophylla* (Tian et al. 2003), *Litchi chinensis* (Tian et al. 2007), *Pinus monticola* (Davidson et Ekramoddoullah, 1997). Cependant chez les arbres forestiers, les VSP sont beaucoup moins étudiées (Wetzel et Greenwood, 1991, Stepien et al. 1994).

Quand elles sont accumulées au niveau de l'écorce, les protéines de réserve sont communément appelées BSP (Bark Storage Proteins), c'est le cas du peuplier où la majorité des protéines de réserve sont des BSP (Cooke et Weih, 2005). Les pousses sont considérées comme étant l'organe principal de stockage des VSP (Tromp, 1970).

Rôle dans le stockage de l'azote

Le recyclage de l'azote foliaire pendant la phase automno-hivernale vers un stockage protéique dans les organes et tissus pérennes est un processus essentiel chez les espèces pérennes leur permettant de conserver ces ressources azotées afin de les réutiliser

ultérieurement pour initier la croissance printanière. L'accumulation des VSP dans les tissus pérennes traduit l'initiation et le développement de la dormance végétative chez les espèces ligneuses (Coleman et al. 1991). L'avantage des protéines de réserve par rapport aux acides aminés en tant que composés de réserves, c'est qu'elles permettent le stockage à une faible teneur en eau cellulaire réduisant ainsi les risques d'un gel éventuel (Chapin et al. 1990). En automne et en hiver, les VSP comptent pour 15% des protéines solubles totales dans l'écorce des pousses du Douglas (Roberts et al. 1991) et 25% chez le peuplier (Langheinrich et Tischner, 1991). Dans le bois du peuplier, les VSP peuvent atteindre jusqu'à 70% des protéines totales (Sauter et al. 1988). Au printemps, une remobilisation presque totale des VSP commence avant le début du débourrement (Wetzel et al. 1989, Sauter et Van Cleve 1990, Langheinrich et Tischner 1991, Langheinrich, 1993). Les VSP contribuent de manière significative à la fourniture de l'azote nécessaire aux stades de développement où la croissance est particulièrement intense *e.g.* l'édification de l'appareil photosynthétique (Staswick, 1994).

Chez le pêcher par exemple, les VSP sont les premières réserves azotées à être remobilisées au printemps, mais elles ne représentent que 5% de l'azote total remobilisé (55% proviendrait de la fraction non-protéique), ce qui suggère qu'elles ont plutôt un rôle qualitatif que quantitatif dans l'initiation et la reprise de la croissance au printemps (Gomez et Faurobert, 2002). Les VSP sont par ailleurs considérées par certains auteurs comme étant des indicateurs potentiels du statut azoté d'une plante ou d'un organe (Lawrence et al. 1997).

Autres fonctions

Selon les critères établis par Staswick (1994), la définition de VSP exclut toute autre fonction métabolique ou structurale. Cependant, de plus en plus de travaux attribuent des fonctions autres que celle de réserve pour certaines VSP comme dans la tolérance au froid et la résistance aux pathogènes et ceci chez plusieurs espèces d'arbres.

La tolérance au froid

L'accumulation massive de VSP chez les espèces ligneuses au cours de la période automno-hivernale a permis d'établir des corrélations avec l'acclimatation au froid et l'endurcissement au gel, *e.g.* chez *Picea glauca* (Binnie et al. 1994). Rowland et Arora (1997) considèrent les déhydrines et les BSP comme deux catégories de protéines dont l'abondance serait reliée à la dormance chez les plantes ligneuses.

La résistance aux pathogènes

Dans l'écorce du robinier (*Robinia pseudoacacia*), Yoshida et al. (1994) ont mis en évidence une lectine dont l'accumulation saisonnière est caractéristique d'une BSP. Chez le mûrier noir (*Morus nigra*), deux protéines appartenant à une famille de lectines agiraient en tant que BSP dans l'écorce en conditions normales et comme protéines de défense non spécifiques en cas d'attaques d'herbivores ou d'insectes phytophages (Van Damme et al. 2002). Chez le peuplier, la BSP de 32kDa et les VSP WIN4 et PNI288 sont supposées avoir un rôle dans la défense contre les herbivores par régulation de leurs gènes lors d'une blessure mécanique (Davis et al. 1993, Cooke et Weih, 2005). Cependant, la BSP de 32kDa ne montre pas d'activité enzymatique ni biologique selon Stepien et Martin (1992) et Stepien et al. (1994). Chez *Litchi chinensis*, un arbre fruitier subtropical à feuilles persistantes, une activité inhibitrice de la trypsine (trypsin inhibitor activity) a été attribuée à la VSP de 22kDa (Tian et al. 2007). Chez *Sapindus mukorassi*, un arbre décidu de la famille des sapindacées, une VSP de 23kDa a été démontrée comme étant immuno-liée (immuno-related) à la VSP de 22kDa chez *Litchi chinensis* qui a une activité inhibitrice de trypsine (Liu et al. 2009). En outre, une VSP de 67kDa chez *Hevea brasiliensis* montre une activité beta-glucosidase cyanogénique (Tian et al. 1998, Tian et Hao 1999, Liu et al. 2009). Chez le châtaigner japonais (*Castanea crenata*), appartenant à la famille des fagacées, une glutathione transférase de 28kDa semble avoir un rôle dans le stockage de l'azote en plus de son rôle intrinsèque de défense face aux stress en période de dormance (Nomura et al. 2007), de même une agglutinine (CCA) de la même espèce pourrait avoir un rôle de VSP assurant un stockage temporaire de l'azote (Nomura et al. 2008). Chez le mûrier noir (*Morus nigra*), deux lectines (jacalin-related lectins) agiraient comme des BSP, leurs activités étant cinq fois plus élevées en hiver par rapport à l'été (Van Damme et al. 2002).

Jusqu'à présent, il n'existe pas d'autres données sur des activités biologiques attribuées à des VSP d'arbres décidus (Liu et al. 2009).

Facteurs régulateurs

Plusieurs études ont montré que l'accumulation des VSP et notamment la BSP de 32kDa du peuplier serait induite par différents facteurs, tels que la disponibilité en azote (Van Cleve et Apel, 1993, Coleman et al. 1994), la température (Van Cleve et Apel, 1993), la photopériode (Langheinrich et Tischner 1991, Coleman et al. 1991) ainsi que les blessures (Davis et al. 1993). Les protéines de réserve répondent aussi à des facteurs internes comme le statut azoté ou les hormones *e.g.* l'auxine (Rowland et Arora, 1997). Par exemple, la

réduction de la température de 22°C (jour)/ 18°C (nuit) à 14°C (jour)/ 8°C (nuit) chez le peuplier induirait l'accumulation de la BSP de 32kDa (Van Cleve et Apel, 1993). De même, après une exposition de trois semaines à des jours courts (8h de jour, 16h de nuit), une accumulation significative de la BSP 32kDa a été détectée chez *Populus * cadensis* (Coleman et al. 1991, Van Cleve et Apel, 1993). Une augmentation du niveau de la nutrition azotée favorise aussi l'accumulation de la BSP de 32kDa (Van Cleve et Apel, 1993, Coleman et al. 1994, Zhu et Coleman, 2001). L'accumulation de la protéine WIN4 appartenant à la famille des BSP du peuplier est induite par une blessure au niveau foliaire (Davis et al. 1993, Lawrence et al. 2001), elle est favorisée par le méthyljasmonate. A court terme, le méthyljasmonate favorise l'accumulation de la WIN4 et de la BSP de 32kDa dans les jeunes plants de peuplier. À long terme, le méthyljasmonate entraîne des modifications en fonction des parties des plants dans la concentration des protéines et de l'azote et modifie l'accumulation de la BSP de 32kDa et de la WIN4 (Breadmore et al. 2000).

LOCALISATION DES RESERVES ET DISTRIBUTION A L'ECHELLE DE L'ARBRE

Les plantes non-ligneuses développent des structures spécialisées dans la mise en réserve telles que les bulbes, les rhizomes ou les tubercules alors que les ligneux ne possèdent pas de telles structures. Chez les arbres, les réserves sont généralement stockées et remobilisées dans l'ensemble du plant (Chapin et al. 1990, Tagliavini et al. 1998). Tous les organes participent potentiellement au stockage des réserves carbonées et azotées (Tromp, 1983, Chomba et al. 1993, Bollmark et al. 1999) mais n'ont pas la même importance.

Les feuilles constituent un organe de stockage temporaire de l'ordre de la journée chez les espèces décidues (Trethewey et Smith, 2000). Le stockage saisonnier des réserves se fait dans les tissus lignifiés tels que le tronc, les racines, les branches et les pousses (Titus et Kang, 1982, Tromp, 1983, Sauter et Neumann, 1994, Stepien et al. 1994). Chez les espèces à feuilles persistantes et les conifères, la concentration en sucres dans les feuilles et les aiguilles peut être plus forte que dans les tiges ou les racines et présente des variations saisonnières plus importantes (Fisher et Höll, 1991 et 1992, Schaberg et al. 2000). La même tendance a été constatée pour l'azote (Mead et Pritchett, 1975, Nambiar et Fife, 1991, Millard et Proe, 1992, Millard et al. 2001, Cerasoli, 2002).

A l'échelle de l'arbre, les racines sont l'organe pérenne qui présente les concentrations les plus élevées en réserves glucidiques (Lacointe, 2000, Barbaroux et al. 2003) et azotées

(Titus et Kang, 1982). Chez les arbres adultes, le tronc représente la biomasse la plus importante (Bartelink, 1998, Grulke et Retzlaff, 2001). Vu sa biomasse vivante, le tronc est le compartiment de réserves carbonées le plus important (Barbaroux et al. 2003). Alors que l'azote et les protéines sont particulièrement concentrés au niveau de l'écorce du tronc (Titus et Kang, 1982, Titus 1989). Cependant, l'écorce représente une fraction beaucoup plus petite que le bois au niveau du tronc, ce qui conduirait à une sous-estimation de l'importance du tronc dans le stockage de l'azote. Les feuilles et les fines racines, comparées à leur biomasse, sont des compartiments mineurs de réserves (Dubroca, 1983, Nguyen et al. 1990). La contribution de chaque organe au stockage des réserves à l'échelle de l'arbre dépend ainsi principalement de sa biomasse. Chez les arbres adultes, la biomasse aérienne contient la quantité de réserves la plus importante à l'échelle de l'arbre même si les réserves sont plus concentrées dans les parties souterraines (Kozlowski, 1992). Cependant, il faudrait bien distinguer les variations saisonnières de la concentration des composés de réserves afin de souligner l'importance pondérale des différents organes dans la mise en réserve. Par exemple, chez *Salix viminalis*, les variations saisonnières des quantités d'azotes sont similaires dans les racines et les tiges, quant aux concentrations, elles sont plus élevées dans les tiges (Bollmark et al. 1999).

La nature chimique des composés mis en réserve peut varier d'un organe à l'autre. Chez *Salix viminalis* par exemple, l'azote est stocké sous forme protéique dans les tiges et sous forme d'acides aminés dans les racines. Ce même phénomène a été observé chez les arbres fruitiers, où les racines stockent de façon privilégiée des acides aminés par rapport aux parties aériennes (Tromp, 1983) ainsi que chez le chêne pédonculé âgé de 20 ans (Valenzuela Nunez, 2006).

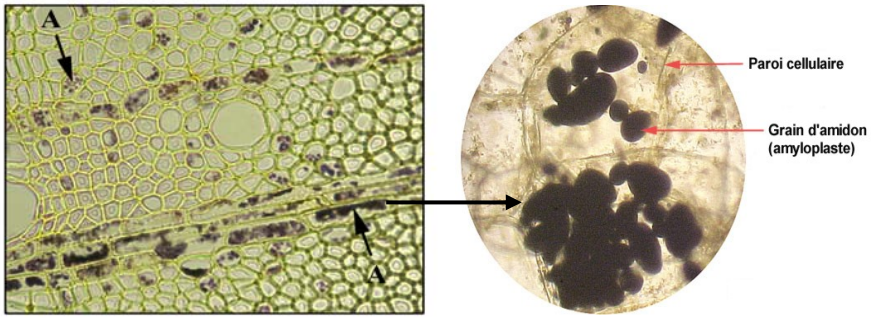
L'accessibilité des tissus et des organes de stockage au sein d'un arbre est un paramètre permettant de mieux comprendre le stockage et la remobilisation préférentielle des composés de réserve dans certains compartiments de l'arbre par rapport aux autres. Dans le tronc, le stockage puis la remobilisation des composés de réserve ont lieu à partir de la zone cambiale riche en vaisseaux (Fisher et Höll, 1992). Dans le tronc de chêne sessile et de hêtre par exemple, la concentration des composés carbonés non-structuraux est plus élevée dans les cernes les plus récents, proches des vaisseaux conducteurs et diminue progressivement en direction de la moelle (Barbaroux et Bréda, 2002). Plusieurs études ont montré que les organes proches des parties en croissance tels que les branches, stockent et remobilisent des

réserves plus intensément que ceux plus éloignés (Titus et Kang, 1982). Ces organes présentent aussi une dynamique saisonnière plus marquée (Bollmark et al. 1999, Cerasoli, 2002, Hoch et al. 2003). Par ailleurs chez le hêtre, il semblerait que les branches remobilisent plus de carbone que le tronc pour le débourrement et la croissance de la nouvelle pousse au printemps (Barbaroux, 2002, Barbaroux et Bréda, 2002). Hoch et al. (2003) ont mis en évidence une diminution significative des réserves glucidiques dans les branches de hêtre entre Juin et Août et plus précisément lorsqu'il s'agit d'une année de fructification. Cependant, les réserves de certains organes sont qualifiées d'égoïstes vu leur utilisation locale, c'est le cas des réserves glucidiques des racines fines qui sont utilisées localement pour le renouvellement de ces organes (Barbaroux, 2002).

Les tissus jeunes en croissance utilisent prioritairement les réserves par rapport aux tissus plus âgés (Lacointe et al. 1993). Le stock de réserves augmente près des organes puits pour une utilisation plus rapide et efficace des réserves. Barbaroux et al. (2003) ont trouvé que les parties les plus jeunes des branches et du tronc étaient plus concentrées en composés carbonés non-structuraux que les parties les plus âgées de ces organes. Ces résultats sont en accord avec les études sur la distribution des réserves carbonées (Kramer et Kozlowski, 1979, Samuelson et Kelly, 1996, Bollmark et al. 1999) et des protéines de réserves à l'échelle de l'arbre (Sauter et al. 1989). Les jeunes pousses (âgées d'un an) accumulent plus de protéines de réserves que le tronc ou les racines (Sauter et al. 1989). Cette distribution peut être expliquée par la distribution des tissus de stockage et par la distance aux organes puits. En effet, l'anatomie du bois est différente entre organes et change avec l'âge. Le vieillissement cambial résulte en une augmentation de la formation de vaisseaux au détriment des cellules parenchymateuses où sont stockés les composés de réserve (*e.g.* chez le hêtre, Vollenweider et al. 1994, et le chêne, Helinska-Raczkowska, 1994).

Au niveau cellulaire, la mise en réserve est une fonction attribuée à des cellules vivantes non spécialisées (Tromp, 1983). Les composés de réserves sont stockés dans les cellules parenchymateuses du bois et de l'écorce (Kramer et Kozlowski, 1979, Magel et al. 1997) situées à proximité des tissus vasculaires, ce qui optimiserait leur transport (Fisher et Höll, 1992, Tromp, 1983). Une forte proportion des cellules vivantes dans les racines peut expliquer leur forte concentration en composés de réserves par rapport au bois (Lacointe, 2001), il en est de même vis-à-vis de la richesse de l'écorce en azote et en protéines par rapport au bois (Titus et Kang, 1982).

Dans les cellules, les réserves se trouvent compartimentées dans des plastes (des amyloplastes pour l'amidon, Chapin et al. 1990) ou dans des vacuoles déshydratées (pour les VSP, Staswick, 1994). Cette compartimentation permet de protéger les composés de réserves d'une dégradation éventuelle dans le cytoplasme (Chapin et al. 1990) et de maintenir la force de puits nécessaire à l'accumulation des réserves de façon importante (Tromp, 1983).



© C. Barbaroux (*Fagus sylvatica*)

Figure 4. Compartimentation de l'amidon dans des amyloplastes à l'échelle cellulaire.

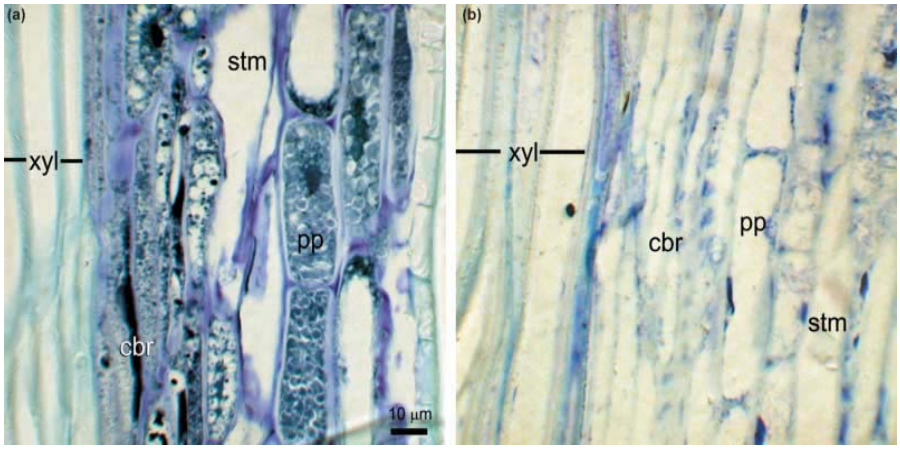


Figure 5. Variations saisonnières de l'accumulation des protéines de réserve dans les tiges du peuplier (*Populus deltoides*). La photo montre des coupes longitudinales de tiges échantillonnées en janvier (a) et en juillet (b). Les coupes ont été colorées pour mettre en évidence l'accumulation de protéines. En janvier, le parenchyme du phloème contient de nombreuses vacuoles riches en protéines alors qu'en juillet, les cellules parenchymateuses du phloème contiennent une seule vacuole centrale et la coloration est limitée à la périphérie des cellules. Xyl : xylème; cbr : cambium; pp : parenchyme du phloème; stm : tubes criblés. (Cooke et Weih, 2005).

ROLE DES RESERVES

Les composés de réserve sont impliqués dans le rythme saisonnier des arbres et servent à maintenir l'intégrité physiologique des arbres face aux contraintes climatiques et biotiques. Les réserves peuvent être aussi utilisées comme indicateurs pour évaluer l'état de santé et la vitalité des arbres.

Rythme saisonnier

Les réserves jouent un rôle primordial dans le rythme saisonnier annuel et pluriannuel chez les espèces pérennes et particulièrement chez les arbres feuillus décidus.

En climat tempéré, les arbres montrent un repos végétatif pendant l'hiver. Pendant cette période de dormance, l'assimilation des ressources est ralentie ou absente. Les arbres assurent alors l'entretien de leurs tissus grâce aux réserves stockées dans leurs tissus végétatifs (Kramer et Kozlowski, 1960). Les réserves permettent aussi aux arbres de s'endurcir au froid et de résister aux gelées (Sakai et Larcher, 1987). La conversion de l'amidon en sucres solubles, jouant le rôle d'agents osmotiques, permet d'abaisser le point de congélation des tissus. On observe cette conversion essentiellement dans l'écorce et le bois des parties aériennes mais pas dans les racines qui sont moins exposées à de très faibles températures (Nelson et Dickson, 1981, Tromp, 1983, Sauter, 1988). De même, une augmentation de la concentration en protéines solubles a été corrélée à l'augmentation de la résistance au froid chez plusieurs espèces à bois dur (Siminovitch et al. 1968, Kang et Titus, 1989) et à bois tendre (Pomeroy et al. 1970). Lors de la reprise de la croissance au printemps, les réserves sont remobilisées afin de fournir le carbone et l'azote nécessaires à la mise en place du nouveau feuillage et la croissance des pousses avant que l'appareil photosynthétique ne soit fonctionnel et que l'assimilation minérale de l'azote ne soit efficace (Tromp, 1983). Les glucides contribuent aussi à la réactivation cambiale (Hansen, 1977, Oribe et al. 2001). Le carbone stocké dans le tronc du chêne sessile par exemple, est remobilisé principalement pour produire les vaisseaux du xylème du bois initial au printemps (Bréda et Granier, 1996, Barbaroux et Bréda, 2002). L'expansion foliaire est le puits le plus fort d'azote remobilisé au printemps; jusqu'à 90% de l'azote foliaire des arbres proviendraient des réserves (*e.g.* Millard, 1996, Neilsen et al. 1997).

Contraintes biotiques et abiotiques

Les composés de réserve contribuent à préserver l'intégrité physiologique des arbres face à différents aléas de nature biotique et abiotique comme la sécheresse (Bréda et al. 2006), les gelées (Morin et al. 2007), les défoliations (Marçais et Bréda, 2006), les attaques d'insectes (Rohde et al. 1996) et les blessures (Bory et al. 1991).

Lors d'un déficit hydrique par exemple, les stomates se referment pour limiter la perte d'eau par transpiration réduisant ainsi l'acquisition de carbone par photosynthèse. Ainsi, après la sécheresse exceptionnelle de 2003, Bréda et al. (2006) ont observé une baisse significative des concentrations en amidon en fin de saison chez des hêtres adultes ayant perdu prématurément leurs feuilles. On observe souvent une diminution de la concentration en amidon qui est parfois couplée à une augmentation de la concentration en sucres solubles (Chaves, 1991). Ces derniers vont augmenter la pression osmotique des cellules afin d'empêcher la déshydratation des tissus d'une part, et afin d'assurer le maintien du métabolisme d'autre part.

Lors d'une attaque de pathogènes ou d'insectes, une partie des réserves sera remobilisée pour synthétiser des composés de défense et pour maintenir la croissance et l'activité métabolique de l'arbre (Rohde et al. 1996). Ainsi quand un arbre est défolié, comme c'est le cas du chêne et du pin quand ils sont attaqués par les chenilles processionnaires, les réserves stockées dans les organes pérennes leur permettront de produire un nouveau feuillage (Vanderklein et Reich, 1999, Cherbuy et al. 2001) et de survivre à plusieurs cycles de défoliations au sein de la même saison (Hoch et al. 2003).

Lors d'un gel hivernal, les arbres accumulent des sucres solubles de faible poids moléculaire dans leurs tissus (Morin et al. 2007). Ces sucres permettent de stabiliser les membranes cellulaires (Lennartsson, 2003, Cavender-Bares et al. 2005), de réduire la formation de glace dans le cytoplasme des cellules (Almeida et al. 1994), de maintenir la respiration de maintenance et de rétablir un métabolisme fonctionnel après le gel (Ashworth et al. 1993, Schrader et Sauter, 2002, Guy, 2003, Wong et al. 2003).

Indicateurs de vitalité des arbres

La concentration en composés de réserve et la croissance sont des indicateurs pertinents pour évaluer l'état de santé d'un arbre (Renaud et Mauffette, 1991). Les glucides sont la source principale d'énergie pour les plantes et leur teneur dans les tissus est utilisée comme un indicateur de la vitalité des arbres (Wargo, 1975, M^{c}Cullough et Wagner, 1987, Kosola et al.

2001, Martinez-Trinidad et al. 2009b, 2009c et 2010). En effet, la teneur en amidon et en glucose des organes d'un arbre reflète sa capacité de résistance et de survie à des conditions de stress (Tschaplinski et Blake, 1994, Barbaroux et al. 2003). Il a été montré chez des chênes défoliés que la concentration en amidon en fin de saison de végétation permettait de prédire leur probabilité de survie (Marçais et Bréda, 2006). L'évaluation du contenu en glucides d'un arbre est l'un des paramètres utilisés fréquemment pour évaluer son état de santé parmi la mesure de la fluorescence de la chlorophylle qui indique l'efficience photochimique du photosystème II (Percival et Fraser, 2005) et la mesure de la résistance électrique de la zone cambiale qui renseigne sur le potentiel de croissance (Blanchard et al. 1983, McCullough et Wagner, 1987).

DYNAMIQUES SAISONNIERES

Chez les arbres feuillus décidus des climats tempérés, les réserves carbonées et azotées présentent une dynamique ou une rythmicité saisonnière à l'échelle annuelle impliquant des phases d'accumulation et de remobilisation. Cette dynamique diffère entre les réserves carbonées et azotées en termes de cinétique et d'amplitude.

Les composés carbonés non-structuraux (NSC)

Chez les espèces feuillues, la concentration en composés carbonés non-structuraux (NSC) augmente en été (Sauter et Van Cleve, 1994), elle est souvent maximale en automne et minimale à la fin du printemps (Barbaroux et Bréda, 2002). Alors que chez les espèces à feuilles persistantes, le stock de NSC atteint un maximum avant le début du débourrement au printemps puis atteint son niveau minimal à la fin de l'été (*e.g.* Hoch et al. 2003, Spann et al. 2008). Chez les arbres décidus, la dynamique saisonnière des NSC suit celle de l'amidon généralement (Hoch et al. 2003). La teneur en amidon atteint une valeur maximale deux fois dans la saison : à la fin de l'automne et avant le débourrement des feuilles au début du printemps. Ces deux pics sont suivis par une période de remobilisation illustrée par une conversion en sucres solubles (Lacointe et al. 1994). La concentration des sucres solubles suit une dynamique inverse à celle de l'amidon (Lacointe et al. 1994, Schaberg et al. 2000), elle est souvent corrélée à la température, à l'exception de celle du saccharose (Fisher et Höll, 1992).

En automne, les composés carbonés non-structuraux sont transportés des feuilles sénescentes vers les organes pérennes notamment le tronc et les racines. En hiver et

parallèlement à la chute des températures, l'amidon est dégradé (Sauter, 1988), sa concentration diminue fortement pour atteindre une valeur minimale. La température a un effet direct sur la β-amylase, l'enzyme dégradant l'amidon qui est activée après 3 jours à des températures comprises entre 3 et 5°C (Nielsen et al. 1997). Parallèlement à l'hydrolyse de l'amidon, les sucres solubles et particulièrement les monosaccharides s'accumulent (Piispanen et Saranpää, 2001, Deslauriers et al. 2009), leur concentration atteint alors une valeur maximale. L'accumulation de ces agents osmotiques permettra à l'arbre de résister au froid et aux gelées (Sakai and Larcher 1987, Ögren, 1999) en abaissant le point de congélation des tissus (Morin et al. 2007). Au printemps et juste avant le débourrement, on observe le second pic d'amidon. Ce phénomène a lieu chez les espèces décidues comme le pommier (Hansen et Grauslund, 1973), le peuplier (Sauter et Wellenkamp, 1998), le hêtre (Gansert et Sprick, 1998) ou le chêne (Barbaroux, 2002), et chez les espèces à feuilles persistantes, comme le pin des Alpes (*Pinus cembra*) et le pin sylvestre où la concentration en amidon est multipliée par 5 dans les aiguilles et le tronc (Fisher et Höll, 1991 et 1992, Hoch et al. 2002). En effet, les conifères sont photosynthétiquement actifs et assimilent du carbone avant la croissance de la nouvelle pousse si la température de l'air le permet (Pisek et Tranquillini, 1959), ce qui expliquerait l'accumulation de l'amidon dans les aiguilles de l'année précédente juste avant le débourrement (Hoch et al. 2002). Pendant le débourrement, la concentration en NSC diminue fortement dans les organes pérennes, cette diminution résulte d'une forte allocation du carbone vers les sites de croissance et se traduit par une forte baisse de la concentration en amidon (Barbaroux et Bréda, 2002). Dans les aiguilles d'un an de pin sylvestre, la concentration en amidon diminue de plus de moitié pendant la croissance des nouveaux rameaux (Fisher et Höll, 1991). Chez le peuplier, l'amidon est remobilisé quasi totalement dans des rameaux de quatre ans pendant le débourrement (Witt et Sauter, 1994). Chez les espèces sempervirentes, la diminution de la concentration en amidon dans les organes pérennes résulte de la diminution du flux des photosynthétats qui sont alloués fortement vers les pousses en croissance (Cerasoli, 2002). La remobilisation des réserves carbonées au printemps diffère entre espèces et organes pérennes. Le chêne sessile, par exemple, remobilise de l'amidon à partir de tous ses organes pérennes (tronc, racines et branches), quant aux sucres solubles, leur concentration varie très peu pendant cette période (Barbaroux, 2002). Chez le hêtre, la concentration en amidon et en sucres solubles ne changent pas dans les racines. Dans le tronc, la concentration en sucres solubles diminue, alors que celle de l'amidon augmente, alors que dans les fines branches l'amidon et les sucres solubles sont à la fois remobilisés (Barbaroux, 2002). Chez les espèces sempervirentes, la

remobilisation du carbone pour le développement de la nouvelle pousse a une importance mineure vue la présence d'un appareil photosynthétique intact dans les aiguilles des années précédentes. Chez *Pinus sylvestris*, la fourniture du carbone pour le débourrement est assurée exclusivement par les néo-assimilats produits par les aiguilles d'un an (Hansen et al. 1996). Le carbone stocké à l'automne dans le tronc et les racines, est utilisé pour la formation du bois initial et du phloème dans le tronc et les racines (Hansen et Beck, 1960). Le remplissage des réserves commence tôt dans la saison de végétation. Dès la fin de l'expansion foliaire, les réserves en amidon commencent à se reconstituer (Gansert et Sprick, 1998, Barbaroux et Bréda, 2002). Dans les rameaux de saule, l'amidon commence à s'accumuler dès que la croissance des nouvelles pousses est terminée et se poursuit jusqu'à la sénescence foliaire (Sauter et Wellenkamp, 1998). Cependant, le remplissage des réserves ne se fait pas aux mêmes dates ni au même rythme dans tous les organes et de la même façon chez toutes les espèces. Chez le chêne sessile, le stockage des réserves commence d'abord dans les fines branches puis un mois après dans le tronc et les racines (Barbaroux, 2002). Chez le hêtre, le remplissage des réserves glucidiques se produit d'abord dans les fines branches et se produit très tardivement dans la saison dans les racines et reste inchangé dans le tronc tout au long de la saison de végétation (Barbaroux, 2002). La teneur en amidon atteint son maximum au moment de la sénescence foliaire dans les différents organes pérennes. Des résultats similaires ont été trouvés chez le pêcher (Stassen et al. 1981). Le stockage des réserves glucidiques se fait de façon basipète dans l'arbre, il commence dans les parties aériennes puis dans celles souterraines. Au plan radial, le remplissage (aussi bien que la remobilisation) débute à partir de la zone cambiale du tronc (Fisher et Höll, 1992) et se propage en profondeur jusqu'à la limite du bois de cœur.

Les réserves azotées

Le recyclage saisonnier de l'azote permet de réduire les pertes en azote qui est le facteur le plus limitant pour la croissance des arbres (Rennenberg et al. 2009). Ce recyclage pourrait potentiellement contribuer à l'efficience de l'utilisation de l'azote (Vitousek, 1982, Chapin et Kedrowski, 1983, Boerner, 1984, Aerts, 1990) et accroît la productivité à long terme des espèces pérennes et particulièrement les arbres décidus (Killingbeck, 1996, Eckstein et al. 1999). Le stock des réserves azotées peut fluctuer à tout moment pendant la saison de végétation (*e.g.* après une défoliation), mais la modification la plus importante a lieu à la fin de la saison (Cyr et Bewley 1989, Cyr et al. 1990, Gloser 2005). Le contenu en azote des

organes pérennes augmente à la fin de la saison de végétation, cette augmentation est souvent liée positivement à la survie hivernale et à la croissance printanière (Chapin et al. 1990), c'est aussi le résultat de plusieurs processus :

1) l'augmentation de la disponibilité de l'azote dans le sol,

2) l'absorption de l'azote par les racines étant moins limitée par son assimilation et son utilisation pour la croissance,

3) l'allocation des composés azotés depuis les feuilles sénescentes,

4) la synthèse et l'accumulation de composés cryoprotecteurs tels que la proline (Gloser, 2005).

Cependant, l'importance relative de chacun de ces processus sur la quantité finale d'azote stocké reste très peu connue (Gloser, 2005). Les variations saisonnières des réserves azotées *sensu stricto* suivent une dynamique plus simple que celle des réserves glucidiques. Cette dynamique se caractérise par 2 phases : une phase d'accumulation dans les organes pérennes à la fin de l'automne et en hiver, suivie d'une phase de remobilisation intense au printemps pour la croissance des nouveaux organes (Titus et Kang, 1982). Le recyclage saisonnier de l'azote est lié fortement à la phénologie (Millard et Grelet, 2010) qui est un trait adaptatif important des espèces pérennes qui détermine le timing et la durée de la saison de croissance (Hänninen, 1990).

En automne, les jours courts et la baisse de la température entraînent un recyclage de l'azote depuis les feuilles sénescentes vers les organes pérennes tels que le tronc, les branches, les racines et les pousses (Thomas et Stoddart, 1980) illustrant un changement dans le métabolisme foliaire : de l'assimilation des ressources à leur remobilisation et leur export. Les protéines foliaires sont dégradées en acides aminés qui seront transportés via le phloème vers les tissus pérennes où les protéines de réserve (VSP) seront synthétisées et accumulées dans le parenchyme de l'écorce et dans les rayons ligneux (Titus et Kang, 1982, Sauter et al. 1989, Wetzel et al. 1989, Stepien et al. 1994, Hörtensteiner et Feller, 2002, Gessler et al. 2004). La remobilisation de l'azote foliaire commence avec le jaunissement des feuilles et se poursuit jusqu'à leur chute (Sauter et Van Cleve, 1994, Bollmark et al. 1999). En revanche, chez les espèces à feuilles persistantes, l'azote est remobilisé des feuilles âgées durant toute leur vie (Wendler et al. 1995) et non seulement à leur sénescence (Nambiar et Fife, 1987). Les quantités d'azote remobilisées pendant la sénescence foliaire sont très importantes: entre 40 à 80% de l'azote serait recyclé à l'automne (Chapin et Kedrowski, 1983, Millard et Proe, 1991, Vizoso et al. 2008). Shim et al. (1972) estiment que la remobilisation automnale de l'azote foliaire vers les parties ligneuses de l'arbre permet de sauvegarder jusqu'à 2/3 de son contenu

en azote. La concentration en protéines dans les feuilles sénescentes diminue de 50% environ, cette diminution est due à 90% à la dégradation de la Rubisco (Kang et Titus, 1980) qui constitue une source majeure pour le stockage de l'azote dans les organes pérennes. Au printemps, une forte remobilisation des composés azotés stockés dans les parties pérennes de l'arbre a lieu (Millard, 1994), les VSP sont dégradées en acides aminés qui seront transportés aux sites de croissance, essentiellement les bourgeons et les feuilles où ils seront utilisés pour la néo-synthèse de protéines (Bollmark et al. 1999, Cooke et Weih, 2005). La remobilisation de l'azote est très importante à l'échelle de l'arbre et peut être totale (Millard, 1993 et 1996) dans certains organes comme les rameaux (Sauter et Van Cleve, 1994, Sauter et Wellenkamp, 1998). En effet, le débourrement a lieu à une période où les conditions d'acquisition de l'azote par les racines ne sont pas optimales (Titus et Kang, 1982, Chapin et al. 1990). De même, la fourniture de squelettes carbonés est impossible en absence de l'appareil photosynthétique (Titus et Kang, 1982). Pour cela, l'azote nécessaire à la croissance des nouveaux tissus provient essentiellement des réserves azotées (Tromp, 1983), au moins aux premiers stades de croissance (Millard, 1994, Millard et al. 1998). L'importance relative des VSP et des acides aminés dans la remobilisation printanière reste à élucider chez les arbres, bien qu'elle semble dépendre de l'espèce et de l'organe considéré. Chez le pêcher (*Prunus persica*), l'azote remobilisé au printemps provient à 55% de la fraction non-protéique constituée probablement d'acides aminés (Gomez et Faurobert, 2002). Chez le chêne liège (*Quercus suber*), on assiste à une remobilisation préférentielle des protéines (Cerasoli, 2002). Chez le pommier âgé d'un an, la remobilisation printanière de l'azote stocké dans les racines est essentiellement sous forme d'acides aminés alors que la fraction protéique intervient peu (Tromp, 1983).

Les lipides

L'amplitude des variations saisonnières des réserves lipidiques est faible (Nelson et Dickson, 1981, Fisher et Höll, 1992, Hoch et al. 2003). Hoch et al. (2003) ont montré que les variations saisonnières de la concentration en lipides et notamment les acylglycérols étaient très faibles à négligeables dans les branches et le tronc de quatre espèces de « fat trees »: *Tilia*, *Larix*, *Picea* et *Pinus*. En revanche, dans des conditions de températures extrêmes *e.g.* dans les hautes altitudes et les zones de limite des arbres « treeline », la concentration en lipides augmente dans les tissus de plusieurs espèces de conifères en hiver. Cette accumulation de lipides est accompagnée d'une disparition de l'amidon (Sharkov et Tsvetkova 1950, Karnik et al. 1966, Lebedenko, 1966, Jeremias, 1968, Sudachkova, 1977,

Rubchevskaya et Levin, 1981, Rubchevskaya et Levin, 1982, Repyakh et al. 1983). Certaines données sur les variations saisonnières de la concentration des acylglycérols sont contradictoires (Sudachkova et al. 2004). Bien que la concentration des acylglycérols dans l'aubier de *Pinus sylvetsris* ne varie pas au cours de la saison (Saranpää et Nyberg, 1987, Fisher et Höll, 1992), elle augmente dans le bois du peuplier au printemps et à l'automne (Höll, 1985, Sauter et Van Cleve, 1994).

LE CHENE SESSILE ET LE HETRE

La forêt française couvre environ un quart du territoire national. Les espèces feuillues occupent 70% de la surface forestière et représentent environ 60% du volume du pied. Les chênes sessile et pédonculé et le hêtre représentent environ la moitié de la superficie (47%) et du volume (55%) occupé par les espèces feuillues en 2008 (Inventaire forestier national, 2008). Ce sont les trois espèces sociales de production de bois feuillu en France. En plus de leur importance sylvicole, ces espèces présentent des caractéristiques fonctionnelles contrastées.

Généralités

Le chêne sessile (*Quercus petraea*) et le hêtre européen (*Fagus sylvatica*) sont des essences forestières feuillues décidues appartenant à la famille des fagacées. Leur distribution géographique est européenne à tendance subatlantique. Le chêne sessile est une espèce post-pionnière avec une longévité pouvant atteindre entre 500 à 1000 ans, alors que le hêtre est une espèce sciaphile à longévité plus réduite, entre 150 et 300 ans. Le chêne sessile se trouve sur des humus variés (du mull carbonaté au mor), il a une croissance optimale sur des sols filtrants, épais et légèrement acides (limons ou sables). C'est une espèce mésoxérophile à mésophile tolérant les sols à pseudogley (Rameau et al. 1989). Le hêtre pousse sur des sols plus ou moins filtrants avec des humus allant du mull carbonaté au dysmoder, et présente son optimum de production sur des limons. C'est une espèce mésoxérophile à mésophile, supportant les sols peu profonds grâce à un enracinement superficiel (Rameau et al. 1989, Barbaroux, 2002). Les individus des 2 espèces peuvent atteindre 40 m de hauteur (Lanier, 1994). L'âge d'exploitation est entre 180 et 250 ans pour le chêne sessile et entre 80 et 150 pour le hêtre, ce qui correspond à un diamètre entre 60 et 80 cm pour le chêne sessile et entre 65 et 70 cm pour le hêtre. Le chêne produit 3 à 6 $m^3.ha^{-1}.an^{-1}$ et le hêtre entre 6 et 11 $m^3.ha^{-1}.an^{-1}$, selon la fertilité des sols et l'âge des peuplements. Les deux espèces sont gérées en futaie régulière ou irrégulière, pure ou en mélange.

Anatomie du bois et activité cambiale

Le chêne est une essence ayant un bois à zone initiale poreuse, les vaisseaux formés au printemps sont plus larges et hétérogènes que ceux qui sont produits en été. Le hêtre est une essence à bois à pores diffus, les vaisseaux du printemps et de l'été sont de petite taille et homogènes (Shweingruber, 1988). Cette anatomie contrastée résulte en une vulnérabilité

différente des deux espèces vis-à-vis de l'embolie hivernale. Les larges vaisseaux de xylème du chêne sont sensibles à l'embolie induite par le gel hivernal aboutissant à une rupture de la colonne d'eau (cavitation) et par la suite à une perte de la conductivité hydraulique pouvant atteindre 100% (Cochard et al. 1992, Bréda et al. 1993b). Afin de rétablir la conductance hydraulique au printemps, la croissance radiale est initiée (environ 43% de la croissance annuelle incluant la totalité du bois initial soit 19% du nouveau cerne) avant l'expansion complète des feuilles (Hinckley et Lassoie, 1981, Bréda et Granier, 1996, Barbaroux et Bréda, 2002). En revanche, les petits vaisseaux du xylème du hêtre sont moins vulnérables à l'embolie hivernale et la conductivité hydraulique est partiellement conservée d'une année à l'autre (Gasson, 1987, Anfodillo et al. 1993, Hacke et Sauter, 1996). Par conséquent, la réactivation cambiale commence en même temps que le débourrement au printemps chez le hêtre (Hinckley et Lassoie, 1981, Barbaroux et Bréda, 2002). Une autre différence entre essences à bois poreux et essences à bois diffus se situe dans la distribution radiale des tissus vivants dans le bois (Saranpää et Höll, 1989, Höll, 1997, Barbaroux et Bréda, 2002). Le chêne, espèce à bois poreux, montre une délimitation claire entre l'aubier (constitué par des cellules vivantes et des éléments conducteurs de sève) et le duramen (parenchyme mort). Le hêtre, espèce à bois diffus, ne forme pas de duramen, et la sève circule dans tout le xylème selon un profil radial fortement décroissant du cerne de l'année vers les cernes anciens (Granier et al. 2000, Barbaroux et Bréda, 2002).

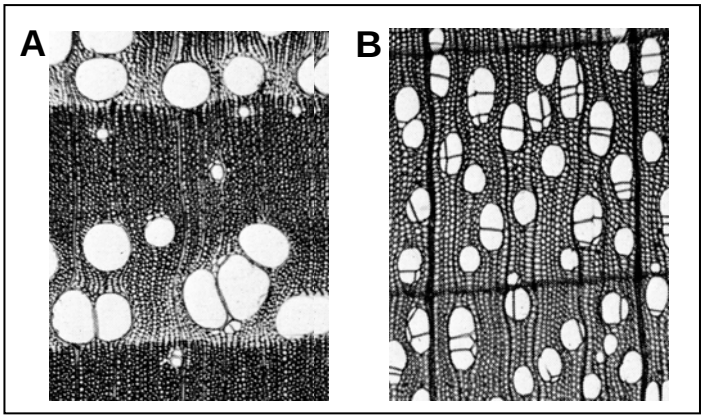


Figure 6. Caractéristiques anatomiques bu bois à zone poreuse du chêne sessile avec de gros vaisseaux de xylème (A), et du bois à pores diffus du hêtre avec des vaisseaux du xylème de petite taille (B).

L'activité cambiale présente un gradient basipète au stade jeune (entre 5 à 15 ans) chez le chêne et le hêtre (Lachaud et Bonnemain, 1981). A partir de 30 ans, la xylogénèse des chênes se produit par une réactivation cambiale d'ensemble, simultanément à différents

niveaux dans l'arbre, alors que chez le hêtre, la xylogénèse a lieu d'abord dans les branches avec un gradient basipète puis dans le tronc (Barbaroux, 2002).

Phénologie et croissance

La phénologie désigne les différentes étapes du développement morphologique d'une plante. Elle comprend le débourrement, la feuillaison, la floraison, la fructification, la saison de végétation, la sénescence puis la chute des feuilles. Le débourrement et la sénescence sont déclenchés par la température et/ou la photopériode principalement, et sont influencés par les conditions environnementales ainsi que par des facteurs ontogéniques (âge) ou génétiques (Kramer, 1995, Chuine et Cour, 1999). Plusieurs d'études ont suggéré que le chêne débourre avant le hêtre en Avril pour l'ensemble de la France (Kramer, 1995, Differt, 2001). Cependant, des situations régionales inverses sont rapportées (Comps et al. 1987) et des observations par télédétection confirment ces possibles inversions (Duchemin et al. 1999): selon les contextes climatiques, le poids relatif du contrôle par la température ou par la photopériode pourraient produire cette variabilité géographique. La période de sénescence se produit en même temps, fin octobre, pour les deux espèces (Lebourgeois et al. 2002). La croissance végétative du chêne et du hêtre est rythmique. Elle consiste en des périodes de croissance active suivies de périodes de repos apparent pendant lesquelles les feuilles terminent leur développement (Lavarenne et al. 1971). On observe deux à trois vagues (flushs) de croissance sur des chênes adultes en conditions naturelles (Bréda, 1994). Le hêtre présente une à deux vagues de croissance, elles sont espacées par une période de repos d'une à quatre semaines (Riedacker, 1981). Ces rythmes, très marqués sur les jeunes plants, s'atténuent au cours du vieillissement des arbres et peuvent être fortement perturbés par les sécheresses édaphiques ou les fructifications.



Figure 7. Les différents stades de débourrement des bourgeons au printemps chez le chêne sessile (1) et le hêtre (2): **B0** : Bourgeon hivernaux, **B1** : Bourgeons gonflés, **B2** : Les écailles se décollent, des feuilles apparaissent, **B3** : Ecailles très décollées, feuilles serrées les unes contre les autres, **B4** : Les feuilles émergent, **B5** : Toutes les feuilles sont sorties et étalées (Fin du débourrement), selon Bréda et Granier (1996).

Le chêne et le hêtre sont des « *mast seeding species* », pour lesquelles une fructification massive et synchrone entre les individus d'un même peuplement a lieu occasionnellement. Cependant, il existe peu de données sur la fructification des espèces forestières. La fréquence de fructification du chêne est plus faible que celle du hêtre. La période de fructification moyenne du chêne est estimée à cinq ans et demi en région Lorraine (France) (Aussenac, 1975), alors qu'on a détecté une périodicité de deux ans pour le hêtre en Suède (Överrgaard et al. 2007), en Allemagne (Eichhorn et al. 2008) et en France (Genet, 2009).

Caractéristiques écophysiologiques

Le chêne présente une capacité photosynthétique plus forte que le hêtre, qui résulte à fois d'une plus forte conductance stomatique et d'une plus forte photosynthèse maximale (Aranda et al. 2000, Backes et Leuschner, 2000). Le chêne présente une meilleure efficience d'utilisation de l'eau que le hêtre, la fermeture stomatique pendant une période de déficit hydrique a lieu plus tôt chez le hêtre (Barbaroux, 2002). Pendant des conditions hydriques favorables, les valeurs du potentiel hydrique sont comparables entre les deux espèces (Aranda et al. 2000). Quand le contenu en eau du sol est faible, le chêne réussit à restaurer son potentiel hydrique contrairement au hêtre, et ceci grâce à un système racinaire plus profond et plus étendu lui permettant d'extraire l'eau des horizons profonds du sol (Bréda et al. 1993a, Zapater et al. 2008). Pendant une sécheresse, le chêne sessile maintient une conductance stomatique (Backes and Leuschner, 2000) et une capacité photosynthétique (Epron et Dreyer,

1993, Epron et al. 1995) plus élevées que le hêtre, il est aussi moins sensible à l'embolie induite par la sécheresse (Bréda et al. 1993b). Cependant, le hêtre subit une diminution plus brutale de son potentiel de base (Leuschner et al. 2001), la nécromasse des fines racines augmente au détriment de la croissance aérienne et sa croissance radiale diminue. Contrairement, la croissance du tronc de chêne est moins affectée par la sécheresse estivale, les fines racines ne montrent pas d'augmentation de leur nécromasse ni de leur biomasse vivante (Leuschner et al. 2001). Par son enracinement profond, sa capacité photosynthétique, sa conductance hydraulique, la croissance radiale du tronc et le renouvellement des racines, le chêne est moins sensible à la sécheresse édaphique que le hêtre. Malgré sa vulnérabilité à la sécheresse, le hêtre est en compétition avec le chêne dans les peuplements mélangés (Leuschner, 1994). La supériorité compétitive du hêtre est basée sur l'architecture spécifique de sa canopée et l'orientation de ses feuilles lui permettant d'éviter l'ombrage (Leuschner, 2000). Des études récentes ont montré qu'en condition de sécheresse, le hêtre ajuste rapidement sa croissance radiale, ce qui permet d'allouer le carbone assimilé vers d'autres fonctions comme la mise en réserve. Cette stratégie permettrait au hêtre une récupération plus rapide après une sécheresse (Genet et al. 2010).

Les stratégies d'allocation du carbone entre les deux espèces, en particulier à l'âge adulte, ont été étudiées récemment par Genet et al. (2009 et 2010). Ces études ont montré que l'allocation du carbone à la croissance végétative, majoritaire pendant la phase juvénile du développement du hêtre, diminue progressivement au profit du stockage de composés de réserve et de la croissance reproductive au cours du vieillissement. En revanche, l'allocation entre croissance végétative, stockage et respiration demeure constante au cours du développement du chêne sessile (Genet et al. 2009 et 2010). Etant sensible à l'embolie hivernale, la survie du chêne sessile chaque printemps repose à la fois sur la réalisation d'une croissance minimum et sur la présence d'une quantité minimum de réserves carbonées nécessaires pour alimenter cette croissance. D'où un équilibre dans l'allocation du carbone entre croissance et mis en réserve en vieillissant. Chez le hêtre, la sensibilité de la croissance radiale aux contraintes environnementales augmente au cours du vieillissement, contrairement au chêne. Ainsi, l'augmentation de l'allocation du carbone aux réserves chez le hêtre vieillissant est une adaptation du fonctionnement carboné visant à garantir l'intégrité physiologique de l'arbre malgré l'augmentation des contraintes climatiques. De plus, l'intensité des fructifications augmentent chez le hêtre au cours du vieillissement, ce qui nécessite de nouveaux équilibres dans le fonctionnement carboné et notamment une augmentation de l'allocation pour la reproduction. En condition de dépérissement du hêtre,

l'allocation du carbone à la croissance chute drastiquement au profit de l'allocation aux réserves, permettant aux arbres dépérissants de maintenir des concentrations en composés de réserves glucidiques identiques à celle des arbres sains. Lors des crises de croissance, le système d'allocation du chêne semble moins flexible que celui du hêtre. Ceci se traduit par une forte vulnérabilité aux dépérissements pluriannuels, aboutissant souvent à des mortalités chez les individus les plus âgés (Bréda et Badeau, 2008)

Contexte scientifique et objectifs

Chez le chêne sessile et le hêtre adultes, la dynamique saisonnière des composés carbonés non-structuraux (NSC) a été étudiée en fonction du contenu en eau du sol et du développement phénologique par Barbaroux et Bréda (2002). Cette étude a montré des variations saisonnières plus marquées et des concentrations en NSC plus élevées chez le chêne sessile comparé au hêtre. Les auteurs ont expliqué les différences observées par l'anatomie du bois contrastée des deux espèces (bois poreux versus diffus) et les besoins en carbone plus importants pour la croissance radiale et le débourrement au printemps chez le chêne. Pour les deux espèces, les NSC atteignent leur concentration maximale en octobre juste avant la chute des feuilles, et la concentration minimale en juin à la fin de l'expansion foliaire, lorsque l'indice foliaire atteint son maximum. La distribution radiale des NSC dans l'aubier du chêne sessile a montré des concentrations plus élevées dans les cernes les plus jeunes et qui diminuaient radialement jusqu'à la limite aubier / duramen. Chez le hêtre qui ne présente pas de duramen, la répartition des NSC semblait être moins dépendante de l'âge des cernes, même si les derniers cernes étaient plus concentrés en amidon.

Un bilan quantitatif de la distribution des NSC à l'échelle de l'arbre a été ensuite réalisé par Barbaroux et al. (2003) sur des arbres des deux espèces abattus en Octobre 1999 (maximum de NSC) et en Juin 2000 (minimum de NSC). Ce bilan a montré que le chêne mobilisait deux fois plus de NSC pour la croissance au printemps que le hêtre (Figure 1). A l'échelle de l'arbre, le tronc est le compartiment de réserves glucidiques le plus important et ceci pour les deux espèces (44% de la quantité totale de NSC).

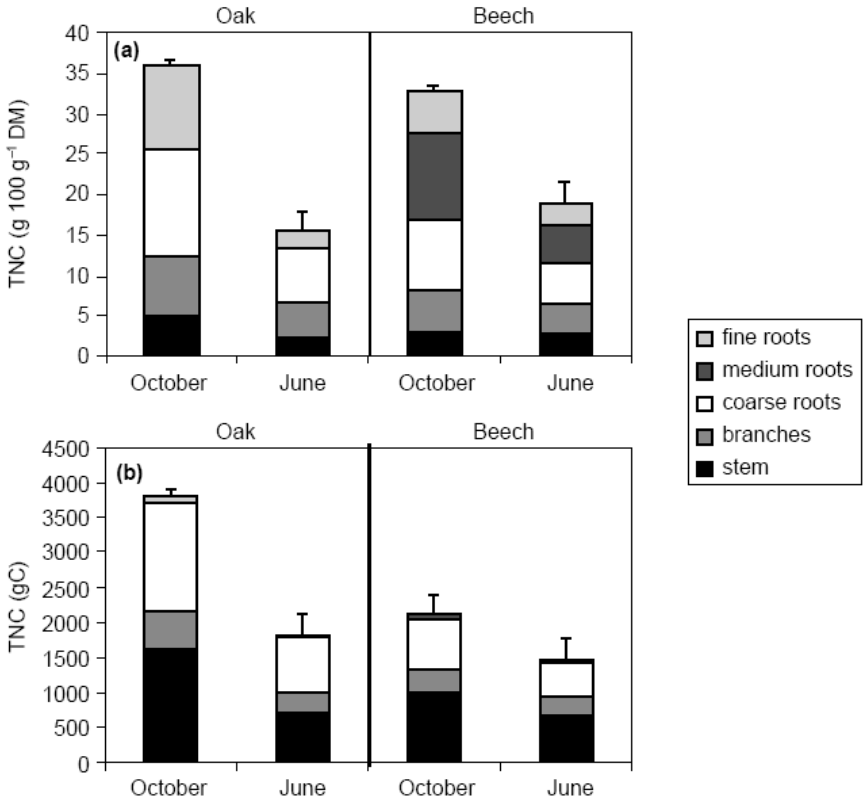


Figure 1. Distribution des TNC dans les organes pérennes du chêne sessile et du hêtre en Octobre 1999 et en Juin 2000. Les résultats sont exprimés en concentrations moyennes (a) et en quantités de carbone (b). Les barres verticales indiquent les erreurs standards (n=3). TNC, total non-structural carbohydrates. D'après Barbaroux et al. (2003).

Les auteurs ont par la suite estimé le coût de carbone des réserves utilisées pour la respiration d'entretien en hiver et pour la croissance au printemps. Le calcul des différents coûts était inférieur de 38% pour le hêtre et de 8% pour le chêne par rapport aux estimations des besoins en C de réserves (Tableau 1). Une des explications proposées par les auteurs suggère que d'autres composés de réserves (tels que des protéines de réserve, des acides aminés ou des lipides) contribuent à ce bilan.

Tableau 1. Estimation des coûts de carbone pendant l'hiver et le printemps (entre Octobre et Juin) pour des processus mesurés lors de l'expérience et à partir de données de la littérature. Q_{10} taux de respiration, R_{15} taux de respiration basale à 15°C, T température. D'après Barbaroux et al. (2003).

Table 6 Carbon costs estimation during winter and spring (between October and June) and literature source for the nonmeasured process in our experiment

Variable (gC)	Beech	Oak	Function	Reference	Species
Maintenance respiration	584	780	Q_{10}, R_{15}, T	Damesin *et al*. (2002) Edwards & Hanson (1996)	*Fagus sylvatica* *Quercus* sp.
Leaf biomass	1490	1740	Measured	This study	
Reserve needs for leaf biomass	655	765	44%	Dyckmans *et al*. (2000)	*F. sylvatica*
Leaf growth respiration	387	452	0.26 gC gC^{-1}	Merino *et al*. (1984)	Deciduous
Reserve needs for leaf growth respiration	171	200	44%	Our hypothesis	
Reserves needs for leaf construction	826	965	44%	Dyckmans *et al*. (2000)	*F. sylvatica*
Earlywood biomass	–	680	Measured	This study	
Earlywood growth respiration	–	197	0.29 gC gC^{-1}	Damesin *et al*. (2002)	*F. sylvatica*
Total carbon costs	2461	3849			
Carbon reserve needs	1410	2622			
Our measurements	880	2400			
Difference	38%	8%			

Q_{10}, respiration rate. R_{15}, basal respiration rate for 15°C. T, temperature.

Afin de vérifier cette hypothèse et de compléter le bilan des réserves des deux espèces, Valenzuela Nunez (2006) a étudié dans un premier temps la dynamique saisonnière et la distribution des protéines solubles totales sur les mêmes échantillons que Barbaroux et al. (2003). Il a trouvé une concentration en protéines solubles deux fois plus élevée chez le chêne sessile que chez le hêtre, avec un gradient croissant vers les parties terminales de l'arbre (pousses et fines racines et le tronc à la base du houppier) chez les deux espèces (Figure 2).

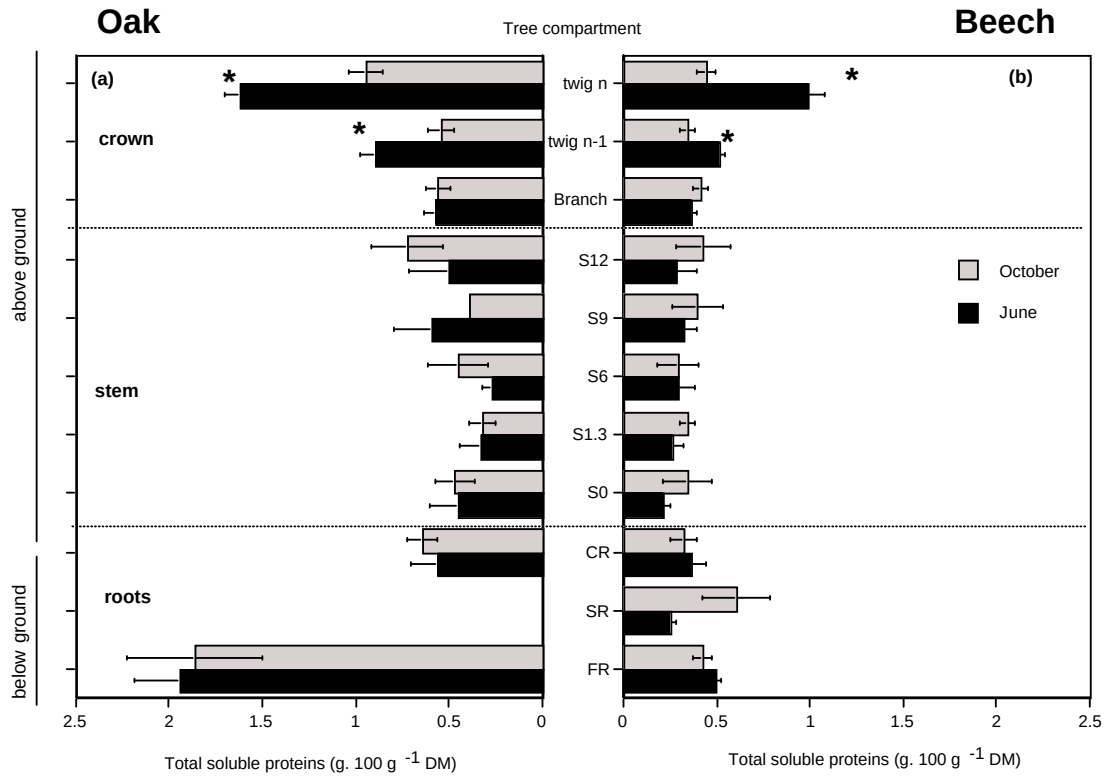


Figure 2. Distribution de la concentration en protéines solubles totales dans les différents organes de chêne sessile (a) et de hêtre (b) en Octobre 1999 (gris) et en Juin 2000 (noir). Les barres indiquent l'erreur standard (n=3). FR (fine roots), racines fines ; SR (small roots), petites racines (uniquement pour le hêtre); CR (coarse roots), grosses racines, S (stem), tronc de 0 m (S0) à 12 m (S12) de hauteur ; branches (branch) et les pousses (twigs) de l'année (n) et de l'année précédente (n-1). Les astérisques indiquent des différences significatives entre dates. D'après Valenzuela Nunez (2006).

Cependant, aucune différence significative dans la concentration des protéines solubles n'a été détectée entre Octobre et Juin (sauf pour les pousses). Les auteurs ont expliqué ces résultats par le fait que les composés azotés n'atteignent pas leurs concentrations maximales et minimales aux mêmes dates que les NSC au cours de la saison et que les variations saisonnières des protéines solubles concerneraient plus leur composition que leur concentration.

Valenzuela Nunez (2006) a ensuite étudié la composition des protéines solubles en Octobre et Juin à différentes hauteurs de l'aubier du tronc de chêne pédonculé âgé de 20 ans. Il a pu mettre en évidence un polypeptide de 26 kDa qui était présent en octobre en proportion importante par rapport aux autres protéines de la fraction soluble mais absent en juin, montrant ainsi des caractéristiques d'une protéine de réserve (VSP) comme définis par O'Kennedy et Titus (1979). Une protéine de réserve

chez le chêne est alors mise en évidence pour la première fois lors de cette étude. La seule étude qui existait sur les VSP de chêne et de hêtre était celle menée par Wetzel et Greenwood (1991) qui ont étudié la présence de VSP dans l'écorce de branches de chêne rouge (*Quercus rubra* L.) et de hêtre (*Fagus sylvatica*). Ces auteurs ont trouvé une modification dans l'ensemble des protéines solubles entre l'été et l'hiver, cependant aucune VSP ne semblait être présente chez les deux espèces.

Par ailleurs, les données sur la dynamique saisonnière des réserves azotées restent fragmentaires chez le chêne sessile et le hêtre adultes. A part quelques études sur des jeunes plants (Cerasoli et al. 2004a et 2004b, Visozo, 2004, Vizoso et al. 2008), aucune étude conjointe de la dynamique saisonnière des composés carbonés non-structuraux et des réserves azotées n'a été menée sur ces deux espèces au stade adulte jusqu'à présent.

Dans le travail de thèse ci présent, nous proposons d'étudier (Figure 3):

Publication 1) La dynamique saisonnière couplée des réserves azotées et des composés carbonés non-structuraux dans l'aubier du tronc de chêne sessile et de hêtre adultes.

Dans cette première expérience, la dynamique de la variation saisonnière des protéines solubles et des acides aminés libres dans le tronc de chêne sessile et de hêtre âgés de 50 ans sera comparée à celle des composés carbonés non-structuraux sur une base mensuelle entre Octobre 2007 et Octobre 2008. Le but de l'expérience est de définir, dans le tronc des arbres adultes, les dates clefs de stockage et de remobilisation des NSC (Non-Structural Carbohydrates) et NSNC (Non-Structural Nitrogen Compounds) au cours d'un cycle annuel complet. Cette expérience a aussi pour objectif d'étudier la présence de VSP dans l'aubier du tronc des deux espèces en étudiant la composition protéique. La distribution radiale des NSC et des réserves azotées sera comparée entre cernes récents et cernes anciens de l'aubier du tronc afin de vérifier si la distribution des réserves azotées suit celle des NSC étudiée précédemment par Barbaroux et Bréda (2002).

Publication 2) La contribution de l'azote remobilisé des réserves à la croissance foliaire au printemps chez le chêne sessile âgé de 50 ans : une approche isotopique au ^{15}N.

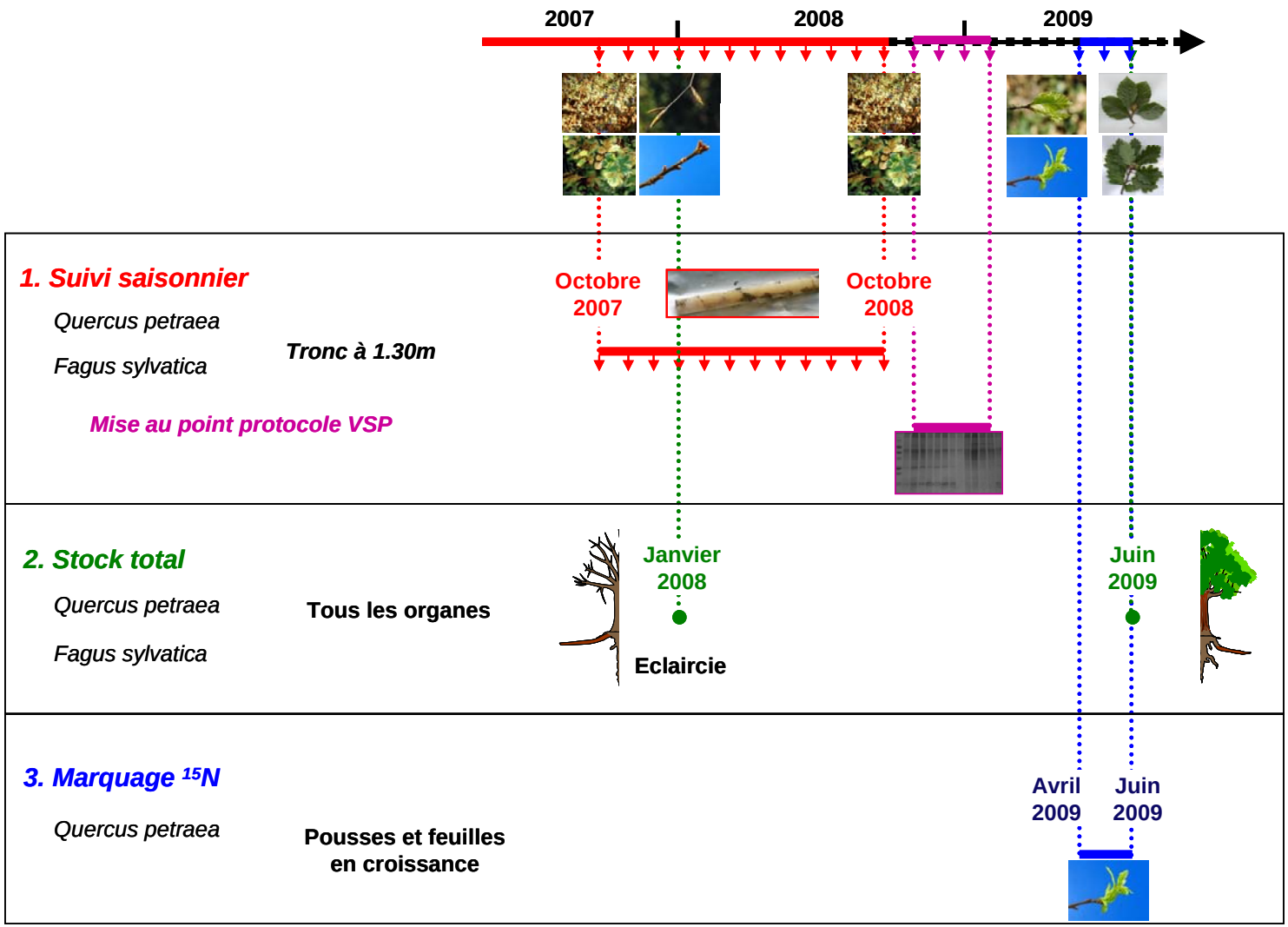
L'approche expérimentale a consisté en un marquage *in situ* avec de l'azote enrichi à 99.8% en ^{15}N au niveau du sol, effectué juste avant le début et pendant le débourrement entre Avril et Mai 2009. L'azote nouvellement assimilé a été quantifié dans les tissus en croissance grâce à sa composition isotopique en ^{15}N. L'objectif de l'expérience est de quantifier la contribution relative de l'azote remobilisé des réserves et de l'azote nouvellement assimilé à la croissance des feuilles et des pousses au printemps chez du chêne sessile âgé de 50 ans.

Publication 3) Le bilan quantitatif des composés azotés et carbonés non-structuraux à l'échelle de l'arbre chez le chêne sessile et le hêtre à deux dates phénologiques clés.

Des arbres des deux espèces ont été abattus en Janvier 2008 (dormance hivernale) et en Juin 2009 (après la fin de l'expansion foliaire). Un échantillonnage exhaustif des organes aériens (tronc, branches, pousses et feuilles quand présentes) et des grosses

racines a été réalisé. Cette expérience a consisté en une quantification des NSC et des NSNC à l'échelle de l'arbre par le biais des concentrations et de calculs de biomasse par application de tarifs allométriques. Cette approche a pour but de dresser un bilan complet des composés carbonés et azotés non-structuraux à l'échelle de l'arbre et de définir la distribution des composés dans les différents organes de l'arbre à deux dates phénologiques clefs : au cours de la dormance et à la fin de l'étalement foliaire.

Figure 3. Schéma synthétique du calendrier expérimental.



Ce travail a été réalisé sur deux parcelles forestières en Lorraine (Tableau 2):

- une jeune futaie de chêne en forêt domaniale de Champenoux (parcelle 52), située à 15 km de Nancy et composée majoritairement de chênes sessiles (*Quercus petraea*) âgés entre 50 et 55 ans en 2008.

- une jeune futaie située en forêt domaniale de Hesse en Moselle (parcelle 217), composé à 90% de hêtre (*Fagus sylvatica*) âgés de 45 ans en 2008, les autres espèces étant le bouleau (*Betula alba*) et le charme (*Caprinus betulus*). Cette parcelle accueille également un dispositif de suivi des flux d'eau et de carbone parmi les plus anciens du réseau CARBOEUROPE.

Les deux sites sont issus de la régénération naturelle et sont distants de 60 km.

Les variables climatiques standards, telles que la température de l'air, la pluviométrie, l'humidité relative, et le rayonnement global, sont mesurées par des stations météo installées par l'INRA à proximité des deux sites. De même, un suivi de l'évolution saisonnière du contenu relatif en eau du sol (REW), de l'indice foliaire (LAI), du débourrement, de la croissance radiale est réalisé sur les deux sites (Tableaux 3 et 4).

(Pour plus de détails sur les deux sites, se référer aux publications)

Forêt de Champenoux (54)
Chêne sessile, 50-55 ans



Forêt de Hesse (57)
Hêtre, 45-50 ans



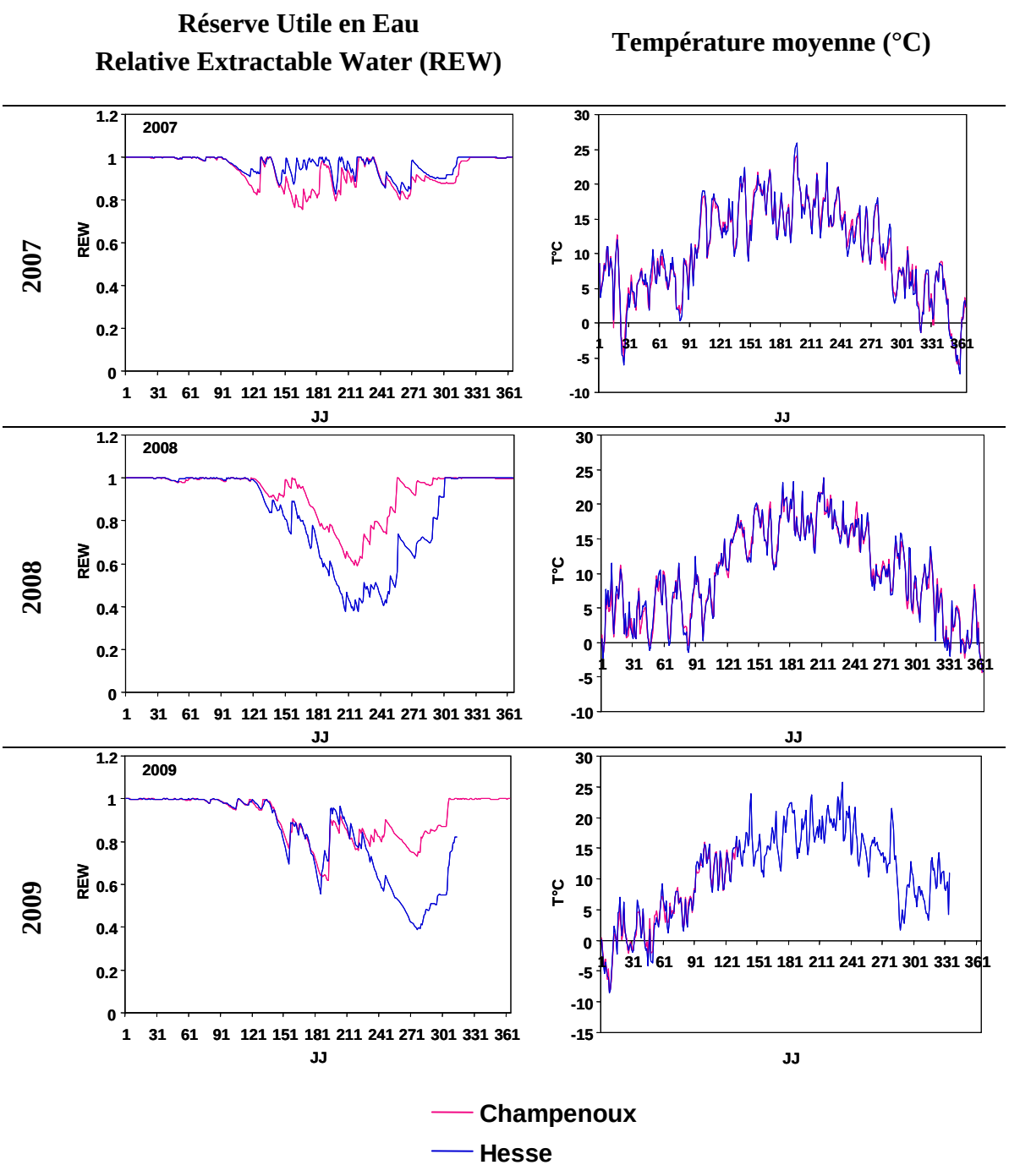
Tableau 2 : Caractéristiques géographiques, climatiques, des peuplements et du sol dans les deux sites expérimentaux de Champenoux et de Hesse.

Sites expérimentaux	**Champenoux (54)**	**Hesse (57)**
Parcelle	52	217
Longitude	6°14'E	7°03'53''E
Latitude	48°44'N	48°40'27''N
Altitude	273 m	300 m
Température moyenne	9.2°C	9.2°C
Précipitation annuelle	744 mm	820 mm
Peuplement		
Espèce	Chêne	Hêtre
Age	55 ans	45 ans
Hauteur arbres	20 m	19 m
Circonférence moyenne	425 mm	286 mm
Sol		
Type (pédologique)	Luvisol typique	Néoluvisol
Type (WRB)	Haplic luvisol	Luvic cambisol
Profondeur enracinement	2.2 m	1.4 m
Réserve utile	174 mm	165 mm
N	2.14 $g.kg^{-1}$	1.61 $g.kg^{-1}$
C/N	13.5	14.93

Tableau 3. Caractéristiques phénologiques des chênes (Champenoux) et des hêtres (Hesse) au cours des trois années d'étude (2007-2009). JJ: jours julien.

	Indice foliaire (m^2/m^2) Leaf area index (LAI)		Date de débourrement (JJ)		Date de chute des feuilles (JJ)	
	Chêne	*Hêtre*	*Chêne*	*Hêtre*	*Chêne*	*Hêtre*
2007	6.1	7.6	108	109	300	297
2008	3.7	8.6	126	120	300	286
2009	3.8	8.4	115	110	300	290

Tableau 4. Evolution saisonnière au cours des trois années d'études (2007-2009) de la réserve utile en eau (REW) et de la température de l'air sur les sites de Champenoux (traits roses) et de Hesse (traits bleus). Une réserve utile inférieure à 0.4 reflèterait un déficit hydrique au niveau du sol. JJ : jours julien.



Are seasonal fluctuations of carbon and nitrogen non-structural compounds coupled within the stem sapwood of 50-year-old sessile oak and beech trees?

EL ZEIN R., MAILLARD P., BREDA N., MARCHAND J. and GERANT D.

Submitted to *Tree Physiology*



Are seasonal fluctuations of carbon and nitrogen non-structural compounds coupled within the stem sapwood of 50-year-old sessile oak and beech trees?

EL ZEIN R. [1,2], MAILLARD P. [2], BREDA N. [2], MARCHAND J. [2] and GERANT D. [1].

[1] Université Henri Poincaré, UMR 1137 Faculté des Sciences et Techniques, BP 70239 - 54506 Vandoeuvre les Nancy Cedex, France.

[2] INRA, UMR 1137 F- 54280 Champenoux, France.

Corresponding author: Dominique Gérant (Dominique.Gerant@scbiol.uhp-nancy.fr)

Running title: C and N storage and remobilization in adult oak and beech

Key words: non-structural carbohydrates, non-structural nitrogen compounds, polypeptides, phenology, *Quercus petraea* (Matt.) Liebl., *Fagus sylvatica* L., radial distribution, storage.

Total word count: 7384
(Abstract: 324, Introduction: 566, Materials and Methods: 1393, Results: 878, Discussion: 1718, Acknowledgements: 70)

52 references
Tables: 2, **Figures**: 2.

SUMMARY

Evaluation of C and N internal cycling in forest trees demonstrates that more information is needed on the control of N reserves in mature trees. We investigated the seasonal variations of non-structural carbohydrates (NSC) and non-structural nitrogen compounds (NSNC) in the stem sapwood of 50-year-old sessile oak and beech trees, which was shown to be the most important storage compartment of carbohydrates at the tree level. In both species, NSC concentrations were 20 times higher compared to NSNC. Starch was the most abundant NSC in the stem sapwood and showed seasonal fluctuations, whereas the mechanism appeared to be more complex for NSNC. Soluble proteins and amino acids concentrations did not change along the year in stem sapwood of both species, but a change in overall protein composition was observed between winter and summer. Two polypeptides of 13 kDa (PP13) and 26 kDa (PP26) exhibited the major annual variations of storage proteins. After full leaf expansion, sapwood was not fully depleted in starch in oak and not depleted in beech, illustrating that C accumulation was higher than C consumption for oak growth, and that stem sapwood was not the most important source of C for new growth, in beech. By contrast, PP13 and PP26 were totally absent along the vegetative period and accumulated from leaf senescence until the coldest months which supports their role in N storage as vegetative storage proteins (VSP). The N content of these VSP represented 10% of the total N in sapwood of oak and beech. In both species, both NSC and proteins composition changed in response to cold hardiness, illustrated by a starch interconversion to soluble sugars and by a polypeptides rearrangement. We suggest that the accumulation of PP13 and PP26 would result from the breakdown of higher molecular weight polypeptides that were less abundant during this period and that PP13 and PP26 may have a protective function in cold hardiness as they accumulated mostly during cold periods.

INTRODUCTION

Tree life span depends on a well ordered periodic accumulation of carbon (C) and nitrogen (N) compounds occurring during favorable periods. These compounds are stored mostly during rest periods before being mobilized for sustaining growth and reproduction (Kramer and Kozlowski, 1979, Stepien et al. 1994, Sauter and Witt, 1997).

Studies on seasonal dynamics of reserves in adult broadleaved temperate forest trees in relation with their natural environment focused mainly on changes in non-structural carbohydrates (Piispanen and Saranpää, 2001, Barbaroux and Breda, 2002, Hoch et al. 2003). Beside C, N can be a growth-limiting factor in natural forest ecosystems (Rennenberg et al. 1998), then the ability of forest trees to store and redistribute internally nitrogen resources is a fundamental process conditioning their C and N economy (Millard and Grelet, 2010). The importance of non-structural nitrogen compounds (NSNC) such as amino acids and/or vegetative storage proteins (VSP) in controlling growth and metabolism have been demonstrated mainly in young trees (Stepien et al. 1994, Black et al. 2001, Cooke and Weih, 2005, Rennenberg et al. 2010) but studies of their seasonal dynamics in adult trees are scarce. In addition, characterization of both C and N internal cycles and their interaction during life span of forest trees remain largely to be explored even at young stages (Lacointe et al. 1993, Cerasoli et al. 2004a, 2004b, Vizoso et al. 2008).

When mature trees were studied, the analysis of N pools was commonly restricted to either bark or wood of young organs but rarely to stem sapwood whereas NSC storage in this compartment was well characterized in several temperate tree species (Hoch et al. 2003). Barbaroux et al. (2003) showed in adult oak and beech trees that the stem sapwood was quantitatively the main C-storage compartment and that stored non-structural carbohydrates (NSC) provide a large part of the carbon required for winter maintenance respiration and for spring growth in adult oak, which was less obvious in beech.

Sessile oak and beech are two of the most widespread temperate broadleaved species in the North-East of Europe. They differ in wood anatomy (Gasson, 1987) and exhibit contrasting growth patterns. In oak, a ring-porous species, tree achieves earlywood growth before leaf expansion in spring and C autotrophy (Dougherty et al. 1979, Hinckley and Lassoie, 1981, Bréda and Granier, 1996). By contrast, in beech, a diffuse-porous species, stem growth begins after leaf expansion. Barbaroux and Bréda (2002) showed contrasted seasonal dynamics of non-structural carbohydrates (NSC) in oak and beech stem sapwood in agreement with their contrasting growth patterns. These dynamics reflected differences in the

management of C sources (reserves, photoassimilates) by the two species. Wether the contrasted growth patterns of mature oak and beech trees might lead to differentiated N balances is questionable and how C and N seasonal dynamics of these two species in a temperate forest environment are interrelated is unknown.

The objective of the present study was to answer these questions by investigating concomitantly seasonal variations of non-structural C and N pools in mature oak and beech trees. We focused on the seasonal variations and on the radial distribution of the main non-structural carbohydrates (starch and soluble sugars) and non-structural nitrogen compounds (proteins and amino acids) concentrations in the stem sapwood of mature oak and beech trees. In particular, the existence of vegetative storage proteins in relation to seasonal temperature variations has been investigated in both species and discussed.

MATERIALS AND METHODS

Study site

The study was conducted in a pure stand of sessile oak [*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.] in the state forest of Champenoux, France (48°44′ N, 6°14′ E, elevation 237 m) and in an almost pure stand of common beech (*Fagus sylvatica* L.) in the state forest of Hesse, France (48°40′ N, 7°05′ E, elevation 300 m), both from natural regeneration and 60 km apart. In 2008, oak and beech trees were 50-55 and 45-50-year-old, respectively. All the standard climatic variables were measured in weather stations monitored by INRA installed close to the studied sites. Global radiation, rainfall, air temperature and humidity, and wind speed were measured every 10s by a data logger (Model CR7 data logger, Campbell Scientific, Courtaboeuf, France) and 30 min averages were calculated and stored. Mean annual temperature was 9.2 °C in both oak and beech stands, whereas mean annual precipitation was 744 and 820 mm, respectively.

The oak stand was growing on a cambisol soil, developed on a deep loam (for details see Bréda et al. 1995). The stand was recently thinned, density was 2553 stems ha^{-1}, basal area was 26.7 m^2 ha^{1}. The beech stand soil type was intermediate between a cambisol dystric and a luvic cambisol endostagnic (for details see Granier et al. 2000b). Site fertility was high, humus type was oligo-mull in both sites, N content in the upper organic layer (horizon A1) was 2.14 $g.kg^{-1}$ (C/N of 13.5) in oak site and 0.29 $g.kg^{-1}$ (C/N of 16.2) in beech stand. Stand density was 3800 stems ha^{-1}, basal area was 19.6 m^2 ha^{-1}. Maximal stand leaf area index (LAI) in 2008, estimated by litter collection during autumn, was 5.6 for oak stand and 8.7 for beech stand. Four dominant or co-dominant trees of each species were selected for the experiment. Mean stem diameter at breast height (DBH) was 17 and 22 cm for beech and oak, respectively.

Bud burst and stem increment monitoring

Bud burst was recorded every two to three days from the beginning of April to the end of May on the same trees. Bud development was described according to a six-stage scale (dormant winter buds, swollen buds, broken buds, just-unfolded leaves, unfolded leaves and developed leaves with shoot elongation). Bud burst was achieved when the tree reached the unfolded leaf stage (Bréda and Granier 1996), which corresponded to the onset of both leaf expansion and increases in LAI. Stem radial increment was measured on all trees every 5 days with dendrometer bands anchored at 1.3 m height.

Wood sampling

One core (5 mm diameter and 10 cm long) was sampled on each tree every month from October 2007 to October 2008. The first sample was taken in the North direction and the following monthly cores were shifted few centimeters to the left of the previous one and thus distributed in spiral along the stem circumference at 1.3 m height. Previous measurements in these two stands have shown no effect of stem orientation on carbohydrate concentration (Barbaroux and Bréda, 2002). Samples were conserved in liquid nitrogen in the field then stored at -80°C (-86°C Freezer® Forma Scientific®, Ohio, USA) until freeze-drying (Dura-Top®, Dura-Dry® FTS Systems®, NY, USA). Bark was removed from each sampled core. As the previous "ring by ring" study by Barbaroux and Bréda (2002) showed a sharp radial decrease in carbohydrate content toward the pith, sapwood was divided in two compartments according to ring age: the 2 most recent rings (designed as "RR" in the study) and the 8 to 10 older rings (designed as "OR"). All samples were weighed, finely ground (Mixer Mill MM200, Retsch, Germany), then stored at dark in airtight vials awaiting for biochemical analyses.

Non-structural carbohydrate (NSC) analyses

Soluble sugars were extracted from 15 (RR) to 20 mg (OR) of dry matter of each sapwood compartment with 1 ml of 70% (v/v) methanol/water for 10 min, then centrifuged at 17 000 g for 5 min at 4°C. This step was repeated twice and the resulting supernatants were pooled together. The pellet was retained for starch analysis and the supernatants, containing soluble sugars, were dried over night with a vacuum-evaporator (Maxi-Dry Plus; Hetomodel DW1, 0-110, Heto-HOLTEN A/S Allerod, Denmark) to eliminate methanol. Dried extracts were rehydrated in 1.5 ml of distilled water and redissolved by sonication then filtered at 0.2 µm (Acrodisc® Supor® filter; 0.2µm, VWR). Undiluted aliquots of 30µL were injected into a high-pressure liquid chromatography HPLC system (Gold®Beckman Coulter, Software 32 karat™) to determine soluble sugar concentration and composition. Soluble sugar separation was achieved on a HyperRez XP Carbohydrate Pb^{2+} separation column (8µm 300 x 7.7 mm, Thermo Electron, France) fitted with a precolumn (HyperRez Pb^{2+} 5 x 3 mm, Thermo Electron, France). The flow rate was maintained at 0.6 ml min^{-1}, the pressure between 1 and 1.5 Pa and the column temperature at 83°C. Individual carbohydrates were eluted from 0 to 30 min after injection. The sugar peaks were detected by light scattering (Sedex 45 ELSD system, Seder, Vitry sur Seine, France). Peak identification was determined according to

retention time of commercial carbohydrate standards. Sucrose, glucose, fructose and mannose were the main detected sugars. Sugar concentrations were determined by peak height and standard calibrations.

The pellet was analyzed for starch concentration by hydrolysis with 0.02N NaOH for 30 min at 100°C followed by digestion with amyloglucosidase (from *Aspergillus niger*, EC 232-877-2, Sigma Aldrich, France) for 30 min at 50°C in order to hydrolyze starch into glucose molecules. Glucose was quantified using hexokinase and glucose-6-phosphate-dehydrogenase followed by spectrometric determination of NADPH formation at 340 nm (Boehringer, 1984). Soluble sugars and starch concentrations were expressed on a dry matter basis (% DM). Their sum was named non-structural carbohydrates (NSC).

Non-structural nitrogen compound (NSNC) analyses

Total amino acid concentration was determined on an aliquot of 50 µL of the soluble fraction (see above) by colorimetry at 570 nm (spectrophotometer UV-visible DU 640 B, Beckman Coulter, USA) as described by Yemm and Cocking (1955) using ninhydrin with leucine as standard.

Soluble proteins were extracted from 15 (RR) to 40 mg (OR) of dry fine powder mixed with 500 µL of extraction buffer [62.5 mM Tris HCl pH 6.8, 2 % (v/v) SDS, 10 % Glycerol and 28 mM DTT] in a micro-tube, using a balk crusher (Retsch MM 301, Gmbh & Co, Germany) for two times during 45 seconds. Samples were centrifuged twice at 32 000 g for 20 min (17°C). Soluble proteins were precipitated with 4 volumes of 10% TCA in cold acetone and 28 mM DTT and stored at -20°C overnight. The following day, proteins were collected by centrifuging at 16 000g, 4°C for 10 min then washed 4 times with 1.5 ml of cold acetone and 28 mM DTT. After each washing, the mixture was stored 30 min at -20°C, then centrifuged at 16,000 g, 4°C during 15 min. The final pellet was air-dried at room temperature (30 min) then solubilized in 15µL of Laemmli buffer (62.5 M Tris HCl pH 6.8, 2 M SDS, 10 M Glycerol, 28 mM DTT and 5 mM bromophenol blue). Proteins concentrations from the solubilized pellet were determined by RC-DC Protein assay (Biorad RC DC Protein Assay 500-0121). The remaining pellet was boiled for 5 min and then cooled at room temperature.

SDS-PAGE was performed as described by Laemmli (1970) with a Mini-Protean II electrophoretic unit (Bio-Rad) using a 4% stacking gel and a 12.5 % running SDS-polyacrylamide gels (PAGE). Proteins from 10 and 25 mg of DM were loaded in each lane for RR and OR respectively. Gels were stained with 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 and distained with 25% (v/v) ethanol and 7% (v/v) acetic acid. Gels were digitalized with

a Bio-Rad model GS 690 Imaging densitometer scanner. The integrated intensity of protein bands was measured manually using Bio-Rad Multi-Analyst software and then plotted relatively to the total intensity of the proteins in the lane.

Amino acid and soluble protein concentrations were expressed on a dry matter (DM) basis (% DM). Their sum was named non-structural nitrogen compounds (NSNC).

Statistics

Data were analyzed by the General Linear Model procedure (Statistica 6.1). Concentrations of each compound were studied with different sources of variation: compartment, date, and species. Within compartments (RR and OR), differences in NSC and NSNC concentrations among the sampling dates were analyzed for significance by Tuckey Kramer honestly significant differences (HSD) at $P < 0.05$.

RESULTS

Minimum air temperature measurements

Between November 2007 and February 2008, monthly minimum air temperatures (Figures 1A and 2A) dropped below 0°C in both sites then increased slightly (to about 5°C) in March 2008. During the growth period, minimum air temperatures were between 3.5°C (April) and 11°C (August) and mean air temperature (not shown) was about 13.6°C in both stands. In September, minimum air temperature decreased to 5°C then increased to 9°C in October 2008.

Bud burst, leafy period and stem growth during 2008

Sessile oak and beech differed in their growth pattern. For sessile oak (Figure 1), bud burst and stem girth increment started on April 18. For beech (Figure 2), bud burst started on April 25 and stem growth started a month later (on May 20) compared to oak. Bud burst was achieved by May 7 in both species, whereas stem growth persisted until the end of August. The leafy period lasted until the end of October 2008.

Seasonal variations in NSC and NSNC in sessile oak

Starch concentrations were maximal at leaf fall in October 2007 then tended to decrease until January in RR and OR (Figure 1C, Table 2). Among soluble sugars, sucrose concentrations did not change significantly during this period whereas hexoses concentrations increased significantly (Figure 1). The increase in hexoses concentrations resulted from glucose and fructose accumulation (Table 2), whereas mannose did not display any seasonal variation. Among NSNC, amino acids concentrations displayed significant seasonal variations only in OR (Table 2), whereas soluble proteins concentrations did not change significantly among the sampling dates in both RR and OR (Table 2). The composition of soluble proteins showed annual variations, as illustrated in Figure 1B. Nearly 20 polypeptides were separated in each lane, and their apparent MW ranged from 13 to 140 kDa. A change in the overall protein patterns between winter and summer was observed. Two polypeptides of 13 kDa (PP13) and 26 kDa (PP26) accumulated during winter whereas high molecular weight polypeptides were less abundant (Figure 1B). The accumulation of PP26 was maximal in December, it accounted for 43% of total soluble proteins in RR and for 34% in OR. The accumulation of PP13 in RR was maximal in January and it was slightly detected in OR (not shown).

Just before bud burst, NSC concentrations increased to reach similar values than those measured in October 2007 whereas PP13 and PP26 were less abundant. With the onset of spring growth in April, levels of PP13 and PP26 and starch concentrations decreased sharply. PP13 and PP26 were absent during the stem growth period (Figure 1B) and starch reached its lowest concentration in June after full leaf expansion (Table 2). Glucose and fructose concentrations did not change during this period and until October 2008. Starch concentrations increased progressively from July to reach maximum concentrations in October 2008, and PP13 and PP26 started to accumulate again.

Seasonal variations in NSC and NSNC in beech

Starch concentrations were near zero in January (Table 2) and were significantly lower than in October 2007. Among soluble sugars, sucrose concentrations did not change significantly during the same period whereas glucose and fructose concentrations were higher in January compared with those in October, mannose was not detected (Table 2). Amino acids and soluble proteins concentrations did not display significant seasonal variations. Soluble protein composition showed annual variations (Figure 2B) and nearly 20 polypeptides ranging from 13 to 140 kDa were also separated in each lane. In RR, a major polypeptide of 26 kDa (PP26) accumulated during the winter period. A polypeptide of 13k Da (PP13) was also detected in RR but band intensity was lower compared to PP26 and mostly observed in February. The accumulation of PP26 was maximal in February and accounted for 38% of total soluble proteins in RR and for 25% in OR. In February, PP13 accounted for 13% of the total soluble proteins in RR and was not detected in OR.

During spring growth, sucrose decreased significantly in RR between April and June. Hexoses (glucose and fructose) reached minimal concentrations in April and were not detected between June and October 2008. PP13 and PP26 levels decreased sharply (between April and May) to disappear afterward, while starch concentrations increased progressively in RR. In OR, starch concentrations did not change significantly during the growth period and until leaf senescence in October 2008. When stem growth was achieved (end of August), starch concentrations continued to increase and reached the highest concentration in October 2008, whereas PP13 and PP26 started to accumulate in both RR and OR.

Interspecific comparison of radial distribution and seasonal changes of NSC and NSNC in stem sapwood

Concentrations of both NSC and NSNC were significantly higher in sessile oak compared to beech on all sampling dates (Table 1). In sessile oak, NSC and NSNC concentrations were significantly different between RR and OR (Table 1). In beech, NSNC and soluble proteins concentrations were significantly different between RR and OR but no significant difference was observed for those of NSC and amino acids (Table 1). Soluble proteins composition did not change to the same extent in beech stem sapwood compared to sessile oak, however polypeptides with similar molecular weight (PP13 and PP26) were identified in both species and displayed seasonal variations of storage proteins (Figure 1B and 2B).

DISCUSSION

The radial distribution of NSC within the stem sapwood of sessile oak and beech was comparable to that observed by Barbaroux and Bréda (2002). NSC accumulated mainly in RR for sessile oak and in more than the 10 rings that we investigated in beech. This study shows that free amino acids were distributed similarly to carbohydrates in both species according to the radial profiles of living parenchyma (sapwood versus heartwood). The accumulation of soluble proteins was higher in RR compared to OR in both species presumably because it contained most of the living parenchyma cells (Kramer and Kozlowski, 1979). In poplar trees, proteins from wood arose from the external zone of the xylem which contains the living cells (Clausen and Apel, 1991). Such distribution reduces also the distance for N transport to sink tissues (Staswick, 1994).

During the dormant period (October 2007- March 2008), deciduous trees are leafless and stem depends exclusively on stored reserves. In temperate climates, this period is characterized by a decrease in day length and air temperatures. As a consequence, trees undergo endodormancy, which prevents growth from occurring during transitory periods of warm temperatures and sustains as well a synchronized spring growth (Rowland and Arora, 1997). During this period, C is stored as starch and soluble sugars such as sucrose and hexoses (Hoch et al. 2003) and N is stored as amino acids and proteins (Dickson, 1989). In our study, free amino acid concentrations were nearly two times higher than soluble proteins concentrations in the sapwood of oak and beech (Table 2). However, taking into account mean N content of proteins (0,23 gN. g^{-1} proteins, Yeoh and Wee, 1994) and of amino acids (0,13 gN. g^{-1} amino acids), N storage in both compounds was thus comparable.

In temperate climates, air temperature often decreases below zero during the endodormancy phase, which can induce irreversible damages at the cellular level (Repo et al. 2008). Consequently, temperate trees have to develop cold hardiness mechanisms to avoid intracellular freezing. Among NSC, we observed starch conversion to soluble sugars, which is a common response to cold hardiness in trees (Kramer and Kozlowski 1979, Piispanen and Saranpää, 2001, Poirier et al. 2010) and more particularly in oak species (Thomas et al. 2004, Morin et al. 2007, Repo et al. 2008). Overall NSC concentrations did not change significantly during the freezing period. However, in February a slight decrease in NSC concentration was observed in oak sapwood, reflecting presumably C used for maintenance respiration (Ögren, 2000) (Figure 1C). Starch to sugar conversion occurred concomitantly with changes in

soluble protein composition. During the same period, two polypeptides of 13 kDa (PP13) and 26 kDa (PP26) accumulated in the stem sapwood of both species. Since the stem was considered to be self-sufficient during this period, the polypeptides could mainly originate from existing N pools (soluble proteins, amino acids). Given that amino acid and soluble protein concentrations did not change during the cold period (Table 2), we hypothesized that the accumulation of PP13 and PP26 resulted from the breakdown of higher molecular weight polypeptides which were less abundant at this time (Figures 1B and 2B). PP13 and PP26 showed seasonal variations of Vegetative Storage Proteins (VSP) according to the definition of O'Kennedy and Titus (1979) and Staswick (1994). VSP are considered as the major storage form of reduced N in vegetative tissues in many perennial plants: forage legumes (Avice et al. 2003), poplar (Stepien et al. 1994, Rennenberg et al. 2010), fruit trees (Gomez and Faurobert, 2002) and tropical trees (Tian et al. 2003). Short days and low air temperature were shown to induce the accumulation of bark storage protein (BSP) in poplar (Coleman et al. 1991, Van Cleve and Apel, 1993, Cooke and Weih, 2005). Quantitatively, if we consider soluble protein concentration in the RR of oak sapwood in January (0.11% DM, Table 2) and that PP13 and PP26 accounted for 43% and 34% of total soluble proteins, respectively, the total concentration of these VSP would correspond to about 0.08% DM of RR. Taking into account mean N content of proteins (0,23 gN. g^{-1} proteins, Yeoh and Wee, 1994) and total N content of the stem sapwood (0.20% DM, data not shown), PP13 and PP26 accounted for 10% of the total N. In a comparable calculation, taking into account starch concentration (5% DM in October, Table 2), C content of starch (0.4gC. g^{-1}) and total C content of the sapwood (44% DM, data not shown), the C content of starch represents 5% of the total C of the sapwood. In both species, PP13 and PP26 may also have a protective function in cold hardiness as they accumulated mostly during the period of lowest temperature. Indeed, VSP accumulation in perennial species was shown to be related to endodormancy and cold hardiness (Rowland and Arora, 1997, Pagter et al. 2008). For example, Wisniewski et al. (2004) characterized a 60 kDa VSP in peach bark as a dehydrin, which had a role in cold acclimation and interacted with compatible solutes such as soluble sugars (Hoekstra et al. 2001).

At the beginning of growth period (April 2008), bud burst and leaf expansion were initiated and sap flow can be restored between tree compartments. At the end of bud burst, PP13 and PP26 disappeared completely in the stem sapwood of sessile oak and beech, which supports their role in N storage (Millard and Grelet, 2010). Coleman et al. (1993) indicated

that factors such as increasing day length and temperature affect VSP breakdown in poplar by altering bud dormancy status. The breakdown of PP13 and PP26 could lead to the release of amino acids which could be either used to sustain internally wood growth or exported to other N sinks. Polypeptides of high molecular weight were expressed in June in the protein electrophoretic profile of RR, mainly in oak (Figure 1B) and could be related to wood growth processes. In poplar stem, numerous xylem-linked proteins appeared during summer and most of them were identified as enzymes involved in xylogenesis at the expense of the 32 kDa and 36 kDa BSPs (Vander Mijnsbrugge et al. 2000).

Concerning the export of remobilized N towards growing sinks, some species showed an almost complete dependence on N remobilization for spring growth (Millard and Grelet, 2010). In two-year-old *Quercus robur* saplings, Vizoso et al. (2008) showed that stored N accounted for 80% of total N content of new leaves. As our study focused on stem sapwood, the contribution of N remobilization to the seasonal growth was not quantified, budget estimation from all the perennial organs or ^{15}N labelling would be useful tools for such analyses in mature trees. The breakdown of PP13 and PP26 was comparable in both species, however NSC remobilization differed since starch remobilization occurred in oak stem sapwood (Figure 1C) but not in beech (Figure 2C). High starch remobilization from the stem sapwood of oak results from its hydraulic properties. As a ring porous species, the large xylem vessels of oak are embolized by winter frost and early wood growth is initiated before bud burst in order to restore the hydraulic conductivity (Cochard and Tyree, 1990, Bréda and Granier, 1996). In June, the decrease in NSC concentrations (Figure 1C) reflected either C use in early wood growth (structural C) or C export toward the growing organs (shoots and leaves). By contrast, spring growth of beech seemed to be less dependant on carbon stored within the stem sapwood (Figure 2C) as previously shown by Barbaroux and Bréda (2002). In fact, the small vessels of beech are less vulnerable to winter embolism (Gasson, 1987, Hacke and Sauter, 1996) and hydraulic conductivity is partially conserved from year to year, as a consequence stem radial growth starts after leaf expansion (Kozlowski, 1992, Barbaroux and Bréda, 2002). Moreover, Hoch at al. (2003) suggested that branches participate more efficiently to new leaf growth than the stem in beech trees. In June, starch pools were not completely depleted in the stem sapwood of oak, as previously shown for different temperate tree species (Hoch et al. 2003). NSC accumulation is higher than C needs for growth in different temperate species and leads to C sequestration rather than storage (Millard and Grelet, 2010).

During the vegetative period (July- October 2008), starch refilling started between July and August in both species whereas stem growth was still not achieved, which illustrates that C refilling is concomitant to stem growth (Lacointe et al. 1993). C balance between growth and storage was shown to remain constant with aging in sessile oak (Genet et al. 2010). Starch accumulated until the end of the vegetative season in October, when NSC reached their maximal concentrations in both species, whereas PP13 and PP26 started to accumulate only with leaf senescence. As N is essential for photosynthesis processes within leaves, the replenishment of N reserves in perennial organs of deciduous tree species starts with leaf yellowing in early fall (Dickson 1989, Sauter and Witt, 1997). In fact, 40 to 80% of foliar nitrogen is recycled from senescent leaves in autumn (Chapin and Kedrowski, 1983, Millard and Proe, 1991, Vizoso et al. 2008), resulting mainly from Rubisco degradation (90%) that constitutes the main source of N reserves (Kang and Titus, 1980).

In conclusion, the stem sapwood of both species presented seasonal variations in NSC and NSNC concentrations which attest that this compartment participated to the recycling of C and N in these perennial species. However, even if the stem sapwood is quantitatively one of the main storage compartments, this analysis does not completely reflect changes of C and N balances at the whole tree level. This study has defined precisely the key dates for C and N storage and the time lag between the two dynamics, in mature oak and beech trees. Additional experiments of C and N storage on all the perennial compartments at the key dates we characterized would be helpful to characterize C and N balances at the whole tree level.

Similarities and differences in seasonal fluctuations of NSC and NSNC were observed between the two species. In oak, NSC of stem sapwood seemed to be more solicited than in beech for spring growth. By contrast in both species, polypeptides with similar molecular weights (PP13 and PP26) showed kinetics of vegetative storage proteins. ^{15}N labeling experiments are now further needed to investigate the fate of this stored N, although such experiments remain difficult to conduct on mature trees.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to François Gérémia for his contribution in field measurements and tree sampling and to Patrick Riveron for his help in sample grinding and preparation. Rana El Zein received a PhD grant from French Ministry for Higher Education and Research. Research funding was supported by the General Directorate of Forest and Rural Affairs (DGFAR) and the French National Research Agency (ANR) in the frame of DRYADE project (ANR-06-VULN-004).

REFERENCES

Avice, J.C., F. Le Dily, E. Goulas, C. Noquet, F. Meuriot, J.J. Volenec, S.M. Cunningham, T.G. Sors, C. Dhont, Y. Castonguay, P. Nadeau, G. Bélanger, F.P. Chalifour, and A. Ourry. 2003. Vegetative storage proteins in overwintering storage organs of forage legumes: roles and regulation. Can. J. Bot. 81: 1198-1212.

Barbaroux, C. and N. Bréda. 2002. Contrasting distribution and seasonal dynamics of carbohydrate reserves in stem wood of adult ring-porous sessile oak and diffuse-porous beech trees. Tree Physiol. 22: 1201-1210.

Barbaroux, C., N. Bréda and E. Dufrêne. 2003. Distribution of above-ground and below-ground carbohydrate reserves in adult trees of two contrasting broad-leaved species (*Quercus petraea* and *Fagus sylvatica*). New Phytol. 157: 605-615.

Black, B.L., C.M. Parmentier-Line, L.H. Fuchigami, G.D. Coleman. 2001. Ecotypic and genetic variations in poplar bark storage protein gene expression and accumulation. Tree Physiol. 21: 1289-1297.

Boehringer, S.A. 1984. Methods of enzymatic food analysis using single reagents. Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany, 79 p.

Bréda, N., A. Granier, F. Barataud and C. Moyne. 1995. Soil water dynamics in an oak stand. I. Soil moisture, water potential and water uptake by roots. Plant and Soil. 172: 17-27.

Bréda, N. and A. Granier. 1996. Intra and interannual variations of transpiration, leaf area index and radial growth of a sessile oak stand (*Quercus petraea*). Ann. Sci. For. 53: 521-536.

Cerasoli, S., P. Maillard, A. Scartazza, E. Brugnoli , M.M. Chaves and J.S. Pereira. 2004a. Carbon and nitrogen winter storage and remobilisation during seasonal flush growth in two-year-old cork oak (*Quercus suber* L.) saplings. Ann. For. Sci. 61: 721-729.

Cerasoli, S, A. Scartazza, E. Brugnoli, M.M. Chaves and J.S. Pereira. 2004b. Effects of partial defoliation on carbon and nitrogen partitioning and photosynthetic carbon uptake by two-year-old cork oak (*Quercus suber*) saplings. Tree Physiol. 24: 83-90.

Chapin, F.S. and R.A Kedrowski. 1983. Seasonal changes in nitrogen and phosphorus fraction and autumn retranslocation in evergreen and deciduous taiga trees. Ecology. 64: 367-391.

Clausen, S. and K. Apel. 1991. Seasonal changes in the concentration of the major storage proteins and its mRNA in the xylem ray cells of poplar trees. Plant Mol. Biol. 17: 669-678.

Cochard, H. and M.T. Tyree. 1990. Xylem dysfunction in *Quercus*: vessel sizes, tyloses, cavitation and seasonal changes in embolism. Tree Physiol. 6: 393-407.

Coleman, G.D., T.H.H. Chen, S.G. Ernst and L. Fuchigami. 1991. Photoperiod control of poplar bark storage protein accumulation. Plant. Physiol. 96: 686-692.

Coleman, G.D., Englert, J.M., Chen,T.H.H. and Fuchigami, L.H. 1993. Physiological and environmental requirements for poplar (*Populus deltoides*) bark storage protein degradation. Plant Physiol. 102: 53-59.

Cooke, J.E.K. and M. Weih. 2005. Nitrogen storage and seasonal nitrogen cycling in *Populus*: bridging molecular physiology and ecophysiology. New Phytol. 167:19-30.

Dickson, R. E. 1989. Carbon and nitrogen allocation in trees. Ann. Sci. For. 46: 631- 647.

Dougherty, P.M., R.O. Teskey, J.E. Phelps and T.M. Hinckley. 1979. Net photosynthesis and early growth trends of a dominant white oak (*Quercus alba* L.). Plant Physiol. 64: 930-935.

Gasson, P. 1987. Some implications of anatomical variations in the wood of pedunculate oak (*Quercuc robur* L.), including comparison with common beech (*Fagus sylvatica* L.) IAWA Bull. 8: 149- 166.

Genet, H., N. Bréda and E. Dufrene. 2010. Age-related variation in carbon allocation at tree level and stand scales in beech (*Fagus sylvatica*) and sessile oak (*Quercus petreae* (Matt.) Liebl.) using a chronosequence approach. Tree Physiol. 30: 177-192.

Gomez, L. and M. Faurobert. 2002. Contribution of vegetative storage proteins to seasonal nitrogen variations in the young shoots of peach trees (*Prunus persica* L. Batsch). J. Exp. Bot. 53: 2431-2439.

Granier, A., P. Biron and D. Lemoine. 2000*a*. Water balance, transpiration and canopy conductance in two beech stands. Agric. For. Meteorol. 100:291-308.

Granier, A., E. Ceschia, C. Damesin et al. 2000*b*. The carbon balance of a young Beech forest. Funct. Ecol. 14: 312-325.

Hacke, U. and J.J. Sauter. 1996. Xylem dysfunction during winter and recovery of hydraulic conductivity in diffuse-porous and ring-porous trees. Oecologia. 105: 425-439.

Hinckley, T.M. and J.P. Lassoie. 1981. Radial growth in conifers and deciduous trees: a comparaison. Mitt. Forstl. Bundesversanst. Wien. 142: 17-56.

Hoch, G., A. Richter and C. Korner. 2003. Non-structural carbon compounds in temperate forest trees. Plant, Cell and Environ. 26: 1067-1081.

Hoekstra F.A., Golovina E.A., Buitnik J. 2001. Mechanism of plant desiccation tolerance. Trends Plant Sci. 6: 431-438.

Kang S.M. and J.S. Titus. 1980. Qualitative and quantitative changes in nitrogenous compounds in senescing leaf and bark tissues of apple. Physiol. Plant. 50: 285-290.

Kozlowski , T.T. 1992. Carbohydrate sources and sinks in woody plants. Bot. Rev. 58: 107-222.

Kramer, P. J. and T.T. Koslowski. 1979. Physiology of woody plants. Academic Press, London. 811 p.

Lacointe, A., A. Kajji, F.A. Daudet, P. Archer and J.S. Frossard. 1993. Mobilization of carbon reserves in young walnut trees. *In* Cambium, Production de Bois et Développement de l'Arbre. Eds. A.M. Catesson and S. Lachaud. Acta Bot. Gall. 140: 435-441.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.

Millard, P. and M.F.Proe. 1991. Leaf demography and the seasonal internal cycling of nitrogen in sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) seedlings in relation to nitrogen supply. New Phytol. 117: 587-596.

Millard, P. and G.A. Grelet. 2010. Nitrogen storage and remobilization by trees: ecophysiological relevance in a changing world. Tree Physiol. 30: 1083-1095.

Morin, X., T. Ameglio, R. Ahas, C. Kurz-Besson, V. Lanta, F. Le-bourgeois, F. Miglietta and I. Chuine. 2007. Variation in cold hardiness and carbohydrate concentration from dormancy induction to bud burst among provenances of three European oak species. Tree Physiol. 27: 817-825.

O'Kennedy, B.T. and J.S. Titus. 1979. Isolation and mobilization of storage proteins from apple shoot bark. Physiol. Plant. 45: 419-424.

Ögren, E. 2000. Maintenance respiration correlates with sugar but not nitrogen concentration in dormant plants. Physiol. Plant. 108: 295-299.

Pagter, M., C.R. Jensen, K.K. Petersen, F. Lui and R. Arora. 2008. Changes in carbohydrates, ABA and bark proteins during seasonal acclimation and deacclimation in *Hydrangea* species differing in cold hardiness. Physiol. Plant. 134: 473-485.

Piispanen, R. and P. Saranpää. 2001. Variation of non-structural carbohydrates in silver birch (*Betula pendula* Roth) wood. Trees. 15: 444-451

Poirier M., A. Lacointe and T. Améglio. 2010. A semi-physiological model of cold hardening and dehardening in walnut stem. Tree Physiol. 30: 1555-1569.

Rennenberg, H., K. Kreutzer, H. Papen, and P. Weber. 1998. Consequences of high loads of nitrogen for spruce (*Picea abies*) and beech (*Fagus sylvatica*) forests. New Phytol. 139: 71-86.

Rennenberg, H., H. Wildhagen and B. Ehlting. 2010. Nitrogen nutrition of poplar trees. Plant Biol. 12: 275-291.

Repo, T., K. Mononen, L. Alvila, T.T. Pakkanen and H. Hänninen. 2008. Cold acclimation of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) at its northernmost distribution range. Env. Exp. Bot. 63: 59-70.

Rowland, L.J. and R. Arora. 1997. Proteins related to endodormancy (rest) in woody perennials. Plant Sci. 126: 119-114.

Sauter, J.J. and W. Witt. 1997. Structure and function of rays: storage, mobilization, trasport. *In*: Trees, contribution to modern tree physiology. Eds H. Rennenberg, W. Eschrich W and H. Zeigler. Bankhuys, Leiden, The Netherlands, pp 177- 195

Staswick, P. E. 1994. Storage proteins of vegetative plant tissue. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 45: 303-322.

Stepien V., J.J. Sauter and F. Martin. 1994. Vegetative storage proteins in woody plants. Plant Physiol. Biochem. 32:185-192.

Thomas, F.M., G. Meyer and M. Popp. 2004. Effects of defoliation on the frost hardiness and the concentrations of soluble sugars and cyclitols in the bark tissue of pedunculate oak (*Quercus robur* L.). Ann. Sci. For. 61: 455-463.

Tian W. M., J. L.Wu, B. Z. Hao and Z. H. Hu. 2003. Vegetative storage proteins in the tropical tree *Swietenia macrophylla*: seasonal fluctuation in relation to a fundamental role in the regulation of tree growth. Can. Bot. J. 81: 492-500.

Van Cleve, B. and K. Apel. 1993. Induction by nitrogen and low temperature of storage protein synthesis in poplar trees exposed to long days. Planta. 189: 157-160.

Vander Mijnsbrugge, K., H. Meyermans, M.Van Montagu, G. Bauw, and W. Boerjan. 2000. Wood formation in poplar: identification, characterization and seasonal variation of xylem proteins. Planta. 210: 589-598.

Vizoso, S., D. Gérant, J.M. Guehl, R. Joffre, M. Chalot, P. Gross and P. Maillard. 2008. Do elevation of CO_2 concentration and nitrogen fertilization alter storage and remobilization of carbon and nitrogen in pedunculate oak saplings? Tree Physiol. 28: 1729-1739.

Wisniewski, M., C. Bassett and R. Arora. 2004. Distribution and partial characterization of seasonally expressed proteins in different aged shoots and roots of 'Loring' peach (*Prunus persica*). Tree Physiol. 2: 339-345.

Yemm E. W. and E. C. Cocking. 1955. The determination of amino acids with ninhydrin. Analyst. 80: 209-213.

Yeoh, H.H. and Y.C. Wee. 1994. Leaf protein contents and nitrogen-to-protein conversion factors for 90 plants species. Food Chemistry. 49: 245-250.

Table 1. Analysis of variance (P-values) of the effects of species, stem sapwood compartment (most recent rings (RR) and oldest rings (OR)) and sampling dates on the seasonal dynamics of non-structural nitrogen compounds (NSNC), soluble proteins, free amino acids, non-structural carbohydrates (NSC), starch and soluble sugars in the stem sapwood of 50-year-old *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Fagus sylvatica L.*

		P values					
Source of variation	**Degree of freedom**	**NSNC**	**Soluble proteins**	**Free amino acids**	**NSC**	**Starch**	**Soluble sugars**
Species (+ site)	1	0.0000	0.0284	0.000	0.0000	0.0000	0.0000
Sessile oak							
RR x OR	1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001	0.0010
RR x Date	12	0.5590	0.7927	0.6742	0.0004	0.0001	0.0002
OR x Date	12	0.0007	0.6333	0.0030	0.0060	0.4552	0.0000
Beech							
RR x OR	1	0.0004	0.0000	0.5599	0.6178	0.5637	0.2344
RR x Date	12	0.0205	0.4909	0.0917	0.0312	0.0000	0.0001
OR x Date	12	0.9195	0.4570	0.9768	0.4127	0.0010	0.0001

Table 2. Non-structural nitrogen compounds (soluble proteins and free amino acids) and non-structural carbohydrates (starch, sucrose, glucose, fructose and mannose) concentrations (% DM) in the most recent rings (RR) and oldest rings (OR) in the stem sapwood of 50-year-old *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.and *Fagus sylvatica L.* at 5 key dates along the studied period : October 2007 (leaf senescence), January 2008 (dormancy), April 2008 (before bud burst), June 2008 (after full leaf expansion) and October 2008 (leaf senescence). Different letters in the same line indicate significant differences between dates (Tuckey Kramer honestly at $P<0.05$). n.d. : not detected.

	Species	**Stem compartment**	**October 2007**	**January 2008**	**April 2008**	**June 2008**	**October 2008**
Soluble proteins (% DM)	*Sessile oak*	RR	0.07 ns	0.11 ns	0.10 ns	0.13 ns	0.09 ns
		OR	0.03 ns	0.03 ns	0.05 ns	0.04 ns	0.07 ns
	Beech	RR	0.11 ns	0.10 ns	0.07 ns	0.09 ns	0.05 ns
		OR	0.06 ns	0.04 ns	0.04 ns	0.04 ns	0.05 ns
Free amino acids (% DM)	*Sessile oak*	RR	0.19 ns	0.17 ns	0.24 ns	0.14 ns	0.19 ns
		OR	0.12 b	0.09 ab	0.12 b	0.06 a	0.13 ab
	Beech	RR	0.08 ns	0.11 ns	0.12 ns	0.13 ns	0.09 ns
		OR	0.11 ns	0.12 ns	0.09 ns	0.09 ns	0.10 ns
Starch (% DM)	*Sessile oak*	RR	5.53 b	3.17 ab	5.26 b	1.99 a	4.75 ab
		OR	3.77 ns	1.75 ns	3.57 ns	2.32 ns	3.38 ns
	Beech	RR	1.20 bc	0.08 a	0.42 ab	1.41 cd	1.60 d
		OR	1.29 b	0.42 a	0.92 ab	0.91 ab	0.92 ab
Sucrose (% DM)	*Sessile oak*	RR	1.53 ns	1.38 ns	1.05 ns	1.23 ns	1.48 ns
		OR	1.23 bc	1.16 bc	0.73 a	0.76 a	1.12 b
	Beech	RR	0.90 b	0.91 b	0.87 b	0.41 a	0.93 b
		OR	0.90 bc	0.87 abc	0.96 bc	0.57 ab	1.03 c
Glucose (% DM)	*Sessile oak*	RR	0.21 ab	1.08 c	0.21 ab	0.15 a	n.d.
		OR	0.23 b	0.63 c	0.04 a	0.03 a	0.05 a
	Beech	RR	0.01 a	0.48 c	0.22 ab	0.11 ab	n.d.
		OR	n.d.	0.46 b	0.19 a	n.d.	n.d.
Fructose (% DM)	*Sessile oak*	RR	0.15 b	0.92 c	0.15 b	0.21 b	0.05 a
		OR	0.12 a	0.57 b	0.07 a	0.12 a	0.09 a
	Beech	RR	0.01 a	0.35 b	0.05 a	0.02 a	n.d.
		OR	n.d.	0.29 a	0.05 b	n.d.	n.d.
Mannose (% DM)	*Sessile oak*	RR	0.26 ns	0.16 ns	0.36 ns	0.24 ns	0.21 ns
		OR	0.24 ab	0.41 abc	0.10 a	0.16 ab	0.26 ab
	Beech	RR	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		OR	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Legends

Figure 1. Sessile oak

(A) Monthly minimum air temperature (°C) at the study sites from October 2007 to October 2008. (B) Polypeptides profiles from SDS-PAGE showing the seasonal variations of soluble proteins composition in the most recent rings (RR) of the stem sapwood of 50-year-old oak. For the oldest rings (OR), gels were cut to show only the seasonal variation of the 26kDa polypeptide. For each lane, proteins from 10 mg DM (RR) and 25 mg DM (OR) were loaded. The molecular weights of standard polypeptides (M for marker) are shown on the left. (C) Seasonal variations of non-structural carbohydrates (NSC) concentrations (% DM) in RR and OR (n = 4). NSC composition was: starch (black), sucrose (gray) and hexoses : glucose + fructose + mannose (white). Letters indicate significantly different concentrations of NSC among sampling dates at P <0.05 by Tukey HSD test. The standard error for starch, sucrose and hexoses are presented on the histograms.

Black arrows indicate times of bud burst and leaf fall, vertical dashed lines indicate the period of bud burst, and vertical black lines correspond to the period of stem radial increment.

Figure 2. Beech

Same legend as Figure 1.

ns indicates no significant differences in NSC concentrations among the sampling dates.

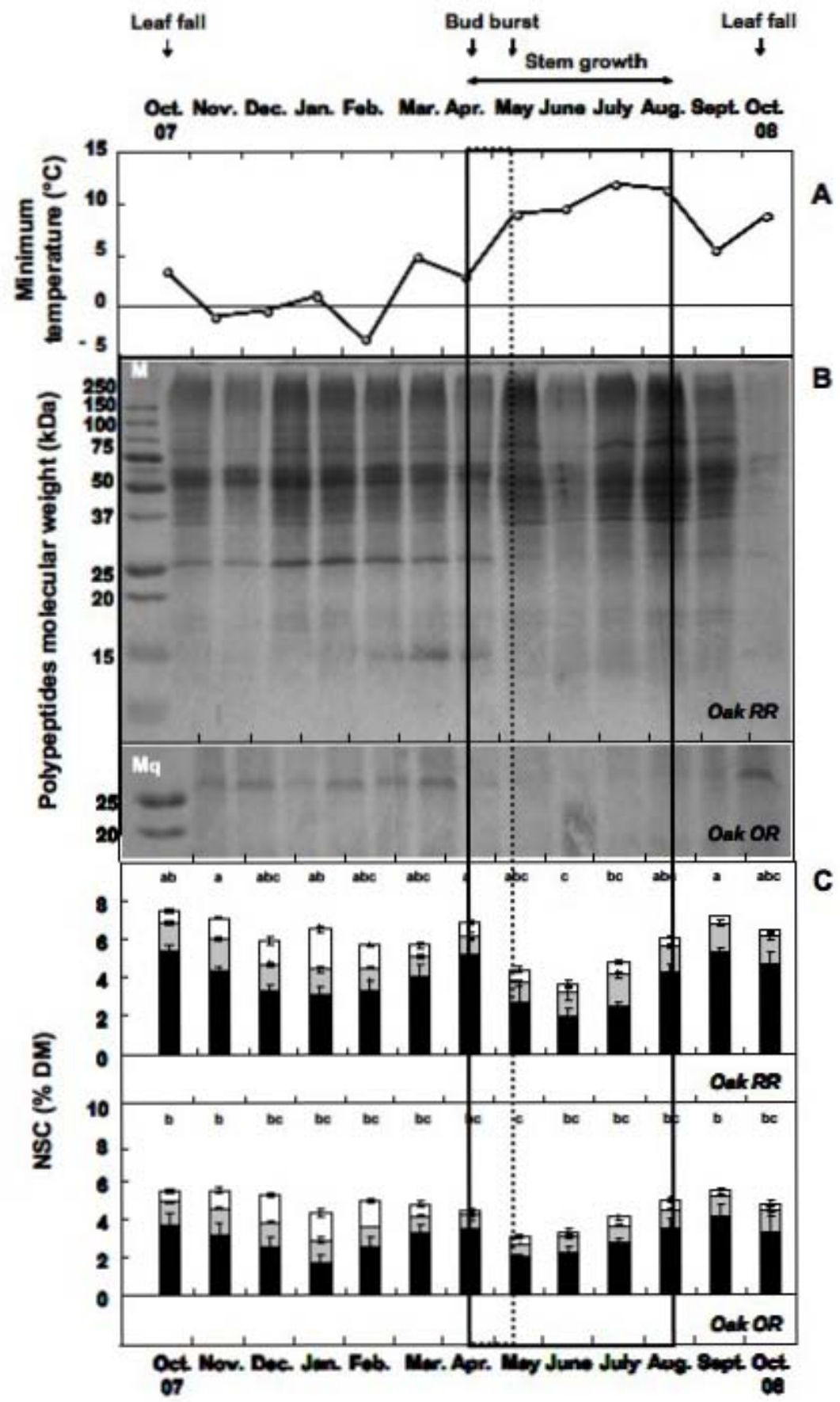

Leaf fall
Bud burst
Leaf fall
Stem growth
Oct. 07
Nov.
Dec.
Jan.
Feb.
Mar.
Apr.
May
June
July
Aug.
Sept.
Oct. 08
Minimum temperature (°C)
A
B
Polypeptides molecular weight (kDa)
M
Mq
Oak RR
Oak OR
C
NSC (% DM)
Oak RR
Oak OR

Figure 1

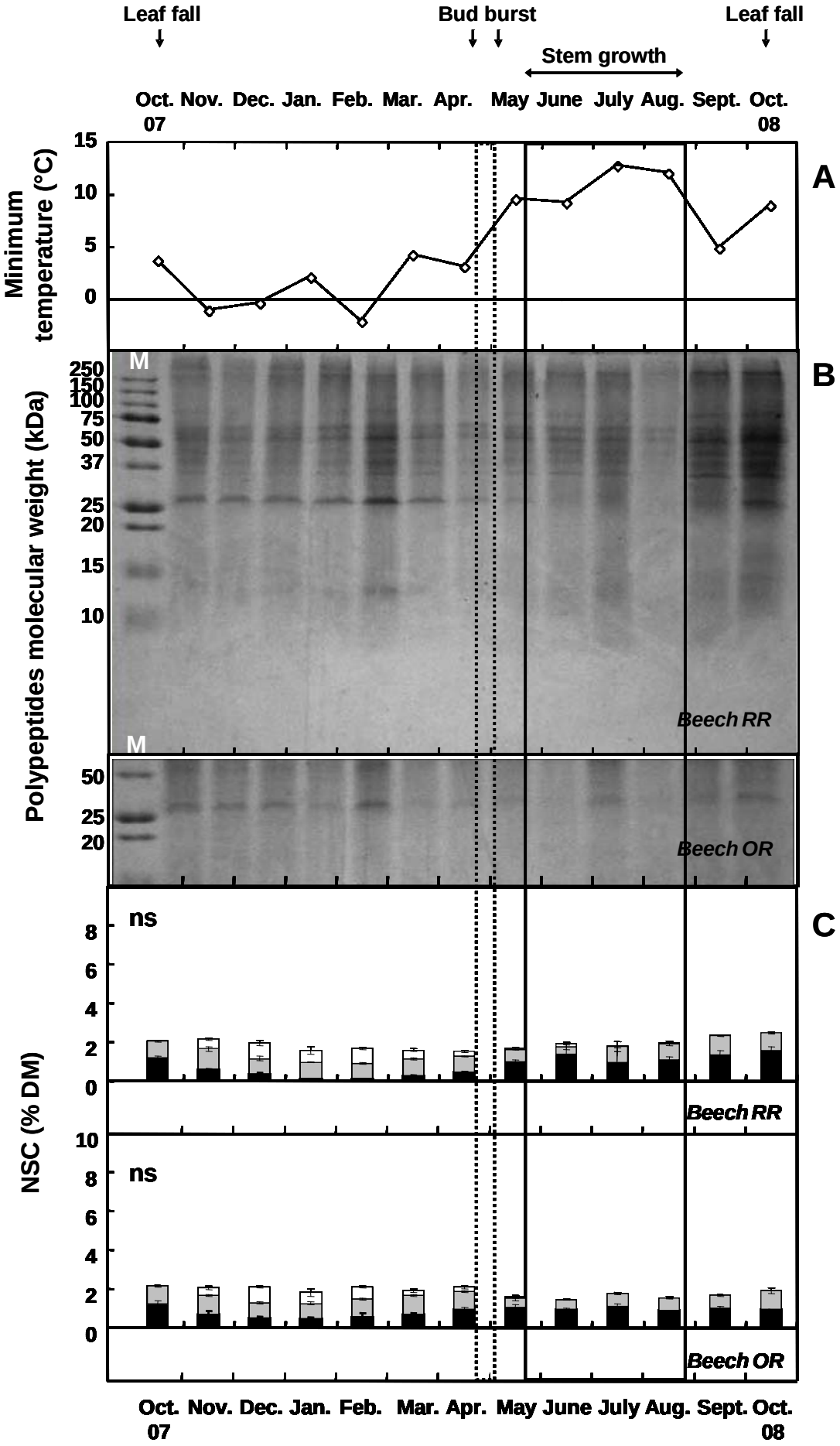

Leaf fall
Bud burst
Leaf fall
Stem growth
Oct. Nov. Dec. Jan. Feb. Mar. Apr. May June July Aug. Sept. Oct.
07
08
Minimum temperature (°C)
15
10
5
0
A
Polypeptides molecular weight (kDa)
M
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
Beech RR
M
50
25
20
Beech OR
B
NSC (% DM)
ns
8
6
4
2
0
Beech RR
10
ns
8
6
4
2
0
Beech OR
C
Oct. Nov. Dec. Jan. Feb. Mar. Apr. May June July Aug. Sept. Oct.
07
08

Figure 2

N sources for current-year shoot growth in 50-year-old sessile oak trees: an *in situ* 15N labeling approach.

R. EL ZEIN, N. BREDA, D. GERANT, B. ZELLER and P. MAILLARD.

Submitted to *Plant and Soil*





N sources for current-year shoot growth in 50-year-old sessile oak trees: an in situ ^{15}N labeling approach

R. EL ZEIN [1,2], N. BREDA [2], D. GERANT [1], B. ZELLER [3] and P. MAILLARD[2,4]

[1] Université Henri Poincaré, UMR 1137 Ecologie et Ecophysiologie Forestières IFR 110, Faculté des Sciences, F-54500 Vandoeuvre-les-Nancy, France

[2] INRA, UMR 1137 Ecologie et Ecophysiologie Forestières, Centre INRA Nancy, F-54280 Champenoux, France

[3] UR 1138 INRA Nancy, Biogéochimie des Ecosystèmes Forestiers, Centre INRA Nancy, F-54280 Champenoux, France

[4] Corresponding author: Pascale Maillard (maillard@nancy.inra.fr)

Running title: N source for shoot growth in adult sessile oak

Key words: N storage, N remobilization, N uptake, N partitioning, leaf N, bud burst, *Quercus petraea*

Word count:
(Abstract: 243, Introduction: 580, Materials and Methods: 1589, Results: 920, Discussion: 1530, Acknowledgements: 116)

56 references
Tables: 2, **Figures**: 5

ABSTRACT

We investigated N source for shoot growth in 50-year-old sessile oak trees using a long term continuous *in situ* labeling of soil N during bud burst. The recovery of ^{15}N in the growing tissues of sun shoots (leaves, twigs and buds) and in the phloem sap was quantified weekly in order to assess the contribution of soil N uptake to spring growth. During the first 2 weeks of bud burst, remobilized N contributed to more than 90% of total N of the developing leaves and twigs. N uptake from soil started concomitantly to N remobilization and contributed to a small extent to bud burst. The fraction of new N in the total N increased markedly in plant tissues when bud burst was achieved and reached 53% in fully expanded leaves and 35% in developed twigs. In the phloem sap, ^{15}N tracer appeared early after the first labeling and increased until the end of bud burst then decreased at full leaf expansion in June. Among shoot compartments, leaves were the major sink for newly assimilated N, accounting for 68% of new N in shoots whereas twigs and newly formed buds accounted for 28% and 3% respectively. New N partitioning to leaves increased from unfolding to full expansion whereas total N concentration decreased. Our results underline the crucial role of stored N for rapid leaf growth and sustained growth of oak trees, all factors reducing N storage in autumn may handicap spring shoot growth.

INTRODUCTION

Among mineral nutrients, nitrogen (N) is a growth-limiting factor for trees in natural forest ecosystems with low anthropogenic N input (Rennenberg et al. 1998 and 2009). In floodplain forest characterized by an open ecosystem N cycle, trees are often exposed to a through flow of nitrate (NO_3) as the predominant N source (Rennenberg et al. 2010). By contrast, forest ecosystems that develop on marginal soils with growth limiting N availability are characterized by a closed N cycle. In these ecosystems, reduced N compounds such as amino acids and ammonium (NH_4) are the dominant N sources for trees (Rennenberg et al. 2009). For trees growing under these conditions *e.g.* European beech (*Fagus sylvatica*) and oak species (*Quercus* spp.), growth is seasonal (Rennenberg et al. 2010) and new leaves develop over a few weeks in the spring or in a few short-term flushes spread over the growing season (Kozlowski 1971).

Seasonal N cycling is a requisite component of the perennial lifestyle (Staswick 1994; Stepien et al. 1994). In deciduous trees, N is withdrawn from senescing leaves in autumn then stored during winter as amino acids and vegetative storage proteins in the bark and wood parenchyma of perennial organs such as roots and stem (*e.g.* Stepien et al. 1994). In early spring, the internal cycling of stored N allows deciduous trees to sustain growth (Millard 1996) particularly when the environmental conditions for N uptake from the soil are not optimal (Murray et al. 1989; Cooke and Weih 2005).

Contrary to carbon remobilization which is sink driven, N remobilization in spring is source driven (Millard and Grelet 2010) and is not affected by N availability in the soil during the growth season (Millard 1996). Leaf growth is the strongest sink for this N remobilization during spring and remobilized N can reach up to 90% of total N used for leaf growth (Millard 1996; Neilsen et al. 1997). Most of this remobilization occurs usually before there is much root uptake (Millard and Proe 1991). The relative contribution of remobilized N and root supplied N to leaf growth is dependent on soil fertility (Millard 1996) and on tree age (Miller and Miller 1987). Soil N availability during the previous years affects the amount of stored N and consequently the amount of N remobilized for spring growth (Frak et al. 2005). Moreover, N content of the perennial organs of trees and their storage capacity increase as they get older (Harrison et al. 2000).

Most of the studies that investigated N source for leaf and shoot growth in trees were achieved on saplings growing under controlled condition in sand culture pots (Millard and Grelet 2010). To our knowledge, only few studies investigated N source for spring growth in field grown trees such as 6-year-old spruce, 8-year-old maple (Millard 1994) and 10-year-old cherry (Millard et al. 2006).

Sessile oak [*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.] is a deciduous ring porous species of northeastern France. High C remobilization for spring growth was well described in this deciduous species (Barbaroux and Bréda 2002; Barbaroux et al. 2003), however no data is available about N remobilization.

The aim of our study was to investigate the source of N for the growth of current-year shoot in 50-year-old sessile oak trees. Our experimental approach consisted in a long term ^{15}N labeling of soil N pools during bud burst. The recovery of labeled N in leaves, twigs and buds was analyzed weekly during shoot growth in order to distinguish newly assimilated N from remobilized N.

MATERIALS AND METHODS

Study site and soil description

The study was conducted in a pure stand of sessile oak [*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.] from natural regeneration in the state forest of Champenoux, France (48°44′ N, 6°14′ E, elevation 237 m). Mean annual temperature was 9.2°C and mean annual precipitation was 744 mm. In 2009, dominant oak trees were 20 m height and aged between 50 and 55-year-old. The stand density was 2553 stems $ha^{-1}$and basal area was 26.7 $m^2.ha^{-1}$. Maximal stand leaf area index (LAI) was 6.1 in 2009 as estimated by litter collection during autumn. Monitoring of stand LAI progression during spring was derived from canopy interception of global radiation based on above- and below-canopy measurements according to Bréda (2003). Radiation was measured every 10s, and 30 min averages were calculated and stored in data loggers (Campbell Scientific, Courtaboeuf, France). Below canopy global radiation was measured using a 1 m-long tube solarimeter (Delta-T device, UK) located at 1 m above the soil level. Incident global radiation was measured with a pyranometer (CMP6, Kipp and Zonen, Netherlands) in a weather station monitored by INRA installed close to the study site.

Oak stand was growing on a cambisol (WRB 2006), developed on a deep loam as described in Bréda et al. (1995). The upper horizon, consisting of a silty clay loam, presents a crumb structure. Hydromorphic spots appear below 30 cm. A clay enriched horizon (B_t), with a clay content of about 45%, bordered this upper compartment between 60 and 80 cm depth. Below 1m depth, the clay content decreases while bulk density increases continuously to 1.55 at 1.15 m depth. Site fertility was high, humus type was oligo-mull, N content in the upper organic layer (horizon A1) was 2.14 $g.kg^{-1}$ (C/N of 13.5).

The ^{15}N labeling design

Three dominant oaks, designed as N1, N2 and N3 with stem circumferences at breast height of 724 mm, 754 mm and 898 mm, respectively were selected for the labeling experiment. The three oaks were situated in a delimitated plot of 84 m^2 (14 m * 6 m) within the study site. The underlaying vegetation (herbaceous and hornbeam sproutings) in this area was removed in November 2008. At the end of March 2009, remaining litter from the previous year was removed from soil and the experimental plot was carefully cleared again. Otherwise plant litter may retain a significant

amount of the label (May et al. 1996). The cleaned plot was then divided into squares of 1 m^2 then covered with superimposed black plastic sheets to prevent leaching and growth of new vegetation. To avoid accumulation of CO_2 and mineral N, the plastic sheets were removed once a week, allowing the gas exchanges between the soil and the atmosphere. Finally, the plot was surrounded by wire fences to avoid any disturbance.

Five applications of ^{15}N tracer were performed weekly from April 10 (day of the year DOY 100) before bud burst, to May 7 (DOY 127, Figure 1) when bud burst was achieved. On each weekly ^{15}N application, 10g of $^{15}NH_4$ $^{15}NO_3$ enriched to 98 atom % ^{15}N (Cambridge Isotope Laboratories, Inc) were carefully dissolved in 1000 L of freshly deionized water then applied to the soil. Labeling consisted of sprinkling homogeneously 10 L of the^{15}N solution per 1 m^2 square of the experimental plot. After each labeling, the soil surface was covered with the plastic sheets, to avoid leaching of ^{15}N or dilution by rainfall. We assumed that the ^{15}N tracer would be present in the soil N pools through the experiment and therefore the appearance of ^{15}N in excess in new organs could be used as a marker of N uptake from the soil and that unlabeled N present in new organs would come from internal N remobilization.

Bud burst monitoring

Bud burst of the studied trees was recorded with binoculars every two to three days from the beginning of April until mid May 2009. Bud development was described according to a six-stage scale (dormant winter buds, swollen buds, broken buds, just-unfolded leaves, unfolded leaves, developed leaves with shoot elongation). Bud burst was achieved when the tree reached the unfolded leaf stage (Bréda and Granier 1996), which corresponded to the onset of both leaf expansion and increase in LAI.

Soil sampling, water content and N analyses

Three soil samples were first collected randomly from the unlabeled soil surrounding each tree to determine ^{15}N natural abundance. Then, three soil samples from randomly selected points around each tree were collected with an auger before each ^{15}N tracer application. Soil samples were distributed according to five 10 cm intervals in the silty horizons down to 50 cm of soil depth where the accumulated clay horizon started. Samples from different depths were collected in separate boxes and stored at 4°C until water content determination and nitrate and ammonium extractions. In the

laboratory, gravimetric soil water content was determined on subsamples of 40 g after drying 48 h at 105°C. Soil samples were sieved to pass through a 4 mm mesh then an aliquot oven dried for 2 days at 105°C. Mineral N ($N\text{-}NH_4^+$ and $N\text{-}NO_3^-$) was extracted after shaking 40 g of fresh soil with 200 mL of 2 M KCl during 1 hour. $N\text{-}NH_4^+$ and $N\text{-}NO_3^-$ concentrations were determined using continuous flow colorimetry (Skalar SA 5000). Abundance of $^{15}NH_4^+$ was analyzed using the micro-diffusion technique (Kelley et al. 1991; Sorensen and Steen Jensen 1991). Magnesium oxide (Fluka, ref. 416415/1) was added to the solution to recover NH_4^+ on a fiber-glass filter paper soaked with 2.5M $KHSO_4$. After one week, filters were removed, dried in a desiccator and analyzed. Concentration of $N\text{-}NO_3^-$ in the soil extracts was fairly low, therefore we did not measure the ^{15}N signal.

Plant material

Sun shoots were regularly collected by rifle fire from the crown of each tree. First shoots were collected on April 10 (DOY 100), just before bud burst and before the first ^{15}N application in order to determine natural ^{15}N abundance. Afterward, shoot samples were taken weekly before each labeling until the end of bud burst. The last sampling was achieved by mid June when leaves were fully expanded (DOY 166). Two shoot replicates were collected at each sampling date from each tree and separated into leaves, buds (2008 or 2009) and twigs (2008 or 2009), then frozen in liquid nitrogen in the field. Plant samples were then carried back to the laboratory and stored at -80°C (-86°C Freezer® Forma Scientific®, Ohio, USA), before freeze-drying (Dura-Top®, Dura-Dry® FTS Systems®, NY, USA), weighing, and grounding to a fine powder with a laboratory mill (CEPI SODEMI® CB2200, France).

Collection of phloem sap

Two small disks of bark (12 mm diameter) were collected from oak trees at 1.3 m height using a corer (Gessler et al. 2004). The first sample was collected prior the first labeling to determine ^{15}N natural abundance. The inner bark tissue was placed in a 10 mL vial containing 2 mL of ultra pure water then left to incubate for five hours at ambient temperature as described by Rennenberg et al. (1996). Then, the phloem extract solution was filtrated on a nylon cartridge (Whatman, 0.2µm Nyl., diam.

25mm, ref. 17 463 433) and the filtrate was vacuum evaporated during four hours (Maxi-Dry plus, Heto-model DW1, 0-110, Heto-Holten A/S Allerod, Denmark). Dried extracts were weighed then diluted into ultra-pure water proportionally to their dry mass. An aliquot of 60 µL of the resulting solution (containing about 0.8 to 1 mg of dried phloem extracts) was transferred into tin capsules (Elemental Microanalysis, UK, 6 x 4 mm, ref. D1006, BN/139877), freeze-dried (Lyophilizer Christ, Alpha 1-2 LD plus, Germany), weighed and analyzed for total N concentration and ^{15}N signal.

Isotopic and elementary analyses

Total N concentration and ^{15}N isotopic abundance of dry matter of the various shoot compartments (2-3 mg), phloem sap (0.8-1 mg) and fiber-glass filters (≈ 50 µg) were measured using an elemental analyzer (NA 1500 NCS, Carlo Erba, Milan, Italy) coupled to a Delta-S isotopic ratio mass spectrometer (Finnigan–Mat, Thermoquest Corp., San Jose, CA).

Isotopic calculations

The isotopic signal for N was expressed as ^{15}N atom% versus an international standard (N_2 in the air):

Erreur ! Signet non défini. $$^{15}\text{N atom\%} = \frac{R_{sample} - R_{standard}}{R_{standard}} \text{x} 100$$

where R is the ratio $^{15}N/^{14}N$.

The relative specific allocation of new N (RSA_N), which describes the fraction of newly incorporated N in the tissue relative to total N in a given sample (Deléens et al. 1994), was calculated as:

$$RSA_N(\%) = \frac{I_p - I_{cp}}{I_s - I_{cs}} \text{x} 100$$

where I_p is the isotopic signal of ^{15}N atom% of the plant sample, I_{cp} is the control isotopic signal of the unlabeled plant samples (average value of 0.36266 atom% ± 0.000295), I_s is the isotopic signal of the ^{15}N-NH_4 atom% of the soil between 0 and 30 cm (average value of 0.85642 atom% ± 0.065342) and I_{cs} is the control isotopic signal of the unlabeled N-NH_4 of the soil (average value of 0.36658 atom% ± 0.000439).

Content of newly incorporated N in each shoot compartment (buds, leaves and twigs) was calculated as follows:

New N content = RSA_N % x [N] x DM

where [N] is the N concentration and DM the dry matter of each compartment.

New N content per shoot was then calculated by summing the new N assimilated by each of its compartments (buds, leaves, twigs). Partitioning of new N (P%) was calculated as the proportion of new N in a given compartment (buds, leaves, twigs) relative to the new N in the whole shoot (Deléens et al. 1994):

$$P\,\% = \frac{\text{New N content of the compartment}}{\text{New N content of the shoot}} \times 100$$

Statistics

Data were analyzed by the General Linear Model procedure (Statistica 6.1) to test the effect of tree and date on total N, RSA_N and the partitioning of new N within shoot compartments (buds, leaves and twigs).

RESULTS

Water content, N pools and ^{15}N enrichment of the soil

Soil water content (% dry soil) in the upper 50 cm of soil was stable and close to field capacity during the study period: 37.2% ± 1 in average at a depth of 0-10 cm, 31.6% ± 0.4 at 10-20 cm, 28.9% ± 0.4 at 20-30 cm and 27.8% ± 0.4 from 30 to 50 cm of soil depth (Table 1).

Ammonium ($N\text{-}NH_4^+$) was the most abundant form of N in the soil whereas only traces of nitrate ($N\text{-}NO_3^-$) were detected. Concentrations of $N\text{-}NH_4^+$ decreased with soil depth and were stable during the experiment period. $N\text{-}NH_4^+$ concentration average value was 18.24 ± 1.75 $mg.kg^{-1}$ at 0-10 cm, 10.48 ± 0.74 $mg.kg^{-1}$ at 10-20 cm and 7.28 ± 0.60 $mg.kg^{-1}$ at 20-30 cm and dropped to 4.82 ± 0.46 $mg.kg^{-1}$ at 30-40 cm then to 2.90 ± 0.43 $mg.kg^{-1}$ at 40-50 cm of soil depth. $N\text{-}NO_3$ concentrations were less than 0.3 $mg.kg^{-1}$ at 0-10 cm of soil depth and hardly detectable (0.03 to 0.04 $mg.kg^{-1}$) from 10 to 50 cm of soil depth (Table 1).

Recovery of ^{15}N in the soil NH_4 pool, the dominant N form, was measured to assess the availability of ^{15}N tracer for uptake by the trees during the experiment. ^{15}N signal was detected within one week (April 16) from the first ^{15}N tracer application. From April 22 to May 7, ^{15}N signal was relatively stable with an average value of 0.856 ± 0.065 atom% between 0-30 cm of soil depth.

Bud burst and shoot growth

On April 10 (DOY 100), buds were still dormant and started to swell on April 14 (DOY 104) in trees N1 and N2, whereas buds were still dormant in tree N3 (Figure 1). Between April 22 and 30 (DOY 112 and 120), buds broke and unfolded leaves appeared on trees N1 and N2, whereas buds were just broken on tree N3. By May 7 (DOY 127), bud burst was achieved and leaves were unfolded in the three oak trees. Leaves and twigs continued to develop afterward and full leaf expansion was achieved by June 15, 63 days from bud burst (DOY 166), as confirmed by maximum leaf area index (Figure 1).

Total N concentrations and partitioning within the new shoot.

Before bud burst (DOY 106), total N concentration in dormant buds was higher than that of twigs (Figure 2A) and total N of the buds represented 57% of the total N of the

shoot (Figure 2B). At DOY 112, N concentration of unfolded leaves was higher (4.20 ± 0.05% DM) than that of remaining buds (1.95 ± 0.20% DM) and twigs (1.62 ± 0.35% DM). Concentration of N in unfolded leaves represented 56% of total N of the shoot (Figure 2B). At DOY 120, N concentration of leaves was slightly lower than that at DOY 112 and N concentration in new twigs was in average 3.11 ± 0.13% DM. At DOY 166, when leaves were fully expanded, N concentration of all the organs was significantly lower than that of unfolded leaves (DOY 112). At this date, N concentrations in leaves, new twigs and buds represented respectively 74, 22 and 4% of total N of the shoot (Figure 2B).

RSA_N and partitioning of new N within new shoots

On DOY 112, newly absorbed N (new N) accounted for less than 1% of the total N in unfolding leaves, in developing twigs and in remaining buds (Figure 3A). RSA_N increased to about 9% on DOY 120 in both unfolded leaves and twigs (p = 0.000). When bud burst was achieved (DOY 127), new N accounted for 35% of the total N in leaves and to 27 and 20% in new twigs and in buds, respectively. On DOY 166, new N accounted for 53% of the total N in fully expanded leaves and for 36% in both twigs and buds 2009 (Figure 3A).

Partitioning of new N within the new shoot (Figure 3B) was similar to that of total N (Figure 2B). At the early growth stages (DOY 106), new N was primarily allocated to dormant buds (62%) than to twigs (38%). New N was allocated increasingly to growing leaves (from 58 to 80%) from DOY 112 to 166 (full leaf expansion, p = 0.002), while the partitioning of new N to the developing twigs decreased with time (from 32 to 17%, p = 0.004, Figure 3 and Table 2).

Figure 4 illustrates the correlation between leaf N status (total N %.DM^{-1}) and RSA_N (%) during the sampling period. Leaf N concentration was negatively correlated to RSA_N (r^2= 0.89). Leaf total N was at its highest concentration (4.2%.DM^{-1}) when RSA_N was only about 1%, both parameters evolved inversely during leaf development. When leaves were fully expanded in June, total N concentration dropped to 2.27% DM^{-1} whereas RSA_N reached its highest value (53%). No comparable correlations were observed for twigs or buds.

Total N concentration and RSA_N within the phloem sap

From bud burst to the achievement of leaf expansion, total N concentration decreased significantly (p = 0.009) within the phloem sap collected at 1.3 m height of the stem (Table 2). ^{15}N tracer appeared early after the first ^{15}N labeling. RSA_N was 8% ± 2 at DOY 112, it increased to 22% ± 1 at DOY 120 then to 34% ± 3 at DOY 127 and dropped to 19% ± 1 on DOY 166, when leaves were fully expanded (p = 0.005, Figure 5 and Table 2).

DISCUSSION

Soil N form for root uptake

In temperate forest ecosystems, nitrogen demand of trees is met mainly by the uptake of ammonium (NH_4^+) and nitrate (NO_3^-) from the organic and mineral soil (Glass and Siddiqi, 1995). During our experiment, soil organic N was mineralized to NH_4^+ but not further transformed to NO_3^-. Even if gross mineralization had not been determined, other indicators like the composition of the ground vegetation support the predominance of NH_4^+. Thus, NH_4^+ was the predominant source for root uptake by sessile oak trees between April and May. NH_4^+ concentration decreased parallel to soil depth but varied little during the 5 weeks of ^{15}N tracer applications from April to May. Application of the plastic sheet prevented changes in soil moisture recognized as an important driver for N mineralization in forest soils (Andrianarisoa et al. 2009). On the other hand, limited gas exchange between the soil and the atmosphere during one week may affect soil microbial activity. Nevertheless, the applied tracer was rapidly and rather homogeneously distributed in the top soil of our sessile oak stand. Small variation of the ^{15}N atom% of NH_4^+ from April 22 (DOY 112) to May 7 (DOY 127) was an indicator of a steady state between mineralization and root uptake. Within this time frame, the weekly tracer application allowed us to maintain optimal conditions for such an experiment. Nevertheless, we can not exclude uptake of organic N compounds like amino acids as shown by Gallet-Budynek et al. (2009) but with respect to the site conditions (soil type, pH, climate) this seems to be a negligible N source.

N status of the current-year shoot leaves

Leaves of current-year shoots contained high N concentrations that declined progressively from the beginning of leaf unfolding in April until full expansion in June. The same tendency was observed for leaves of Sitka spruce and sycamore trees (Millard 1994). In the evergreen Japanese oak (*Quercus glauca* Thunb.) and the deciduous Japanese maple (*Acer palmatum* Thunb.), leaf N concentration was maximal at the beginning of leaf expansion then decreased to reach a steady state after full leaf expansion (Koyama et al. 2008). In 26-year-old oak (*Quercus serrata* Thunb. ex. Murray), leaf N concentration was the highest in May just after bud burst, then decreased gradually toward early June and tended to remain relatively constant until

the beginning of leaf senescence (Migita et al. 2007). The decline in leaf N concentrations during leaf expansion may also result from the dilution of N by the increasing C biomass (Chapin 1980).

N sources for current-year shoot growth

Remobilized N was the main contributor to spring growth of 50-year-old sessile oak shoots accounting for more than 90% of total N of leaves and twigs at the early growth stages (DOY 120). Previous studies have also found that remobilized N contributed significantly to leaf expansion of young temperate tree species, constituting more than 60% of total leaf N in white birch (Wendler and Millard 1996) and sycamore maple (Millard and Proe 1991), more than 75% and almost 90% respectively in the lateral and top leaves of Japanese oak (*Quercus serrata*) (Ueda et al. 2009) and 80% of total N in leaves of pedunculate oak (Vizoso et al. 2008). Therefore, in mature oak trees, shoot growth is also entirely dependent on N reserves especially at the first stage of bud burst. The high foliage biomass (about 7 kg of dry matter, not shown) in 50-year-old trees implies a high supply of stored N. In fact, the capacity of storage increases with aging due to an increase in sapwood biomass, as demonstrated for carbon storage (Genet et al. 2010), and then internal cycling of N becomes increasingly important for the overall N economy of mature trees (Miller 1986).

In early spring, remobilized N is a more reliable N source for trees than currently absorbed N in the field (Ueda et al. 2009), since N uptake by roots is minimal because it is influenced by environmental factors such as low soil temperature and low mineralization rate (Cooke and Weih 2005). Moreover, the allocation of remobilized N to the growth sites within the tree crown is not influenced by N availability in the soil (Millard and Proe 1991; Wendler et al. 1995; Millard 1996; Frak et al. 2005).

In this study, the appearance of ^{15}N in buds, leaves and twigs from bud burst to the achievement of shoot growth was used to determine when the uptake of soil N by roots started to contribute to spring growth. Two days from the beginning of bud burst (April 16), ^{15}N tracer was allocated to swollen buds and to twigs (<1%) and continued to increase thereafter, demonstrating that in adult sessile oak, N uptake started early and participated to a small extent in providing N for bud burst and shoot growth.

This early N uptake from soil could be related to oak hydraulic properties. As a ring-porous species, sessile oak achieves 30% of annual radial stem growth before leaf expansion in spring (Bréda and Granier 1996). During this experiment, stem growth started on DOY 103, as detected by automatic micro-dendrometers (data not shown), thus early wood growth has already started before the first labeling application. This type of phenology is associated with winter embolism of large xylem vessels, implying that water flow pathway is restored each spring before the onset of transpiration (Bréda and Granier 1996) and thus allowing early root N uptake from soil as soon as soil temperature allows it.

Concomitant N remobilization and uptake from soil was observed in some deciduous trees such as walnut (Frak et al. 2002), silver birch and in evergreen trees such as Scots pine (Millard et al. 2001). Whereas for a range of species, N remobilization can occur for typically 20 to 30 days before roots become active for N uptake e.g. in apple (Neilsen et al. 1997; Guak et al. 2003), poplar (Millard et al. 2006), cherry (Grassi et al. 2002), pear (Tagliavini et al. 1997) and spruce (Millard and Proe 1993). In few species (e.g. the mountain ash "*Sorbus aucuparia*"), root uptake of N started only when N remobilization was finished (Millard et al. 2001). In mature sessile oak, early new growth is thus less decoupled to soil N uptake compared to other tree species. When bud burst was achieved (DOY 127), N assimilated by roots accounted for 35% in the leaves and 27% in the twigs and increased respectively to 53% and 35% when full leaf expansion was achieved in June. After the end of bud burst in general, the source of N for leaf growth switches from predominantly internal N remobilization to root uptake (Millard and Proe 1991; Grassi et al. 2002).

N translocation within phloem sap

RSA_N in the phloem sap of oak trees increased during bud burst (DOY 106 to 127) when N demand for growth was high and decreased after full leaf expansion in June (DOY 166). Translocation of mineral and/or organic N occurs via xylem and is largely controlled by the direction of the transpiration stream. During spring growth, bidirectional exchange of N compounds between phloem and xylem and vice versa also occurs in trees throughout long-distance transport (Weber et al. 1998; Gessler et al. 1998 and 2003), which could explain the observed increase in RSA_N during bud burst. New N in the phloem sap could also originate from mineral N assimilation at the foliar level. Part of the resulting organic N is thus not used for leaf metabolism but

is rapidly allocated to belowground organs. The decrease of RSA_N in phloem sap that occurred when leaves were fully expanded (DOY 166) could be explained by dilution with unxlabeled N as we stopped the labeling on DOY 127.

N partitioning within shoot compartments

Partitioning of newly assimilated N within oak shoots was higher in leaves (68%) compared to twigs (28%) and thus from the early stages of spring growth in April until full leaf expansion in June. Leaves were also the major sink for new N during the first six weeks of growth in 2-year-old beech trees (Dyckmans and Flessa 2002). In fact, the distribution of N compounds into each organ is strictly controlled by the sink activity (Osaki et al. 1995). Leaves are the major organ of N accumulation during the vegetative period (Millard and Thomson 1989) and their development creates a high sink for N. High N partitioning to leaves results from their photosynthetic activity (Evans and Seemann 1989). A large proportion of leaf N (up to 75%) is present in the chloroplasts, much of it in thylakoid membranes and soluble proteins of the Calvin cycle and particularly the enzyme Rubisco (Evans 1989).

In conclusion, stored N contributed to a great extent to the current-year shoot growth of 50-year-old sessile oak trees. N uptake by roots was concomitant to N remobilization and increased significantly after the end of bud burst. Further studies are required to investigate the relative contribution of storage organs such as roots, stem and branches to the remobilization of N for spring growth. The form of the remobilized N (protein or non-protein fraction) primarily allocated to the growing sites needs to be assessed, as well as the contribution of the newly assimilated N to storage of the next season.

ACKNOWLEDGEMENTS:

We would like to thank warmly J.M. Gioria for his valuable help in the experimental design, B. Clerc, P. Courtois and J. Marchand for their considerable help in labeling applications, and F. Gérémia for his help in both labeling application and tree sampling. We are grateful to P. Riveron for his help in sample preparation and C. Hossann for the isotopic analyses. Isotopic measurements were performed by the Technical Platform of Functional Ecology (OC 081) at INRA Forest Ecology and Ecophysiology Unit. The study was supported by AIB-ACS n°12000109 project funded by Conseil Régional de Lorraine, France. Rana El Zein received a PhD fellowship from the French Ministry of higher Education and Research.

REFERENCES

Andrianarisoa KS, Zeller B, Dupouey JL and Dambrine E (2009) Comparing indicators of N status of 50 beech stands (*Fagus sylvatica* L.) in northeastern France. For Ecol Manag 257:2241-2253

Barbaroux C and Bréda N (2002) Contrasting distribution and seasonal dynamics of carbohydrate reserves in stem wood of adult ring-porous sessile oak and diffuse-porous beech trees. Tree Physiol 22:1201-1210

Barbaroux C, Bréda N and Dufrêne E (2003) Distribution of above-ground and below-ground carbohydrate reserves in adult trees of two contrasting broad-leaved species (*Quercus petraea* and *Fagus sylvatica*). New Phytol 157:605-615

Bréda NJJ (2003) Ground-based measurements of leaf area index: a review of methods, instruments and current controversies. J Exp Bot 392:2403-2417

Bréda N, Granier A, Barataud F and Moyne C (1995) Soil water dynamics in an oak stand (1). Soil moisture, water potentials and water uptake by roots. Plant and Soil 172:17-27

Bréda N. and Granier A (1996) Intra and interannual variations of transpiration, leaf area index and radial growth of a sessile oak stand (*Quercus petraea*). Ann For Sci 53:521-536

Chapin FS (1980) The mineral nutrition of wild plants. Ann Rev Ecol Syst 11:233-260

Cooke JEK and Weih M (2005) Nitrogen storage and seasonal nitrogen cycling in *Populus*: bridging molecular physiology and ecophysiology. New Phytol 167:19-30

Deléens E, Cliquet JB and Prioul JL (1994) Use of ^{13}C and ^{15}N plant label near natural abundance for monitoring carbon and nitrogen partitioning. Aust J Plant Physiol 21:133-146

Dyckmans J and Flessa H (2002) Influence of tree internal nitrogen reserves on the responses of beech (*Fagus sylvatica*) trees to elevated atmospheric carbon dioxide concentration. Tree Physiol 22:41-49

Evans JR (1989) Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. Oecologia 78:9-19

Evans JR. and Seemann JR (1989) The allocation of protein nitrogen in the photosynthetic apparatus: costs, consequences, and control. In: Briggs WR, Alan R (ed) Photosynthesis. Liss, New York, pp 183-205

Frak E, Millard P, Le Roux X, Guillaumie S and Wendler R (2002) Coupling sap flow velocity and amino acid concentrations as an alternative method to N-15 labeling for quantifying nitrogen remobilization by walnut trees. Plant Physiol 130:1043-1053

Frak E, Le Roux X, Millard P, Guillaumie S and Wendler R (2005) Nitrogen availability, local light regime and leaf rank effects on the amount of sources of N allocated within the foliage of young walnut (*Juglans nigra * regia*) trees. Tree Physiol 26:43-49

Gallet-Budynek A, Brzostek E, Rodgers VL, Talbot JM, Hyzy S and Finzi AC (2009) Intact amino acids uptake by northern hardwood and conifer trees. Oecologia 160:129-138

Genet H, Bréda N and Dufrene E (2010) Age-related variation in carbon allocation at tree level and stand scales in beech (*Fagus sylvatica*) and sessile oak (*Quercus petreae* (Matt.) Liebl.) using a chronosequence approach. Tree Physiol 30:177-192

Gessler A, Rennenberg H and Keitel C (2004) Stable isotope composition of organic compounds transported in the phloem of European beech- Evaluation of different methods of phloem sap collection and assessment of gradients in carbon isotope composition during leaf-to-stem transport. Plant Biol 6:721-729

Gessler A, Weber P, Schneider S and Rennenberg H (2003) Bidirectional exchange of amino compounds between phloem and xylem during long-distance transport in Norway spruce trees (*Picea abies* [L.] Karst). J Exp Bot 54:1389-1397

Gessler A, Schneider S, Weber P, Hanemann U and Rennenberg H (1998) Soluble N compounds in trees exposed to high loads of N: a comparison between the roots of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst) and beech *(Fagus sylvatica*) trees grown under field conditions. New Phytol 138:385-399

Glass ADM and Siddiqi MY (1995) Nitrogen absorption by plant roots. In: Srivastava HS, Singh RP (ed) Nitrogen Nutrition in Higher Plants. New Delhi, Associated Publishing Co., pp 21-56

Grassi G, Millard P, Wendler R, Minotta G and Tagliavini M (2002) Measurement of xylem sap amino acid concentrations in conjunction with whole tree transpiration estimates spring N remobilization by cherry (*Prunus avium* L.) trees. Plant Cell Environ 25:1689-1699

Guak S, Neilsen D, Millard P and. Neilsen GH (2003) Determining the role of N remobilization for growth of apple (*Malus domestica* Borkh.) trees by measuring xylem-sap flux. J Exp Bot 54:2121-2131

Harrison RB, Reis GG, Reis MDGF, Bernardo AL and Firme DJ (2000) Effect of spacing and age on nitrogen and phosphorous distribution in biomass of *Eucalyptus camaldulensis, Eucalyptus pellita* and *Eucalyptus urophylla* plantations in southeastern Brazil. For Ecol Manage 133:167-177

Kelley KR, Ditsch DC and Alley MM (1991) Diffusion and automated nitrogen-15 analysis of low-mass ammonium samples. Soil Sc Soc Amer J 55:1016-1020

Koyama L, Tokuchi N, Fukushima K, Terai M and Yamamoto Y (2008) Seasonal changes in nitrate use by three woody species: the importance of the leaf expansion period. Trees 22:851-859

Kozlowski TT (1971) Leaf growth and development. In: Kozlowski TT (ed) Growth and development of trees. Volume I. Seed germination, ontogeny, and shoot growth. Academic Press, London, UK, pp 207-244

May C, Schmidt G and Gebauer G (1996) The fate of [N-15]nitrate and [N-15]nitrate in the soil of a 140-year-old spruce in the Fichtelgebirge (NE Bavaria). Isotopes in environmental and health studies 32: 149-158.

Migita C, Chiba Y and Tange T (2007) Seasonal and spatial variations in leaf nitrogen content and resorption in a *Quercus serrata* canopy. Tree Physiol 27: 63-70

Millard P (1994) Measurement of the remobilization of nitrogen for spring leaf growth of trees under field conditions. Tree Physiol 14:1049-1054

Millard P (1996) Ecophysiology of internal cycling of nitrogen for tree growth. Z Pflanzen Boden 159:1-10

Millard P and Proe MF (1991) Leaf demography and the seasonal internal cycling of nitrogen in sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) seedlings in relation to nitrogen supply. New Phytol 117:587-596

Millard P and Proe MF (1993) Nitrogen uptake, partitioning and internal cycling in *Picea sitchensis* (Bog.) Carr. as influenced by nitrogen supply. New Phytol 125:113-119

Millard P and Thomson CM (1989) The effect of autumn senescence of leaves on the internal cycling of nitrogen for the spring growth of apple trees. J Exp Bot 40:1285-1289

Millard P, Hester A, Wendler R and Baillie G (2001) Interspecific defoliation responses of trees depend on sites of winter nitrogen storage. Funct Ecol 15:535-543

Millard P, Wendler R, Grassi G, Grelet GA and Tagliavini M (2006) Translocation of nitrogen in the xylem of field-grown cherry and poplar trees during remobilisation. Tree Physiol 26:527-536

Millard P and Grelet GA (2010) Nitrogen storage and remobilization by trees: ecophysiological relevance in a changing world. Tree Physiol 30:1083-1095

Miller HG (1986) Carbon x nutrient interactions-the limitations to productivity. Tree Physiol. 2:373-385

Miller HG and Miller JD (1987) Nutritional requirements of Sitka spruce. Proc R Soc Edinb 85B:83-96

Murray M, Cannell M and Smith R (1989) Date of budburst of 15 tree species in Britain following climatic warming. J Appl Ecol 26:693-700

Neilsen D, Millard P, Neilsen GH and Hogue EJ (1997) Sources of N used for leaf growth in a high density apple (*Malus domestica*) orchard irrigated with ammonium nitrate solution. Tree Physiol 17:733-739

Osaki M, Yamada S and Tadano T (1995) Effect of sink manipulation on nitrogen accumulation and distribution among organs of *gramineae* and *leguminosae*. Soil Sci Plant Nutr 41:33-44

Rennenberg H, Schneider S and Weber P (1996) Analysis of uptake and allocation of nitrogen and sulphur compounds by trees in the field. J Exp Bot 47:1491-1498

Rennenberg H, Kreutzer K, Papen H and Weber P (1998) Consequences of high loads of nitrogen for spruce (*Picea abies*) and beech (*Fagus sylvatica*) forests. New Phytol. 139: 71-86

Rennenberg H, Dannenmann M, Gessler A, Kreuzwieser J, Simon J and Papen H (2009) Nitrogen balance in forest soils: nutritional limitation of plants under climate change stresses. Plant Biol 11:4-23

Rennenberg H, Wildhagen H and Ehlting B (2010) Nitrogen nutrition of poplar trees. Plant Biol 12:275-291

Sorensen P and Steen Jensen E (1991) Sequential diffusion of ammonium and nitrate from soil extracts to polytetrafluoroethylene trap for ^{15}N determination. Analytica Chimica Acta 252:201-203

Staswick PE (1994) Storage proteins of vegetative plant tissue. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 45:303-322

Stepien V, Sauter JJ and Martin F (1994) Vegetative storage proteins in woody plants. Plant Physiol Biochem 32:185-192

Tagliavini M, Quartieri M and Millard P (1997) Remobilised nitrogen and root uptake of nitrate for spring leaf growth, flowers and developing fruits of pear (*Pyrus communis* L.) trees. Plant Soil 195:137-142

Templer PH and Dawson TE (2004) Nitrogen uptake by four tree species in the Catskills mountains, New York: implications for forest N dynamics. Plant Soil 262: 251-261

Ueda MU, Mizumachi E and Tokuchi N (2009) Allocation of nitrogen within the crown during leaf expansion in *Quercus serrata* saplings. Tree Physiol 29:913-919

Vizoso S, Gérant D, Guehl JM, Joffre R, Chalot M, Gross P and Maillard P (2008) Do elevation of CO_2 concentration and nitrogen fertilization alter storage and remobilization of carbon and nitrogen in pedunculate oak saplings? Tree Physiol 28:1729-1739

Weber P, Stoermer H, Gessler A, Schneider S, von Sengbusch D, Hanemann H and Rennenberg H (1998) Metabolic responses of Norway spruce (*Picea abies*) trees to long-term forest management practices and acute $(NH_4)_2SO_4$ fertilization: transport of soluble non-protein nitrogen compounds in xylem and phloem. New Phytol 140:461-475

Wendler R and Millard P (1996) Impacts of water and nitrogen supplies on the physiology, leaf demography and nitrogen dynamics of *Betula pendula*. Tree Physiol 16:153-159

Wendler R, Carvalho PO, Pereira JS and Millard P (1995) Role of nitrogen remobilization from old leaves for new leaf growth of *Eucalyptus globulus* seedlings. Tree Physiol 15:679-683

WRB World reference base for soil resources (2006) A framework for international classification, correlation and communication. World soil resources reports 103, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 127 p

Table 1. Soil water content and concentrations of N-ammonium ($N\text{-}NH_4$) and N-nitrate ($N\text{-}NO_3$) pools at 10 cm interval between 0 and 50 cm of soil depth. Values are the average ± SE of 15 replicates.

Soil depth (cm)	Soil water content (% DM)	$N\text{-}NH_4$ ($mg.kg^{-1}$ DM)	$N\text{-}NO_3$ ($mg.kg^{-1}$ DM)
0-10	37.2 ± 1.0	18.24 ± 1.75	0.26 ± 0.10
10-20	31.6 ± 0.4	10.48 ± 0.74	0.03 ± 0.02
20-30	28.9 ± 0.4	7.28 ± 0.60	0.04 ± 0.03
30-40	27.9 ± 0.4	4.82 ± 0.46	0.04 ± 0.03
40-50	27.7 ± 0.3	2.90 ± 0.43	0.03 ± 0.02

Table 2. Analysis of variance of the effects of tree and date on total N, RSA_N and partitioning of new N within buds, leaves and twigs. *P* values and levels of significance were indicated: ns, non significant; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$

	Variable	*Total N*	*RSA_N*	*Partitioning of new N*
Shoot compartments				
Buds 2008	Tree	0.083 ns	0.090 ns	0.809 ns
	Date	0.033 *	0.32 ns	0.000 ***
Buds 2009	Tree	0.99 ns	0.31 ns	0.372 ns
	Date	0.000 ***	0.004 **	0.025 *
Leaves	Tree	0.749 ns	0.779 ns	0.264 ns
	Date	0.000 ***	0.000 ***	0.002 **
Twigs 2009	Tree	0.687 ns	0.734 ns	0.040 *
	Date	0.000 ***	0.000 ***	0.004 **
Phloem sap	Tree	0.260 ns	0.971 ns	-
	Date	0.009**	0.000 ***	-

Legends

Figure 1. Oak trees phenology during spring 2009. Budburst progression as visually assessed for the three oaks (N1, N2 and N3) and stand leaf area index dynamics as derived from global radiation interception. The arrows indicate the labeling date. Black circles indicate the sampling dates.

Figure 2. Changes in total N concentration (A) and partitioning (%) (B) in twigs of 2008 (dotted black) and 2009 (black), buds of 2008 (white) and 2009 (dotted white), and leaves (grey) of 50-year-old sessile oak trees from bud burst to achievement of leaf expansion. Values are the average ± SE, n=3.

Figure 3. Changes in RSA_N (A) and new N partitioning (B) in twigs of 2008 (dotted black) and 2009 (black), buds of 2008 (white) and 2009 (dotted white), and leaves (grey) of 50-year-old sessile oak trees from bud burst to achievement of leaf expansion. Values are the average ± SE, n=3.

Figure 4. Linear regression between total N concentration and RSA_N of leaves from bud burst to achievement of leaf expansion with its associated coefficient of determination (r^2).

Figure 5. Changes in total N concentration (white) and RSA_N (dark) of phloem sap collected at 1.3m height of 50-year-old sessile oak stems from bud burst to achievement of leaf expansion. Values are the average ± SE, n=3.

Figure 1

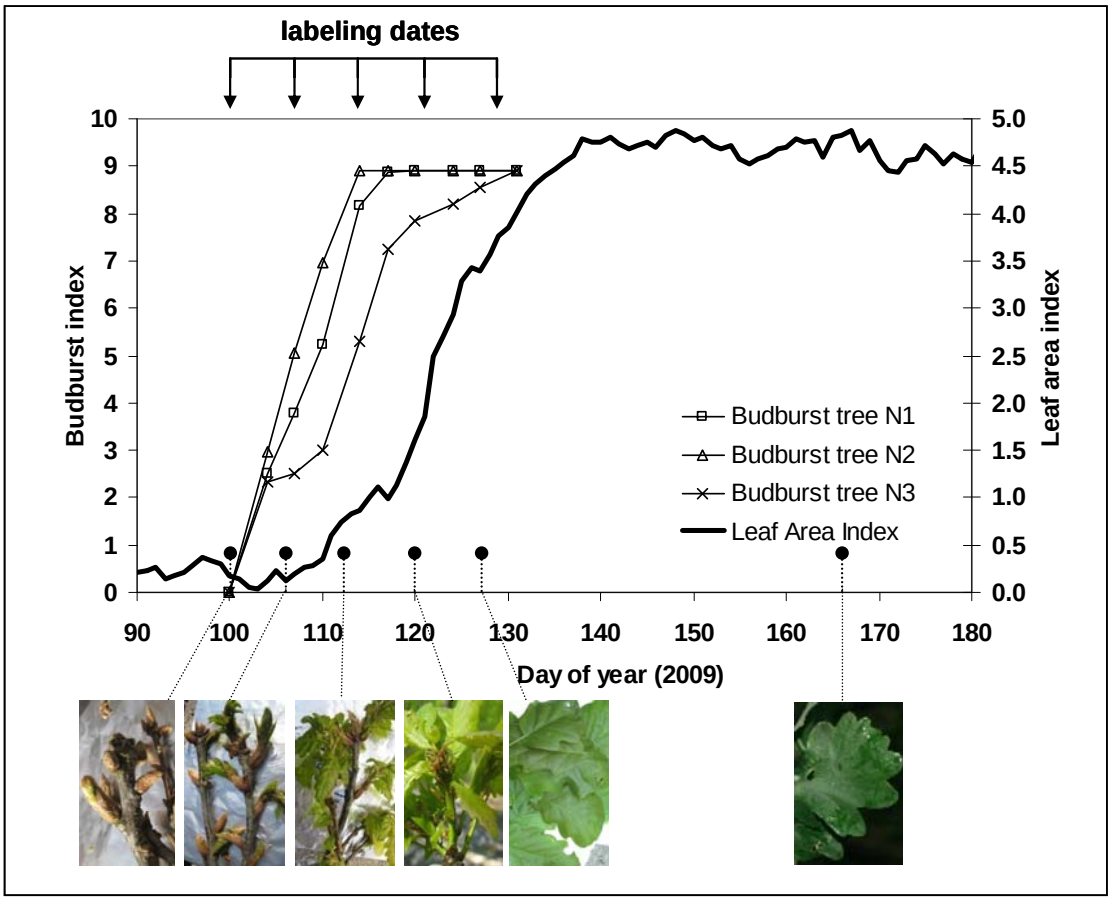

labeling dates
Budburst index
Leaf area index
Day of year (2009)
Budburst tree N1
Budburst tree N2
Budburst tree N3
Leaf Area Index
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5
5.0
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180

Figure 2

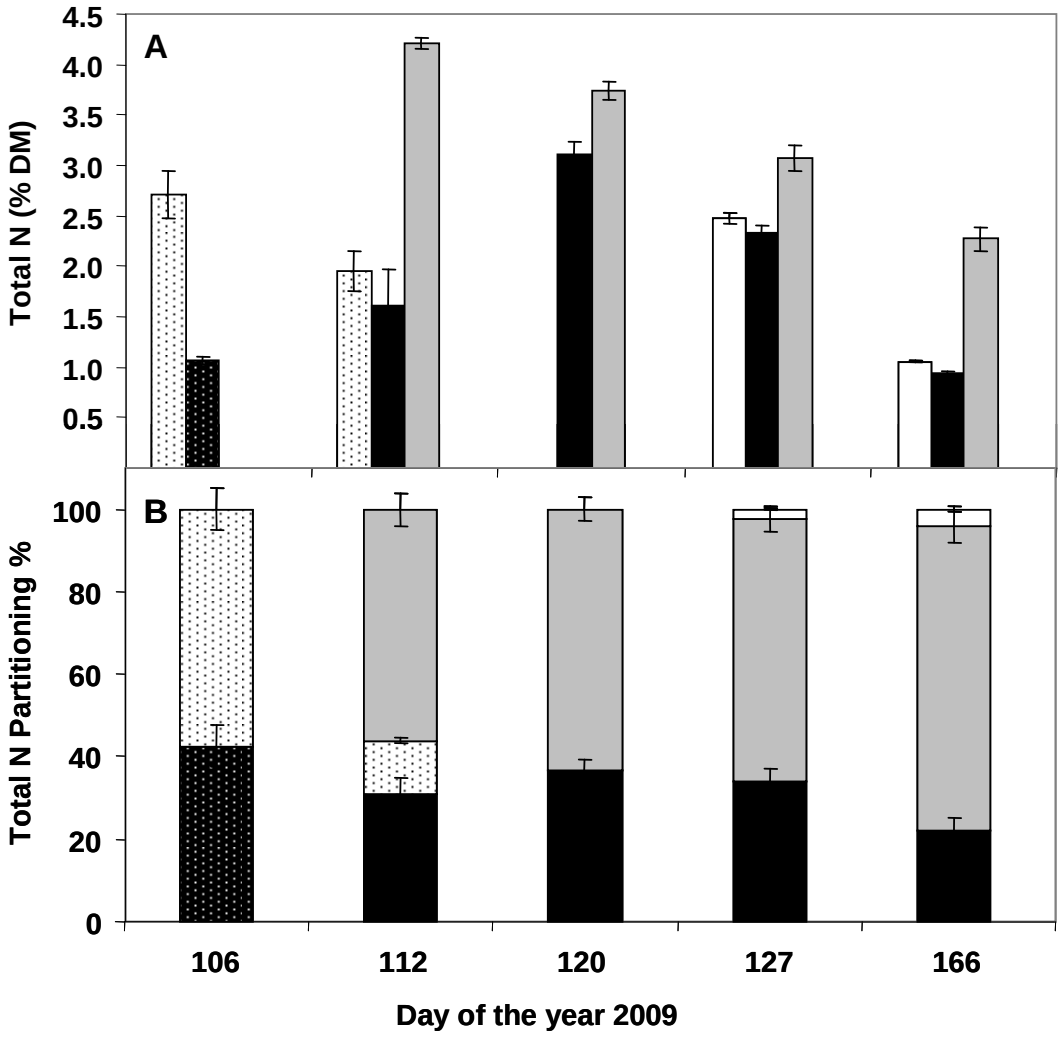

A
B
Total N (% DM)
Total N Partitioning %
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
100
80
60
40
20
0
106
112
120
127
166
Day of the year 2009

Figure 3

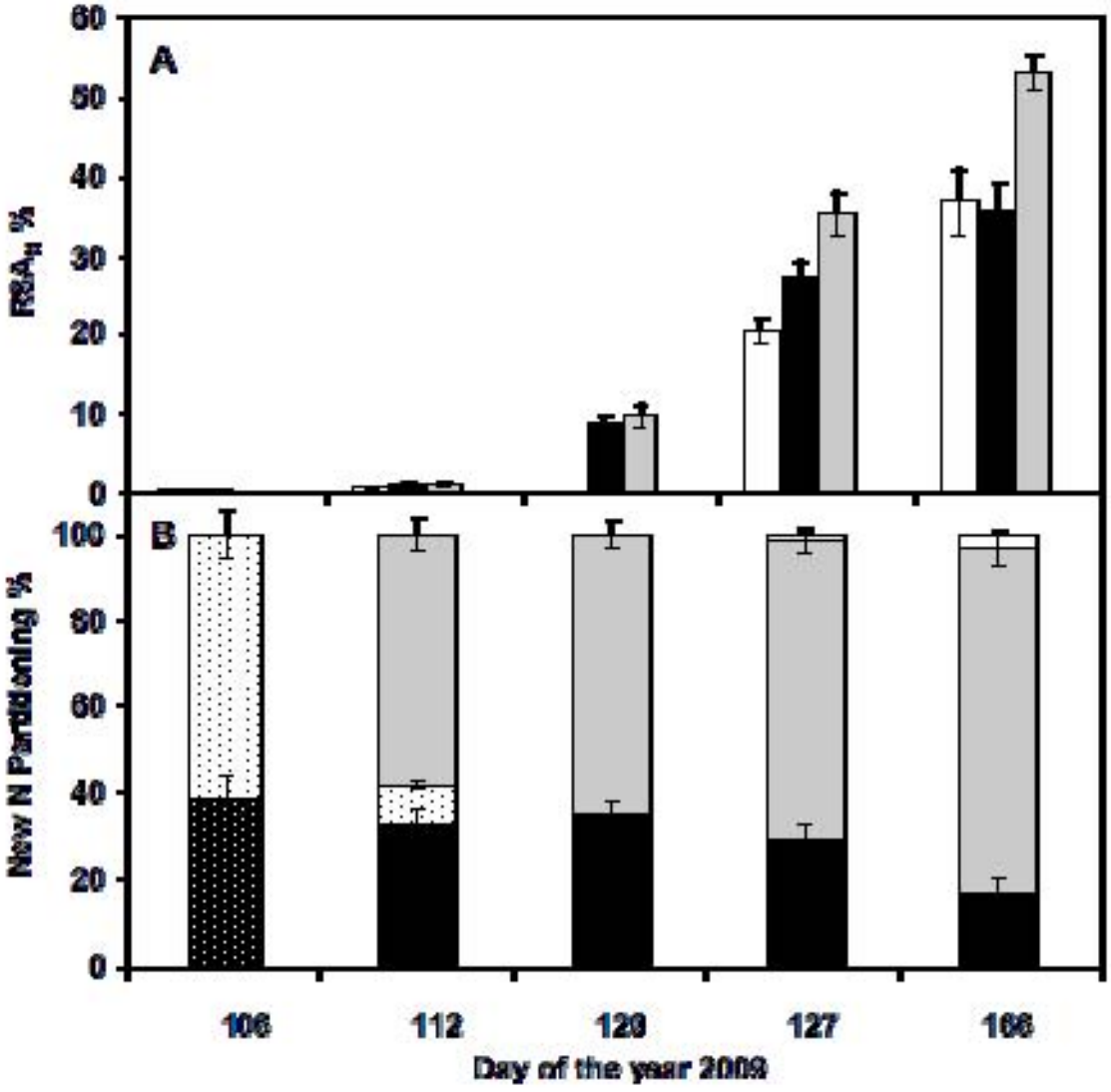

A
B
60
50
40
30
20
10
0
100
80
60
40
20
0
106
112
120
127
166
Day of the year 2009
New N Partitioning %

Figure 4

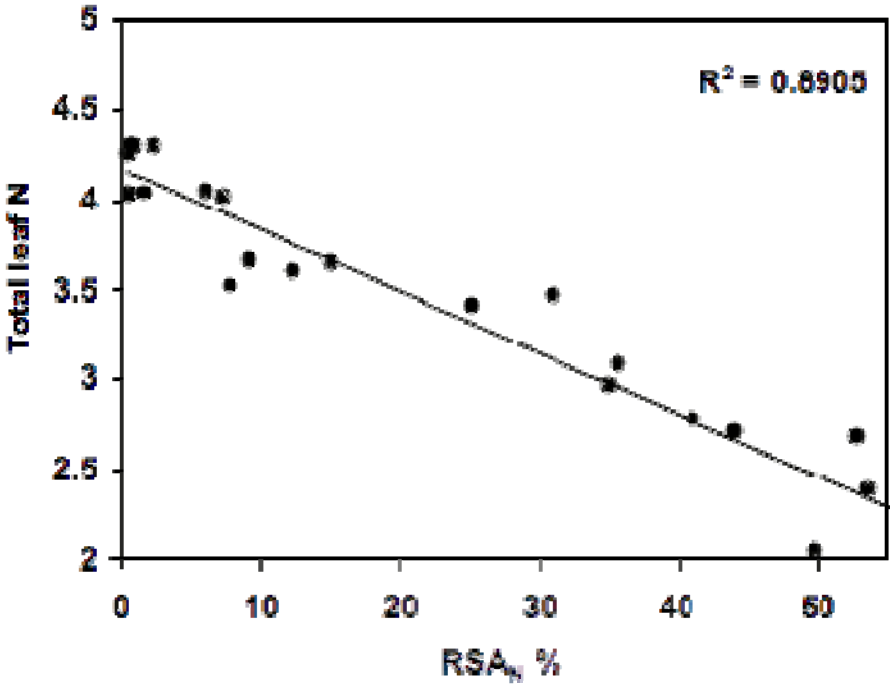
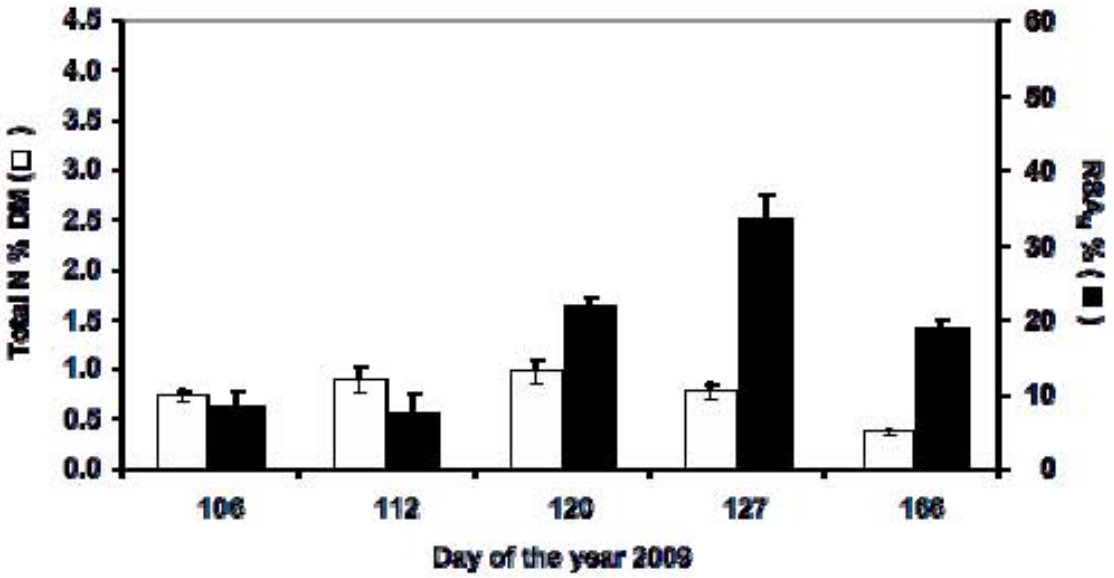


Figure 5


4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Total N % DM (□)
60
50
40
30
20
10
0
Ndfa % (■)
106
112
120
127
166
Day of the year 2009

Distribution of non-structural carbon and nitrogen compounds at the tree level in adult sessile oak and beech in winter and late spring.

R. EL ZEIN, N. BREDA, D. GERANT and P. MAILLARD.

In preparation



Distribution of non-structural carbon and nitrogen compounds at the tree level in adult sessile oak and beech in winter and late spring

R. EL ZEIN[1,2], D. GERANT[1], P. MAILLARD[2] and N. BREDA[2,3]

[1] Université Henri Poincaré, UMR 1137 Ecologie et Ecophysiologie Forestières, Faculté des Sciences, F-54500 Vandoeuvre-les-Nancy, France;

[2] INRA, UMR 1137 Ecologie et Ecophysiologie Forestières, Centre INRA Nancy, F-54280 Champenoux, France;

[3] Corresponding author: Nathalie Bréda (breda@nancy.inra.fr)

Running title: Non-structural C and N at the tree level in oak and beech

Key words: *Quercus petraea* (Matt.) Liebl., *Fagus sylvatica* L., perennial organs, biomass, deciduous, storage.

Total word count:
(Abstract: 280, Introduction: 607, Materials and Methods: 1486, Results: 1172, Discussion: 2695, Acknowledgements: 77)

104 references

Tables: 3, **Figures**: 3

ABSTRACT

In the present work, we investigated intra tree distribution patterns of non-structural carbohydrates (NSC) and non-structural nitrogen compounds (NSNC) concentrations and amounts in 50-year-old sessile oak and beech trees during dormancy (January) and in late spring (June). Mass based concentrations of NSC and NSNC were highest in leaves, twigs and coarse roots compared to stem sapwood and branches. This distribution of C and N mobile compounds reflected the physiological functions of organs, the distribution of living tissues and the proximity to sink tissues at period of intense growth. The contribution of each organ to the entire tree amounts of mobile C and N amounts was primarily determined by its biomass. Thus, stem sapwood and coarse roots contained the highest amounts of NSC as well in winter and late spring. The same distribution was observed for NSNC in winter, however in late spring leaves and current year twigs contained the major pools of NSNC in both species despite their low biomass (5% of total tree biomass). After full leaf expansion in June, NSC and NSNC concentrations were lower in branches and stem sapwood compared to winter. Despite theses slight decreases, high concentrations of NSC and NSNC were maintained in the perennial woody organs of both species and C and N amounts remained comparable between both dates. These findings indicate that trees restore rapidly their C and N balance after spring growth giving that C and N assimilation becomes increasingly important as the season progresses. At the inter-specific level, oak displayed higher NSC and NSNC levels than beech. These differences could be explained by the contrasted physiological functioning of these broadleaved species and different C needs for winter maintenance respiration and radial growth in spring.

INTRODUCTION

Trees with seasonal growth patterns rely on their non-structural carbohydrates (NSC) (Cherbuy et al. 2001) and nitrogen (N) containing compounds (Proe and Millard, 1994) to uncouple growth from carbon (C) and N acquisition throughout the year.

Non-structural carbohydrates (NSC) represent about 10% of total dry matter in adult trees (Barbaroux, 2002) and are constituted essentially of starch and various low molecular sugars (Hoch et al. 2003, Schädel et al. 2009). NSC accumulate in plant tissues at times of surplus C supply, and are remobilized at periods of negative C source-sink balances (Chapin et al. 1990) to fuel maintenance respiration during winter (Ögren, 2000) and to meet the C demand for leaf expansion and shoot growth in spring, especially in deciduous trees (Fischer and Höll, 1991, Kozlowski and Pallardy, 1991). NSC accumulate throughout the tree including leaves, stem, branches, coarse and fine roots (e.g. Hoch et al. 2003, Würth et al. 2005, Palacio et al. 2008, Spann et al. 2008). In deciduous trees, NSC levels increase during summer (Sauter and van Cleve, 1994) and are often at a maximum in late summer/autumn and at a minimum in late spring (e.g. Hoch et al. 2003, Spann et al. 2008).

N containing compounds constitute only a small proportion of the total dry matter of a tree (less then 1%, Kramer and Koslowski, 1979, Sauter et al. 1989) and are constituted essentially of amino acids and proteins (Dickson, 1989). N allocation to storage is programmed seasonally and is, therefore, intimately linked to tree phenology. In temperate deciduous trees, N is withdrawn from senescing leaves in autumn and stored during winter (e.g. Stepien et al. 1994). In early spring, N compounds are remobilized from perennial organs to sustain growth (Titus and Kang, 1982, Millard and Neilsen, 1989, Millard, 1996) particularly when the environmental conditions for N uptake from the soil are not optimal (Murray et al. 1989, Cooke and Weih, 2005). The sites of N storage in trees are restricted to specific organs dependent upon leaf habit. Deciduous species tend to store N in the wood and bark of roots and stem, while evergreen species store N in the youngest age class of foliage. In contrast to NSC pools, all of the N storage pools turn over during periods of N remobilization (Millard and Grelet, 2010 and references therein).

The distribution of C and N non-structural compounds at the tree level has been extensively studied in young trees and seedlings such as pedunculate oak (Vizoso et al. 2008), cork oak (Cerasoli et al. 2004a and 2004b), Corsican pine (Maillard et al. 2004) and beech (Dyckmans and Flessa, 2001, Fotelli et al. 2004). These studies showed that the belowground parts of the tree represented the most important biomass and were major C and N sinks. However, biomass of tree organs increases substantially with age (Bernardo et al. 1997) with aboveground biomass becoming

increasingly important (Bartelink, 1998, Grulke and Retzlaff, 2001), which could result in a different partitioning of C and N compounds in mature trees.

In the present work, we analyzed non-structural carbohydrates (NSC) and non-structural N compounds (NSNC) in 50-year-old sessile oak and beech trees during dormancy and at late spring after full leaf expansion. We aimed to determine: (1) the distribution of NSC and NSNC concentrations and amounts at the tree level (2) their variation between these two phenological key dates (3) and their contribution to tree total C and N pools. For this purpose, oak and beech trees were felled in January and June. Scaling up from mass based concentrations to amounts of C and N compounds was performed through exhaustive sampling and estimation of organ biomass using allometric relations.

MATERIALS AND METHODS

Study sites and stands

The study was conducted in a pure stand of sessile oak [*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.] in the state forest of Champenoux, France (48°44′ N, 6°14′ E, elevation 237 m) and in an almost pure stand of common beech (*Fagus sylvatica* L.) in the state forest of Hesse, France (48°40′ N, 7°05′ E, elevation 300 m), both from natural regeneration and 60 km apart. In 2008, oak and beech trees were 50-55 and 45 year-old, respectively. All the standard climatic variables were measured in weather stations monitored by INRA installed close to the study sites. Global radiation, rainfall, air temperature and humidity, and wind speed were measured every 10s by a data logger (Model CR7 data logger, Campbell Scientific, Courtaboeuf, France) and 30 min averages were calculated and stored. Mean annual temperature was 9.2 °C in both oak and beech stands, whereas mean annual precipitation was 744 and 820 mm, respectively. The oak stand was growing on a cambisol soil, developed on a deep loam (for details see Bréda et al. 1995). The stand was recently thinned, density was 2553 stems ha^{-1}, basal area was 26.7 $m^2.ha^{1}$. The beech stand soil type was intermediate between a cambisol dystric and a luvic cambisol endostagnic (for details see Granier et al. 2000b). Site fertility was high, humus type was oligo-mull in both sites, N content in the upper organic layer (horizon A1) was 2.14 $g.kg^{-1}$ (C/N of 13.5) in oak site and 1.61 $g.kg^{-1}$ (C/N of 14.93) in beech stand. Stand density was 3800 stems ha^{-1}, basal area was 19.6 $m^2.ha^{-1}$. Maximal stand leaf area index (LAI) was in average 3.8 for oak stand and 8.5 for beech stand in 2008 and 2009 as estimated by litter collection during autumn.

Tree sampling

Eight trees per species were harvested during winter dormancy in January 2008 and after full leaf expansion in June 2009 (Table 1). For each harvested tree, samples were taken from different organs: coarse roots, stem, branches, twigs and leaves. Samples discs (5-10 cm longitudinal thickness) were collected from three lateral coarse roots (diameter > 5 mm) over a distance of 15 to 30 cm from the stump. Disk-like samples (2-4 cm longitudinal thickness) were taken from different heights of the stem: 0 m, 1.3 m, 5.6 m (beech) or 7 m (oak) and at the base of the crown. 3 lateral branches were sampled at different heights in the crown. 3 shoots were sampled randomly from tree crown and separated into twigs and leaves. Samples were conserved in carbonic ice in the field then stored at -80° C (-86°C Freezer® Forma Scientific®, Ohio, USA) until freeze-drying (Dura-Top®, Dura-Dry® FTS Systems®, NY, USA). Bark was removed from the inner wood for all the organs (except the twigs). For oak, heartwood was removed from stem sections with a saw. All the samples

were then cut in small pieces with a saw and ground twice to get fine powder (Cyclotec 1093 Sample Mill Tecator, Höganäs, Sweden than with CEPI SODEMI® CB2200, France).

Biomass estimation

Stem biomass was estimated as the product of volume by wood density. Additional disk-like samples were collected at four heights along the stem (0, 1.3, 5.6 or 7m and at the crown base) on which circumference and diameter were measured. Stem volume was then calculated from circumferences and height measurements, with each segment modeled as a truncated cone.

$$V_{tronc} = \sum_{i=1}^{3} \frac{\pi}{12} \times h_i \left(D_i^2 + D_i \times d_i + d_i^2 \right)$$

where h is height of the cone, D the diameter at the base and d the diameter at the top of the cone. Wood density (i.e. dry weight divided by the fresh volume) was determined by Barbaroux et al. (2003) on trees from the same stands. For oak trees, sapwood volume was estimated from sapwood width measurements for each stem section. By contrast, for beech, we assumed that all the wood was sapwood even if diffuse cell mortality was observed close to the pith (Ceschia, 2001). Biomass of coarse roots, branches and twigs were estimated using allometric relations depending on the circumference and the diameter at breast height.

Biomass of branches was determined using the following equations:

For sessile oak, $Branch_{kg} = 1.69 \times C130_{cm} - 76.64$ (Barbaroux, 2002),

For beech, $Ln\,Branch_{kg} = -10.0621 + 3.3280 \times Ln\,C130_{cm}$ (Ottorini and Le Goff, 1998).

Biomass of coarse roots was determined using the following equations:

For sessile oak, $Coarseroots_{kg} = 0.0099 \times D130_{cm}^2 - 1.551$ (Drexhage et al. 1999),

For beech, $Ln\,Coarseroots_{kg} = -6.7275 + 2.5382 \times Ln\,C130_{cm}$ (Ottorini and Le Goff, 1998).

Biomass of twigs was determined using the following equations (C. Nys, personal communication):

For sessile oak, $Twigs_{kg} = 1.6778 \times \exp^{0.0025 \times C130_{mm}}$

For beech, $Twigs_{kg} = -0.00000002263 \times C130_{cm}^3 + 0.00002735 \times C130_{cm}^2 + 0.004502 \times C130_{cm}$

Foliage of trees felled in June 2009 was removed physically, separated in bags and oven-dried (48h; 50°C) to determine total leaf dry weight per tree.

Biochemical analyses

Non-structural carbohydrates (NSC) analyses

NSC were extracted from 20 mg of fine dry powder of each sample with 1 mL of 70% (v/v) methanol/ water for 10 min, and then centrifuged at 17 000 g for 5 min at 4°C. This step was repeated twice and the resulting supernatants were pooled together. The pellet was retained for starch analysis later and the supernatants, containing soluble sugars, were dried over night with a vacuum evaporator (Maxi-Dry Plus; Hetomodel DW1, 0-110, Heto-HOLTEN A/S Allerod, Denmark) to eliminate methanol. Dried extract were rehydrated in 1.5 mL of distilled water and redissolved by sonication then filtered at 0.2 µm (Acrodisc® Supor® filter; 0.2µm, VWR).

Soluble sugars concentration was determined on 30 µL of undiluted aliquots from the soluble fraction that were injected into a high-pressure liquid chromatography HPLC system (Gold®Beckman Coulter, Software 32 karat™). Soluble sugars separation was achieved on a HyperRez XP Carbohydrate Pb^{2+} separation column (8µm 300 x 7.7 mm, Thermo Electron, France) fitted with a precolumn (HyperRez Pb2+ 5 x 3 mm, Thermo Electron, France).p The flow rate was maintained at 0.6 mL min^{-1}, the pressure between 1 and 1.5 Pa and the column temperature at 83°C. Individual carbohydrates were eluted from 0 to 30 min after injection. The sugar peaks were detected by light scattering (Sedex 45 ELSD system, Seder, Vitry sur Seine, France). Peak identification was determined with retention time of commercial carbohydrate standards. Sucrose, glucose, fructose and mannose were the main detected sugars. Sugar concentrations were determined by peak height and standard calibrations.

Starch concentration was determined on the pellet by hydrolysis with 0.02N NaOH for 30 min at 100°C followed by digestion with amyloglucosidase (from *Aspergillus niger*, EC 232-877-2, Sigma Aldrich, France) for 30 min at 50°C in order to hydrolyze starch into glucose molecules. Glucose was quantified by colorimetry at 620 nm (spectrophotometer UV-visible DU 640 B, Beckman Coulter, USA) as described by Hansen and Möller (1975) with glucose as standard.

Non-structural carbohydrates (NSC) were calculated as the sum of soluble sugars and starch. NSC concentrations were expressed on a percentage dry matter basis (% DM).

Non-structural nitrogen compounds (NSNC) analyses

Soluble proteins were extracted by mixing 20 to 40 mg of dry fine powder with 500 µL of SDS extraction buffer [62.5 mM Tris HCl pH 6.8, 2 % (v/v) SDS, 10 % Glycerol and 28 mM DTT] in a micro-tube, using a balk crusher (Retsch MM 301, Gmbh & Co, Germany) for two times during 45 seconds. Samples were centrifuged twice at 32 000 g for 20 min (17°C). Proteins concentrations were determined on 25 µL of the supernatant by RC-DC Protein assay (Biorad RC DC Protein Assay 500-0121).

Total amino acid concentration was determined on an aliquot of 25 to 50 µL of the soluble fraction (see above) by colorimetry at 570 nm (spectrophotometer UV-visible DU 640 B, Beckman Coulter, USA) as described by Yemm and Cocking (1955) using ninhydrin, with leucine as standard.

Nitrates concentration was determined on an aliquot of 100 µL of the soluble fraction by colorimetry at 410 nm (spectrophotometer UV-visible DU 640 B, Beckman Coulter, USA) as described by Cataldo et al. (1975).

Non-structural nitrogen compounds (NSNC) were calculated as the sum of total soluble proteins, amino acids and nitrate. NSNC concentrations were expressed on a percentage dry matter basis (% DM).

Non-structural C and N amounts

Amounts of NSC and NSNC of each organ were calculated through the product of organ biomass by the corresponding compound concentration. NSC (including starch and soluble sugars) were expressed in glucose equivalents and converted to carbon mass (gC) by applying a 40% carbon content in glucose. NSNC were converted to nitrogen mass (gN) taking into account N content of proteins (0.23 gN. g^{-1} proteins, Yeoh and Wee, 1994), amino acids (0.13 gN. g^{-1} amino acids, Valenzuela Nunez, 2006) and nitrate (0.23 gN. g^{-1} nitrate, MW (NO_3): 62 and 1N mole per NO_3).

Statistics

Data were analyzed by the General Linear Model procedure (Statistica 6.1). NSC and NSNC concentrations and amounts were studied with different sources of variation: species (including site) date and organ. For each organ separately, the effect of date and species on NSC and NSNC concentrations and amounts was studied. Statistically significant differences of inter-organ NSC and NSNC distribution were tested with Tuckey honestly significant differences (HSD) at $P < 0.05$.

RESULTS

NSC and NSNC concentrations

In Oak, NSC concentrations ranged between 4.57 and 13.42% DM in January and between 3.83 and 16.43% DM in June. In beech, NSC concentrations ranged between 2.81 and 9.64% DM in January and between 2.86 and 16.17% DM in June. In both species, NSC concentrations were highest in coarse roots and twigs in January followed by branches then stem sapwood (Table 2). In June, leaves displayed the highest NSC concentrations. NSC concentrations were lower in branches (p = 0.000) of oak in June compared to January but did not change in the other organs (Table 2). In beech, both coarse roots (p = 0.01) and branches (p = 0.03) displayed lower NSC concentrations in June compared to January resulting predominantly from lower sugar concentrations (Table 2).

The composition of NSC was different between January and June in all the woody organs (coarse roots, stem sapwood and branches) and in young organs (twigs and leaves) of both species (Table 2). Thus in January, soluble sugars accounted in average for 43% of total NSC in the woody organs and starch accounted for 57%. In June, starch fraction increased to 71% of total NSC and soluble sugars decreased to 29% in the woody organs of both species. In twigs and leaves, high NSC concentrations at the two sampling dates resulted from high soluble sugars concentrations (70% of total NSC in January and 60% in June, Table 2).

In oak, NSNC concentrations ranged between 0.68 and 3.49% DM in January and between 0.33 and 5.77% DM in June. In beech, NSNC concentrations ranged between 0.44 and 1.12% DM in January and between 0.27 and 8.59% DM in June. In both species, the highest NSNC concentrations in January were found in twigs followed by coarse roots then by branches and stem sapwood (Table 3). In June, leaves displayed the highest NSNC concentrations. NSNC were significantly lower in stem sapwood (p = 0.000) and branches (p = 0.001) of oak in June compared to January and tended to be lower in coarse roots (p = 0.07, Table 3). In beech, NSNC concentrations were lower in stem sapwood (p = 0.000) and branches (p = 0.000) in June compared to January whereas they did not change in coarse roots (Table 3).

As for NSC, the composition of NSNC fraction differed between dates in woody and young organs of both species (Table 3). Thus in January, amino acids accounted for 72 and 64% of total NSNC and soluble proteins accounted for 22 and 30% of total NSNC in the woody organs of oak and beech, respectively. In June, amino acids fraction decreased to 57% and soluble proteins fraction increased to 35% in both species. In young organs (twigs and leaves), soluble proteins concentrations accounted for 78 and 49% of NSNC in oak and beech respectively in January, and for 79 and 63% respectively in June (Table 3). Nitrate fraction was fairly low and accounted for 7%

of total NSNC in woody organs and for 10% in average in young organs of both species in January and June.

Organ biomass estimation

The distribution of tree biomass between the different organs of oak and beech trees was reported in Figure 1. Biomass estimation of all woody organs was restricted to wood, and bark was excluded. Stem represented the highest biomass at the tree level in both species and accounted for 69 and 62% of total estimated biomass in oak and beech respectively. In oak, sapwood accounted for 46% of total stem, and represented 32% of total estimated biomass, while in beech all stem was constituted of sapwood. Coarse roots represented 15% and 18% and branches represented 12% and 16% of total estimated biomass, in oak and beech respectively. Twigs and leaves represented the lowest biomass in both species and accounted for 3% and 2% of total estimated biomass respectively.

NSC and NSNC amounts

At the tree level in oak, NSC pool was 6397 gC in January and 5929 gC in June (p = 0.7). In January, NSC amounts were distributed as follows: coarse roots (42%) then to the same extent stem sapwood (28%) and branches (22%), then twigs (8%). In June, coarse roots contained also the highest NSC amounts (45%) followed by stem sapwood (29%), then to the same extent by branches (10%), twigs (9%) and leaves (7%, Figure 2). NSC amounts were lower in branches compared to January (p = 0.04) and did not change in the other organs. In beech, NSC pool at the tree level was 3557 gC in January and 3911 gC in June (p = 0.3). The distribution of NSC amounts at the tree level was similar at both date, thus stem sapwood contained the highest NSC amounts (47%) followed by coarse roots (24%) then by branches (18%), twigs (7%) and leaves (10%, Figure 2). NSC amounts of the different organs did not change between January and June. At the tree level, NSC pool represented only 7 and 3% of total C pool in oak and beech respectively. Total C amounts were distributed similarly to NSC between tree organs in both species at the two sampling dates. In beech, the distribution of total C amounts was similar to that of NSC, thus highest amounts of NSC and total C were found in stem sapwood. In oak, stem sapwood contained the highest amounts of total C whereas the highest NSC amounts were found in coarse roots (Figure 2). In both species, total C amounts did not change between January and June (p = 0.871 for oak and p = 0.291 for beech).

At the tree level in oak, NSNC pool was 351 gN in January and 349 gN in June (p = 0.9). In January, NSNC amounts were distributed as follows: coarse roots (31%) and stem sapwood (33%)

then twigs (21%) and branches (15%, Figure 3). In June, NSNC amounts were not statistically different between organs. Thus coarse roots, leaves and twigs contained comparable NSNC amounts (24% each) as stem sapwood and branches (18% and 9% respectively). NSNC amounts in the stem were lower in June ($p = 0.05$) compared to January and did not change in the other organs.

In beech, tree NSNC pool was 224 gN in January and 309 gN in June ($p = 0.053$). In January, NSNC amounts were distributed as follows: stem sapwood (57%), coarse roots (22%), branches (15%) and twigs (6%, Figure 3). In June, leaves contained the highest NSNC amounts (38%) followed by coarse roots (22%) and stem sapwood (23%), then by branches (10%) and twigs (8%). Among tree organs, only stem sapwood showed a decrease tendency ($p = 0.06$) in NSNC amounts in June compared to January. At the tree level, NSNC pools represented about 67 and 52% of total N pool in oak and beech respectively. At the two sampling dates, total N amounts were distributed similarly to NSNC between tree organs in both species (Figure 3). In both species, total N amounts did not change between January and June ($p = 0.395$ for oak and $p = 0.077$ for beech).

DISCUSSION

NSC and NSNC distribution at the tree level

NSC and NSNC concentrations exhibited similar intra tree distribution patterns in 50-year-old sessile oak and beech. Coarse roots and twigs displayed higher NSC and NSNC concentrations compared to stem sapwood and branches in winter and late spring. This distribution agrees with results obtained for non-structural carbohydrates (Kramer and Kozlowski, 1979, Bollmark et al. 1999, Barbaroux et al. 2003), soluble proteins (Sauter et al. 1989, Valenzuela Nunez, 2006) and total N distribution in adult trees (Regina, 2000a and 200b, Harrison et al. 2000, Noh et al. 2007 and 2010). Differences in NSC and NSNC concentrations among tree organs could be explained by the physiological function, wood anatomy and living parenchyma distribution and distance to sink tissues at times of active growth.

During the leafy period, leaves are undoubtedly the richest organ in NSC and NSNC concentrations at the tree level given their paramount role in photosynthesis (Kramer and Kozlowski, 1979). Among perennial organs, twigs display important concentrations of NSC and NSNC. In fact, twigs are considered to be the smallest functional unit at the tree level, they are C autonomous and could be net C exporters at times of high C demand such as spring growth and masting events (Sauter et al. 1989, Hoch, 2005). Bark tissues of twigs contain high protein concentrations (Tromp and Ovaa, 1971, Gomez and Faurobert, 2002) presumably because of the presence of more protein-filled vacuoles compared to wood (Stepien et al. 1994) and because it is advantageous for trees to accumulate N in twig chlorenchyma during restricted growth periods which allows internal re-fixation of CO_2 released by mitochondrial activity through winter (Wittmann et al. 2001) and immediate C and N gain when environmental conditions are optimal (Gulmon, 1983, Pfanz et al. 2002). High concentrations of mobile C and N compounds in the upper part of the tree, near sink tissues, can be advantageous for fast reserve utilization during spring growth (Barbaroux et al. 2003). Among woody organs, roots are major sites of C (*e.g.* Bollmark et al. 1999, Regier et al. 2010) and N storage (Millard and Proe, 1991) at the tree level. In 20-year-old pedunculate oak, roots contained the highest concentrations of NSC and NSNC (Valenzuela Nunez, 2006). Higher concentrations in coarse roots compared to stem sapwood could be related to cambial aging in stem (Helinska-Raczkowska, 1994) which results in an increase of vessel formation to the detriment of parenchyma cells (Gäumann, 1935, Tromp, 1983), as demonstrated in beech (Vollenweider et al. 1994) and in oak trees (Helinska-Raczkowska, 1994).

The contribution of mobile C and N amounts of each organ to the entire tree pool is primarily determined by organ biomass (Kozlowski, 1992). Owing to the large biomass of woody organs, small NSC and NSNC concentrations would result in important amounts (Silla and Escudero, 2003). Thus, in mature trees, aboveground wood biomass contains most of the reserve amounts even if reserves are more concentrated in the belowground parts (Kozlowski, 1992, Bollmark et al. 1999) or in the younger parts such as twigs and leaves (Sauter et al. 1989, Palacio et al. 2007). In this study, we did not consider bark tissues of the woody organs. Even if the concentrations of C and N compounds are higher in bark tissues compared to wood, the total amount of reserve material is greater in wood than in bark (Kramer and Kozlowski, 1979). Furthermore, Barbaroux et al. (2003) showed that bark contributed weakly to total NSC amounts compared to wood in oak and beech trees from the same stands, and we assumed that it goes as well for NSNC, as demonstrated for total N in *Pinus densiflora* (Noh et al. 2010).

During winter, high amounts of NSC and NSNC accumulate in the perennial organs of deciduous trees (Kramer and Kozlowski, 1979, Hoch et al. 2003, Millard and Grelet, 2010). Thus, 53% of NSC and NSNC pools were in the stem sapwood of beech. In oak, 30% of tree NSC and NSNC pools were in the stem sapwood and 36% in coarse roots. Our results concerning the distribution of C and N mobile pools at the tree level are in line with other studies on mature trees. In adult trees, stem is the main biomass sink (Bartelink, 1998, Grulke and Retzlaff, 2001) and accumulates the highest amounts of C (Iivonen et al. 2002, Barbaroux et al. 2003) and N (Regina, 2000a and 2000b). In 30-year-old beech trees from the same stand (Hesse site), stem was considered the major C sink at the tree level (Lebaube et al. 2000). In 80-year-old oak and beech stands, 63.9% of the C was stored in stem (Vand wall et al. 2001). Furthermore in adult trees, roots become increasingly important for C and N storage (Ludovici et al. 2002, Barbaroux et al. 2003, Sanchez et al. 1991). Biomass of tree organs increases substantially with age (Bernardo et al. 1997), thus the contribution of stem and roots to total tree biomass becomes increasingly important (Noh et al. 2010) and by consequence their contribution to tree C and N pools increases considerably.

In late spring, the distribution of NSNC amounts was different from that of NSC, as observed for the Japanese red pine (Noh et al. 2010). In oak, 45% of tree NSC pool was in coarse roots, while in beech, 46% of tree NSC pool was in stem sapwood. In both species, only 9% of total tree NSC pool was in leaves. By contrast, leaves and current year twigs were major sites of N accumulation (Helmisaari, 1992, Millard, 1996) accounting for about 50% of tree NSNC pools in oak and beech, even if their biomass represented only 5% of total tree biomass. About 80% of NSNC were in protein form in leaves, for which Rubisco represents at least half of total protein content (Kang and Titus, 1982). Rubisco can be considered an unconventional storage protein by virtue of its

contribution to N reserve formation during the summer months then N recycling during autumn (Chapin et al. 1990, Cooke and Weih, 2005, Millard et al. 2007). Thus, Rubisco can temporarily store a significant proportion of N that is used subsequently for leaf growth. For deciduous species in temperate ecosystems, this constitutes a sink for sustained N uptake in summer, once leaf growth has finished, continuing into autumn while leaves senesce (Millard and Thomson, 1989). At the stand level, foliage N (Noh et al. 2010) is also of a great qualitative importance since leaves are subject to internal annual cycles and eventually a considerable proportion of N returns to the soil in leaf litter (Regina, 2000a).

NSC and NSNC amounts were higher in oak compared to beech at the two sampling dates resulting essentially from higher concentrations in oak twigs and woody organs compared to beech. NSC pools were in average 18 and 14 times higher than NSNC pools in oak and beech respectively. These results are in agreement with the constitution of dry matter in adult trees (10% of NSC and less than 1% of NSNC, Barbaroux, 2002, Kramer and Koslowski, 1979). Furthermore, tree NSC amounts represented less than 10% of total tree N pool in both species; whereas mobile N amounts accounted for more than 50% of tree total N, suggesting that less N is incorporated in structural form, conversely to C which represents the most important biomass sink in trees (Plomion, et al. 2001).

NSC and NSNC variation between winter and late spring

In January when air temperatures were near zero (data not shown), the proportion of soluble sugars was high among the NSC fraction in the woody organs of both species. In temperate climates, soluble sugars concentrations reach their highest levels during the coldest period, e.g. between December and January as shown for sugar maple (Wong et al. 2003) and for trees from the same stands (paper 1). This massive accumulation of cellular sugars in over-wintering organs results from starch-to-sugar conversion and contributes strongly to cold-hardiness as a response to increasing cold temperatures (Kramer and Kozlowski, 1979, Piispanen and Saranpää, 2001). Soluble sugars act as osmo-regulating substances that avoid intracellular ice formation by decreasing the freezing point of tissues, thus reducing the damage from cold temperatures (Thomas et al. 2004, Morin et al. 2007, Repo et al. 2008). The large pool of sugars in wood tissues during dormancy could be also consumed in the maintenance respiration of living cells (Kramer and Kozlowski, 1979, Ögren, 2000). N was stored mainly as amino acids in the woody organs of both species, except for the stem sapwood of beech that stored preferentially proteins. In terms of carbon cost, storing N in free amino acids is more efficient than storing N in proteins and presents a readily available source of N when growth resumes in the spring (Cheng et al. 2004). Whether proteins or

amino acids dominate in the storage pool remains controversial and seems to vary according to storage tissue and species. In many species, roots stored preferentially amino acids, whereas stem and bark stored proteins (Tromp, 1983, Bollmark et al. 1999, Marmann et al. 1997). In pedunculate oak trees, amino acids concentrations were 2 to 4 times higher compared to those of soluble proteins (Valenzuela Nunez, 2006). In fruit trees (e.g. apple and pear), up to 50% of N was stored as amino acids (Cheng et al. 2004).

In late spring, the composition of NSC fraction changed in all the woody organs, thus starch represented a higher fraction of NSC (77%) compared to that of sugars (24%). Levels of soluble sugars decline at the end of dormancy concomitantly to an increase in starch levels prior to spring remobilization, then as soon as carbon supply exceeds growth needs starch starts to accumulate concomitantly to radial growth illustrating C reserves refilling (Chapin et al. 1990, Lacointe et al. 1993, paper 1). In June when leaves were fully expanded in both species, we observed lower NSC concentrations in branches (both species) and in coarse roots of beech compared to January (storage period), while NSC concentrations remained unchanged in the stem sapwood. Nevertheless, we did not observe any C-shortage in the woody organs of both species as reported for temperate species at periods of maximum growth and high C demand in spring and early summer that may exceed C supply by photosynthesis (Hoch et al. 2003). Two hypotheses could explain our results:

i) Developing leaves of deciduous tree species are able to fix C at the early phases of growth, which suggests a rapid sink–source transition (Keel and Schädel, 2010). Thus, leaf development seems to rely on C reserves only for a short duration, which might explain why NSC levels rarely show a strong decrease even during phases of high C demand (Körner, 2003).

ii) The lowest concentrations of NSC were usually measured shortly after bud burst (i.e. 10 days in beech branches), then increased again to reach the same concentrations as before bud burst within about 7 weeks (Schädel et al. 2009). Given this rapid replenishment of NSC after leaf bud burst, the decrease in NSC concentrations can only be captured by sampling in short intervals during bud burst, especially in aboveground organs such as branches and stem. Furthermore, there is increasing evidence that in mature trees, decreases of NSC concentrations seem to be restricted to terminal branches and do not translate to stem or roots (Newell et al. 2002).

By contrast to NSC, NSNC concentrations were lower in all woody organs of oak and beech (except for coarse roots in beech) in June resulting from lower amino acids concentrations in most of the organs, and lower proteins concentrations in the stem sapwood of beech and in the branches of oak. In spring, the environmental conditions for N uptake from the soil are not optimal (Murray et al. 1989, Cooke and Weih, 2005), as a result the immediate demand for N for early growth is met by reserves remobilization (Millard, 1996, paper 2) such as amino acids (Kang et al. 1982) and

specific storage proteins (Wetzel and Greenwood, 1989, paper 1). Amino acids are preferentially mobilized for spring growth in many species (e.g. Tromp, 1983, Gomez and Faurobert, 2002). In pedunculate oak, both proteins and amino acids levels were lower in June (Valenzuela Nunez, 2006). Moreover, nitrogen translocation to growing tissues is a very fast process, with a time span of no more than 2 weeks (e.g. oak species, Silla and Escudero, 2003, paper 2). So with N uptake from soil becoming increasingly important as the season progresses (Neilsen et al. 1997, paper 2), stored N contribution to spring growth becomes less important and N stores are replenished. As a consequence, decreases in N pool could be more pronounced during bud burst and less afterward. In a recent study (paper 2), we found that in oak trees from the same stand, N reserves contributed to about 90% of total N in developing leaves during the first two weeks of bud burst, then N uptake from the soil became significantly important when bud burst was achieved (first week of May, 2009). These results suggest that trees depend on their N reserves during early stages of spring growth then N source switches from predominantly internal N remobilization to root uptake (Millard and Proe, 1991, Grassi et al. 2002).

Inter-specific comparison

We found higher concentrations and amounts of NSC and NSNC in oak compared to beech, these differences in reserves level could arise from differential needs for spring growth and winter maintenance respiration. In oak, a ring porous species, most of the wood vessels are embolized by frost events each winter, as a consequence radial growth is initiated prior to bud burst in order to restore the hydraulic conductance (Hinckley and Lassoie, 1981, Bréda and Granier, 1996, Barbaroux and Bréda, 2002). Thus, carbohydrate reserves are necessary to sustain early growth and seem to be a key factor for tree maintenance and survival and carbon allocation to storage is higher than for beech (Genet et al. 2010). Beech is a diffuse-porous species with small xylem vessels that are less vulnerable to winter embolism. Thus, radial growth is initiated after bud burst and wood construction cost could be entirely supplied by new assimilates (Barbaroux and Bréda 2002). Furthermore, C costs for maintenance respiration and growth (including biomass and respiration) were lower in beech compared to oak as estimated by Barbaroux et al. (2003). These results are supported by the fact that the basal respiration rate of sapwood tissues are higher in oak stem than in beech (Edwards and Hanson, 1996, Damesin et al. 2002), and it seems that maintenance respiration is lower in diffuse porous species compared to rings porous (Höll, 1997, Edwards and Hanson, 1996). With early wood growth being less dependent on reserve amounts and with lower C costs during winter and spring in beech, C reserve pool might be lower than for sessile oak. NSNC concentrations as well as total N (data not shown) were higher in oak stem sapwood compared to

beech. Higher N content in oak tissues could contribute to its higher maintenance respiration as for C content. In plant tissues, maintenance respiration increases linearly with N concentrations in stem and branches (Ryan, 1991 and 1995, Maier et al. 1998). Most of N in plant tissue is in protein, therefore the close relationship between maintenance respiration and nitrogen is due to increases in protein content and protein turnover rates which are tightly linked with cellular activity (Ryan et al. 1996). By contrast, at the foliage level, we found higher total N (data not shown) and protein concentrations in beech compared to oak. Foliar nitrogen concentrations are correlated with photosynthetic rates (Field and Mooney, 1986, Reich et al. 1995), suggesting that species with high foliar nitrogen concentrations may possess a competitive advantage (Martin et al. 1998). Furthermore, species with high foliage nitrogen concentrations but low branch and stem wood nitrogen concentrations possess an allocation pattern that may lead to high photosynthates production as well as low cellular maintenance respiration, thereby allowing trees to maximize carbon gain (Martin et al. 1998). Such results are not surprising since beech (*Fagus sylvatica* L.) is one of the most competitive tree species in competition with oak in central Europe (Ellenberg, 1996, Backes and Leuschner, 2000).

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to F. Gérémia for his contribution in tree sampling and to P. Riveron for his help in sample grinding and preparation. We are also thankful for J. Marchand for HPLC analysis. Rana El Zein received a PhD grant from French Ministry for Higher Education and Research. Research funding was supported by the General Directorate of Forest and Rural Affairs (DGFAR) and the French National Research Agency (ANR) in the frame of DRYADE project (ANR-06-VULN-004).

REFERENCES

Backes, K. and C. Leuschner. 2000. Leaf water relations of competitive *Fagus sylvatica* and *Quercus petreae* trees during 4 years differing in soil drought. Can. J. For. Res. 30: 335-346

Barbaroux, C. 2002. Analyse et modélisation des flux de carbone de peuplements forestiers pour la compréhension de la croissance de deux espèces feuillues *Quercus petraea* et *Fagus sylvatica*. PhD thesis, Paris-Sud University, Orsay, France, 182 p.

Barbaroux, C. and N. Bréda. 2002. Contrasting distribution and seasonal dynamics of carbohydrate reserves in stem wood of adult ring-porous sessile oak and diffuse-porous beech trees. Tree Physiol. 22: 1201-1210.

Barbaroux, C., N. Bréda and E. Dufrêne. 2003. Distribution of above-ground and below-ground carbohydrate reserves in adult trees of two contrasting broad-leaved species (*Quercus petraea* and *Fagus sylvatica*). New Phytol. 157: 605-615.

Bartelink, H.H. 1998. A model of dry matter partitioning in trees. Tree Physiol. 18: 91-101.

Bernardo, A.L., M.G.F. Reis, G.G. Reis, R.B. Harrison and D.J. Firme, 1997. Effect of spacing on growth and biomass distribution in Eucalyptus camaldulensis. For. Ecol. Manage. 104: 1-13.

Bollmark, L., L. Sennerby-Forsse and T. Ericsson. 1999. Seasonal dynamics and effects of nitrogen supply rate on nitrogen and carbohydrate reserves in cutting derived *Salix viminalis* plants. Can. J. For. Res. 29: 85-94.

Bréda, N. and A. Granier. 1996. Intra and interannual variations of transpiration, leaf area index and radial growth of a sessile oak stand (*Quercus petraea*). Ann. Sci. For. 53: 521-536.

Bréda, N., A. Granier, F. Barataud and C. Moyne. 1995. Soil water dynamics in an oak stand. I. Soil moisture, water potential and water uptake by roots. Plant Soil. 172: 17-27.

Cataldo, D.A., M. Haroon, L.E. Schrader and V.L. Youngs. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Com. Soil Sci. Plant Anal. 6: 71-80.

Cerasoli, S., P. Maillard, A. Scartazza, E. Brugnoli, M.M. Chaves and J.S. Pereira. 2004a. Carbon and nitrogen winter storage and remobilisation during seasonal flush growth in two-year-old cork oak (*Quercus suber* L.) saplings. Ann. For. Sci. 61: 721-729.

Cerasoli, S., A. Scartazza, E. Brugnoli, M.M. Chaves and J.S. Pereira. 2004b. Effects of partial defoliation on carbon and nitrogen partitioning and photosynthetic carbon uptake by two-year-old cork oak (*Quercus suber*) saplings. Tree Physiol. 24: 83-90.

Ceschia, E. 2001. Environmental effects on spatial and seasonal variations of stem respiration in European Beech and Norway Spruce. Acta Universitatis Agriculturae Sueciae (Silvestria) 219 p.

Chapin, F.S., E.D. Schulze and H.A. Mooney. 1990. The ecology and economics of storage in plants. Annu. Rev. Ecol. Syst. 21: 423-447.

Cheng, L. and L.H. Fuchigami. 2002. Growth of young apple trees in relation to nitrogen and carbohydrates. Tree Physiol. 22: 1297-1303.

Cherbury, B., R. Joffre, D. Gillon and S. Rambal. 2001. Internal remobilization of carbohydrates, lipids, nitrogen and phosphorus in the Mediterranean evergreen oak *Quercus ilex*. Tree Physiol. 21: 9-17.

Cooke, J.E.K. and M. Weih. 2005. Nitrogen storage and seasonal nitrogen cycling in *Populus*: bridging molecular physiology and ecophysiology. New Phytol. 167: 19-30.

Damesin C, E. Ceschia, N. Le Goff, J.M. Ottorini and E. Dufrêne. 2002. Stem and branch respiration of beech: from tree measurements to estimations at the stand level. New Phytol. 153: 159-172.

Dickson, R.E. 1989. Carbon and nitrogen allocation in trees. Ann. Sci. For. 46: 631-647.

Drexhage, M., M. Chauvière, F. Colin and C.N.N. Nielsen. 1999. Development of structural root architecture and allometry of *Quercus petraea*. Can. J. For. Res. 29: 600-608.

Dyckmans, J. and H. Flessa. 2001. Influence of tree internal N status on uptake and translocation of C and N in beech: a dual 13C and 15N labeling approach. Tree Physiol. 21: 395-401.

Edwards, N.T. and P.J. Hanson. 1996. Stem respiration in a closed-canopy upland oak forest. Tree Physiol. 16: 433-439.

Ellenberg, H. 1996. Vegetation Mitteleuropas mit den Alpen. 5th Ed., Ulmer, Stuttgart, Germany.

Field, C. and H.A. Mooney. 1986. The photosynthesis–nitrogen relationships in wild plants. *In* On the economy of plant form and function. T. Givnish. Cambridge University Press, New York. p. 25-55.

Fischer, C. and W. Höll. 1991. Food reserves of scots pine (*Pinus sylvestris* L.). 1. Seasonal changes in the carbohydrate and fat reserves of pine needles. Trees Struct. Func. 5: 187-195.

Fotelli, M.N., M. Rienks, H. Rennenberg and A. Gessler. 2004. Climate and forest management affect ^{15}N-uptake, N balance and biomass of European beech seedlings. Trees. 18: 157-166.

Gäumann, E. 1935. Der Stoffhaushalt der Buche (*Fagus sylvatica* L.) im Laufe eines Jahres. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 44: 157-334.

Genet, H., N. Bréda and E. Dufrene. 2010. Age-related variation in carbon allocation at tree level and stand scales in beech (*Fagus sylvatica*) and sessile oak (*Quercus petreae* (Matt.) Liebl.) using a chronosequence approach. Tree Physiol. 30: 177-192.

Gomez, L. and M. Faurobert. 2002. Contribution of vegetative storage proteins to seasonal nitrogen variations in the young shoots of peach trees (*Prunus persica* L. Batsch.). J. Exp. Bot. 379: 2431-2439.

Granier, A., E. Ceschia, C. Damesin. E. Dufrêne, D. Eprin, P. Gross, S. Lebaube, V. Le Dantec, N. Le Goff. D. Lemoine, E. Lucot, J.M. Ottorini, Y. Pontailler and B. Saugier. 2000b. The carbon balance of a young Beech forest. Funct. Ecol. 14: 312-325.

Grassi, G., P. Millard, R. Wendler, G. Minotta and M. Tagliavini. 2002. Measurement of xylem sap amino acid concentrations in conjunction with whole tree transpiration estimates spring N remobilization by cherry (*Prunus avium* L.) trees. Plant Cell Environ. 25: 1689-1699.

Grulke, N.E. and W.A. Retzlaff. 2001. Changes in physiological attributes of ponderosa pine from seedling to mature tree. Tree Physiol. 21: 275-286.

Gulmon, S. L. 1983. Carbon and nitrogen economy of *Diplacus aurantiacus*, a Californian Mediterranean-climate drought-deciduous shrub. *In* Mediterranean-Type Ecosystems. The Role of Nutrients. Eds. F.J. Kruger, D.T. Mitchell and J.U.M. Jarvis. Berlin: Springer-Verlag, p.167-176.

Hansen, J. and I. Moller. 1975. Percolation of starch and soluble carbohydrates from plant tissue for quantitative determination with anthrone. Anal. Biochem. 68: 87-94.

Harisson, R.B., G.G. Reis, M.D.G.F. Reis, A.L. Bernardo and D.J. Firme. 2000. Effect of spacing and age on nitrogen and phosphorus distribution in biomass of *Eucalyptus camaldulensis*,

Eucalyptus pellita and *Eucalyptus urophylla* plantations in southeastern Brazil. For. Ecol. Manage. 133 : 167-177.

Helinska-Raczkowska L. 1994. Variation of vessel lumen diameter in radial direction as an indication of the juvenile wood growth in oak (*Quercus petraea* Liebl). Ann. For. Sci. 51: 283-290.

Helmisaari, H.S. 1992. Nutrient retranslocation in three *Pinus sylvestris* stands. For. Ecol. Manage. 51: 347–367.

Hinckley, T.M. and J.P. Lassoie. 1981. Radial growth in conifers and deciduous trees: a comparaison. Mitt. Forstl. Bundesversanst. Wien. 142: 17-56.

Hoch, G. 2005. Fruit-bearing branchlets are carbon autonomous in mature broad-leaved temperate forest trees. Plant Cell Environ. 28: 651-659.

Hoch, G., A. Richter and C. Korner. 2003. Non-structural carbon compounds in temperate forest trees. Plant Cell Environ. 26: 1067-1081.

Höll, W. 1997. Storage and mobilization of carbohydrates and lipids. *In* Trees Contributions to Modern Tree Physiology. *Eds.* H. Rennenberg, W. Eschrich and H. Ziegler. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, pp 197-211.

Iivonen, S., S. Kaakinen, A. Jolkkonen, E. Vapaavuori and S. Linder. 2006. Influence of long-term nutrient optimization on biomass, carbon and nitrogen acquisition and allocation in Norway spruce. Can. J. For. Res. 36: 1563-1571.

Kang, S.M., K.C. Ko and J.S. Titus. 1982. Mobilization and metabolism of protein and soluble nitrogen during spring growth of apple trees. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 107: 209-213.

Keel, S.G. and C. Schädel. 2010. Expanding leaves of mature deciduous forest trees rapidly become autotrophic. Tree Physiol. 30: 1253-1259.

Körner, C. 2003. Carbon limitation in trees. J. Ecol. 91: 4-17.

Kozlowski, T.T. 1992. Carbohydrate sources and sinks in woody plants. Bot. Rev. 58: 107-222.

Kozlowski, T.T. and S.G. Pallardy. 1991. Physiology of woody plants. 2nd Ed. Academic Press, San Diego.

Kramer, P.J. and T.T. Kozlowski. 1979. Physiology of woody plants. Academic Press, London, 811 p.

Lacointe, A., A. Kajji, F.A. Daudet, P. Archer and J.S. Frossard. 1993. Mobilization of carbon reserves in young walnut trees. *In* Cambium, Production de Bois et Développement de l'Arbre. *Eds*. A.M. Catesson and S. Lachaud. Acta Bot. Gall. 140: 435-441.

Lebaube, S., N. Le Goff, J.M. Ottorini and A. Granier. 2000. Carbon balance and tree growth in a Fagus sylvatica stand. Ann. For. Sci. 57: 49-61.

Ludovici K.H., H.L. Allen, T. J. Albaugh and P.M. Dougherty. 2002. The influence of nutrient and water availability on carbohydrate storage in loblolly pine. For. Ecol. Manage. 159: 261-270.

Maier, C.A., S.J. Zarnoch and P.M. Dougherty. 1998. Effects of temperature and tissue nitrogen on dormant season stem and branch maintenance respiration in a young loblolly pine (*Pinus taeda*) plantation. Tree Physiol. 18: 11-20.

Maillard, P., D. Garriou, E. Deléens, P. Gross and J.M. Guehl. 2004. The effects of lifting on mobilization and new assimilation of C and N during regrowth of transplanted Corsican pine seedlings. A dual 13C and 15N labelling approach. Ann. For. Sci. 61: 795-805.

Marmann P., R. Wendler, P. Millard and H. Heilmeier. 1997. Nitrogen storage and remobilisation in ash (*Fraxinus excelsior*) under field and laboratory conditions. Trees. 11: 298-305.

Martin, J.G., B.D. Kloeppel, T.L. Schaefer, D.L. Kimbler and S.G. McNulty. 1998. Aboveground biomass and nitrogen allocation of ten deciduous southern Appalachian tree species. Can. J. For. Res. 28: 1648-1659.

Millard, P. 1996. Ecophysiology of internal cycling of nitrogen for tree growth. Z. Pflanzen. Boden. 159: 1-10.

Millard, P. and C.M. Thomson. 1989. The effect of autumn senescence of leaves on the internal cycling of nitrogen for the spring growth of apple trees. J. Exp. Bot. 40: 1285-1289.

Millard, P. and G.A. Grelet. Nitrogen storage and remobilization by trees: ecophysiological relevance in a changing world. 2010. Tree Physiol. 30: 1083-1095.

Millard, P. and G.H. Neilsen. 1989. The influence of nitrogen supply on the uptake and remobilization of stored N for the seasonal growth of apple trees. Ann. Bot. 63: 301-309.

Millard, P. and M.F. Proe. 1991. Leaf demography and the seasonal internal cycling of nitrogen in sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) seedlings in relation to nitrogen supply. New Phytol. 117: 587-596.

Millard, P., M. Sommerkorn and G.A. Grelet. 2007. Environmental change and carbon limitation in trees: a biochemical, ecophysiological and ecosystem appraisal. New Phytol. 175: 11-28.

Morin, X., T. Ameglio, R. Ahas, C. Kurz-Besson, V. Lanta, F. Le Bourgeois, F. Miglietta and I. Chuine. 2007. Variation in cold hardiness and carbohydrate concentration from dormancy induction to bud burst among provenances of three European oak species. Tree Physiol. 27: 817-825.

Murray M., M. Cannell and R. Smith. 1989. Date of budburst of 15 tree species in Britain following climatic warming. J. Appl. Ecol. 26: 693-700.

Neilsen, D., P. Millard, G.H. Neilsen and E.J. Hogue. 1997. Sources of N used for leaf growth in a high density apple (*Malus domestica*) orchard irrigated with ammonium nitrate solution. Tree Physiol. 17: 733-739.

Newell, E.A., S.S. Mulkey and S.J. Wright. 2002. Seasonal patterns of carbohydrate storage in four tropical tree species. Oecologia 131: 333-342.

Noh, N.J., Y. Son, R.H. Kim, K.W. Son, J.W. Koo, I.H. Park, Y.J. Lee, K.H. Lee and Y.M. Son. 2007. Biomass accumulations and the distribution of nitrogen and phosphorus within three *Quercus acutissima* stands in central Korea. J. Plant Biol. 50: 461-466

Noh, N.J., Y. Son, S.K. Lee, K.W. Seo, S.J. Heo, M.J. Yi, P.S. Park, R.H. Kim, Y.M. Son and K.H. Lee. 2010. Carbon and nitrogen storage in an age-sequence of *Pinus densiflora* stands in Korea. Sci. China. 53: 822-830.

Ögren, E. 2000. Maintenance respiration correlates with sugar but not nitrogen concentration in dormant plants. Physiol. Plant. 108: 295-299.

Ottorini, J.M. and N. Le Goff. 1998. Biomasses aériennes et racinaires et accroissements annuels en biomasse dans le dispositif écophysiologique de la Forêt de Hesse. Rapport scientifique annuel, convention de recherche ONF-INRA 'Etude de la croissance du hêtre sur le plateau Lorrrain'.

Palacio, S., A.J. Hester, M. Maestro and P. Millard. 2008. Browsed *Betula pubescens* trees are not carbon-limited. Funct. Ecol. 22: 808-815.

Palacio, S., M. Maestro and G. Montserrat-Marti. 2007. Seasonal dynamics of non structural carbohydrates in two species of med- iterranean sub-shrubs with different leaf phenology. Env. Exp. Bot. 59: 34-42.

Pfanz, H., G. Aschan, R. Langenfeld-Heyser, C. Wittmann and M. Loose. 2002. Ecology and ecophysiology of tree stems: corticular and wood photosynthesis. Naturwiss. 89: 147-162.

Piispanen, R. and P. Saranpää. 2001. Variation of non-structural carbohydrates in silver birch (*Betula pendula* Roth) wood. Trees 15: 444-451.

Plomion, C., G. Leprovost and A. Stockes. 2001. Wood formation in trees.Plant Physiol. 127: 1513-1523.

Proe, M.F. and P. Millard. 1994. Relationships between nutrient supply, nitrogen partitioning and growth in young Sitka spruce seedlings. Plant Soil. 168/169: 313-317.

Regier, N., S. Streb, S.C. Zeeman and B. Frey. 2010. Seasonal changes in starch and sugar content of poplar (*Populus detoides* x *nigra* cv. Dorskam) and the impact of stem girdling on carbohydrate allocation to roots. Tree Physiol. 30: 979-987.

Regina, I.S. 2000a. Organic matter distribution and nutrient fluxes within a sweet chestnut (*Castane sativa* Mill.) stand of the Sierra de Gata, Spain. Ann. For. Sci. 57: 691-700.

Regina, I.S. 2000b. Biomass estimation and nutrient pools in four *Quercuc pyrenica* in Sierra de Gata Mountains, Salamanca, Spain. For. Ecol. Manage. 132 : 127-141.

Reich, P.B., B.D. Kloeppel, D.S. Ellsworth and M.B. Walters. 1995. Different photosynthesis–nitrogen relations in deciduous hardwood and evergreen coniferous tree species. Oecologia, 104: 24-30.

Repo, T., K. Mononen, L. Alvila, T.T. Pakkanen and H. Hänninen. 2008. Cold acclimation of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) at its northernmost distribution range. Env. Exp. Bot. 63: 59-70.

Ryan, M.G. 1991. The effect of climate change on plant respiration. Ecol. Appl. 1: 157-167.

Ryan, M.G. 1995. Foliar maintenance respiration of subalpine and boreal trees and shrubs in relation to nitrogen content. Plant Cell Environ. 18: 765-772.

Ryan, M.G., R.M. Hubbard, S. Pongracic, R.J. Raison and R.E. McMurtrie. 1996. Foliage, fine-root, woody-tissue and stand transpiration in *Pinus radiata* in relation to nitrogen status. Tree Physiol. 16: 333-343.

Sanchez, E.E., T.L. Righetti, D. Sugar, and P.B. Lombard. 1991. Recycling of nitrogen in field-grown ‘Comice’ pears. J. Hortic. Sci. 66: 479-486.

Sauter, J.J. and B. Van Cleve. 1994. Storage, mobilization and interrelation of starch, sugars, protein and fat in the ray storage tissue of poplar trees. Trees. 8: 297-304.

Sauter, J.J., B. van Cleve and S. Wellenkamp. 1989. Ultrastructural and biochemical results on the localization and distribution of storage proteins in a poplar tree and in twigs of other tree species. Holzforschun. 43: 1-6.

Schädel, C., A. Blöchl, A. Richter and G. Hoch. 2009. Short-term dynamics of non-structural carbohydrates and hemicelluloses in young branches of temperate forest trees during bud break. Tree Physiol. 29: 901-911.

Silla, F. and A. Escudero. 2003. Uptake, demand and internal cycling of nitrogen in saplings of Mediterranean *Quercus* species. Oecologia 136: 28-36.

Spann, T.M., R.H. Beede and T.M. DeJong. 2008. Seasonal carbohydrate storage and mobilization in bearing and non-bearing pistachio (*Pistacia vera*) trees. Tree Physiol. 28: 207-213.

Stepien, V., J.J. Sauter and F. Martin. 1994. Vegetative storage proteins in woody plants. Plant Physiol. Biochem. 32: 185-192.

Thomas, F.M., G. Meyer and M. Popp. 2004. Effects of defoliation on the frost hardiness and the concentrations of soluble sugars and cyclitols in the bark tissue of pedunculate oak (*Quercus robur* L.). Ann. Sci. For. 61: 455-463.

Titus, J.S. and S.M. Kang. 1982. Nitrogen metabolism, translocation, and recycling in apple trees. Hort. Rev. 4: 204-246.

Tromp, J. 1983. Nutrient reserves in roots of fruit trees, in particular carbohydrates and nitrogen. Plant Soil. 71: 401-413.

Tromp, J. and J.V. Ovaa. 1971. Phloem translocation of nitrogen in apple. Physiol. Plant. 25: 407-413.

Valenzuela Nunez, L. 2006. Comparaison interspécifique de la dynamique saisonnière de composes azotes et carbonés chez le chêne sessile (*Quercus petraea* Matt. Liebl.), le chêne pédonculé (*Quercus robur* L.) et le hêtre (*Fagus sylvatica* L.) aux stades juvéniles et adultes, effet de la défoliation et de la lumière sur la gestion des réserves. PhD thesis, Henri Poincaré University, Nancy, France, 141 p.

Vande Walle, I., S. Missche, R. Samson, N. Lust and R. Lemeur. 2001. The above- and belowground carbon pools of two mixed deciduous forest stands located in East-Flanders (Belgium). Ann. For. Sci. 58: 507-517.

Vizoso, S., D. Gérant, J.M. Guehl, R. Joffre, M. Chalot, P. Gross and P. Maillard. 2008. Do elevation of CO_2 concentration and nitrogen fertilization alter storage and remobilization of carbon and nitrogen in pedunculate oak saplings? Tree Physiol. 28: 1729-1739.

Vollenweider, P., I. Dustin, R.M. Hofer, P. Vittoz and P. Hainard. 1994. A study of the cambial zone and conductive phloem of common beech (*Fagus sylvatica* L.) using an image analysis method. I. Influence of tree age on the structure. Trees. 9: 106-112.

Wetzel, S. and J.S. Greenwood. 1989. Proteins as a potential nitrogen storage compound in bark and leaves of several softwoods. Trees. 3: 149-153.

Wittmann, C., G. Aschan and H. Pfanz, 2001. Leaf and twig photosynthesis of young beech (*Fagus sylvatica*) and aspen (*Populus tremula*) trees grown under different light regime. Bas. Appl. Ecol. 2: 145-154.

Wong, B.L., K.L. Bagget and A.H. Rye. 2003. Seasonal patterns of reserve and soluble carbohydrates in mature sugar maple (*Acer saccharum*). Can. J. Bot. 81: 780-788.

Würth, M.K.R., S. Peláez-Riedl, S.J. Wright and C. Körner. 2005. Non-structural carbohydrate pools in a tropical forest. Oecologia. 143: 11-24.

Yemm, E.W. and E.C. Cocking. 1955. The determination of amino acids with ninhydrin. Analyst. 80: 209-213.

Yeoh, H.H. and Y.C. Wee. 1994. Leaf protein contents and nitrogen-to-protein conversion factors for 90 plants species. Food Chemistry. 49: 245-250.

Table 1. Characteristics of the 50-year-old sessile oak and the 45-year-old beech trees felled in January 2008 and June 2009.

	January 2008					June 2009				
Species	Tree	C130 *cm*	Sapwood width *cm*	Total height *m*	Crown length *m*	Tree	C130 *cm*	Sapwood width *cm*	Total height *m*)	Crown length *m*
Oak	*C13*	80.3	2.4	20.9	7.3	*C17*	88.4	2.4	22	7.4
	C14	83.9	3.6	20.9	7.2	*C18*	75.0	2.4	21	6.9
	C15	80.0	2.4	20.8	6.4	*C19*	71.6	3.7	19.9	5.1
	C16	63.0	2.1	19	7.3	*C20*	64.0	1.7	19	5.8
Beech	*H9*	60.5	2.4	19.5	9.3	*H13*	68.5	10.6	19.3	8
	H10	58.8	2.4	19.2	7.3	*H14*	60.0	9.5	18.2	6.2
	H11	56.0	3.7	17.8	7.9	*H15*	64.5	9.8	20	9.4
	H12	59.2	1.7	19.6	8.4	*H16*	61.2	9.4	20.8	6.9

Table 2. Variation of non-structural carbohydrates (NSC), starch and soluble sugars concentrations (%DM) among tree organs in sessile oak and beech trees in January and June. Values are average ± SE (n=12). The significance level between dates was indicated. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P< 0.001$, ns, not significant. Different letters indicate significantly different concentrations among organs at $P< 0.05$ by Tukey-Kramer HSD test.

		NSC %DM			Starch %DM			Soluble sugars %DM		
Species	*Organ*	*January*	*June*	*P*	*January*	*June*	*P*	*January*	*June*	*P*
Sessile oak	Roots	13.26 ± 0.81 c	15.56 ± 1.31 b	ns	8.64 ± 0.66 c	13.55 ± 1.31 c	**	4.61 ± 0.28 b	2.01 ± 0.13 a	***
	Stem	4.57 ± 0.33 a	4.64 ± 0.38 a	ns	2.39 ±0.23 a	3.53 ± 0.45 ab	*	2.18 ± 0.15 a	1.1 ± 0.1 a	***
	Branches	8.19 ± 0.49 b	3.83 ± 0.35 a	***	4.78 ± 0.43 b	2.51 ± 0.23 ab	***	3.42 ± 0.12 ab	1.52 ± 0.09 a	***
	Twigs	13.42 ± 0.78 c	13.93 ± 0.42 b	ns	4.14 ± 0.32 b	5.41 ± 0.53 b	ns	9.29 ± 0.63 c	8.52 ± 0.26 b	ns
	Leaves		16.43 ± 0.91 b			1.86 ± 0.2 a			14.54 ± 0.8 c	
Beech	Roots	7.01 ± 0.36 c	4.80 ± 0.5 bc	**	4.83 ± 0.39 c	3.84 ± 0.48 b	ns	2.18 ± 0.15 ab	0.96 ± 0.02 a	**
	Stem	2.81 ± 0.15 a	2.86 ± 0.26 a	ns	1.27 ± 0.11 a	2.19 ± 0.2 a	**	1.54 ± 0.05 a	0.67 ± 0.1 a	***
	Branches	5.33 ± 0.24 b	4.39 ± 0.33 ab	*	2.86 ± 0.18 b	3.25 ± 0.33 ab	ns	2.47 ± 0.08 b	1.14 ± 0.04 a	*
	Twigs	9.64 ± 0.4 d	9.96 ± 0.29 c	ns	2.57 ± 0.13 b	5.52 ± 0.2 c	***	7.08 ± 0.34 c	4.44 ± 0.32 b	***
	Leaves		16.17 ± 0.68 d			6.25 ± 0.62 c			9.93 ± 0.17 c	

Table 3. Variation of non-structural nitrogen compounds (NSNC), amino acids, soluble proteins and nitrate concentrations (%DM) among organs in sessile oak and beech trees in January and June. Values are average ± SE (n=12). The significance level between dates was indicated. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P< 0.001$, ns, not significant. Different letters indicate significantly different concentrations among organs at $P< 0.05$ by Tukey-Kramer HSD test.

		NSNC %DM			Amino acids %DM			Soluble proteins %DM			Nitrate %DM		
Species	*Organ*	*January*	*June*	*P*	*January*	*June*	*P*	*January*	*June*	*P*	*January*	*June*	*P*
Sessile oak	Roots	1.69 ± 0.23 b	1.23 ± 0.1 b	ns	1.48 ± 0.23 b	0.95 ± 0.11 b	*	0.14 ± 0.01 a	0.22 ± 0.04 a	*	0.06 ± 0 a	0.04 ± 0.01 a	ns
	Stem	0.68 ± 0.05 a	0.33 ± 0.02 a	***	0.41 ± 0.04 a	0.13 ± 0.01 a	***	0.21 ± 0.02 a	0.17 ± 0.02 a	**	0.06 ± 0.01 a	0.04 ± 0.01 a	*
	Branches	0.76 ± 0.05 a	0.52 ± 0.04 a	**	0.50 ± 0.05 a	0.28 ± 0.01 a	***	0.21 ± 0.02 a	0.21 ± 0.02 a	ns	0.04 ±0 a	0.04 ± 0 a	ns
	Twigs	3.49 ± 0.16 c	4.55 ±0.15 c	***	0.50 ± 0.03 a	0.85 ± 0.08 a	***	2.72 ± 0.15 b	3.36 ± 0.15 b	**	0.27 ±0.02 b	0.34 ± 0.02 b	*
	Leaves		5.77 ± 0.19 d			0.27 ± 0.02 b			4.83 ± 0.18 c			0.67 ± 0.07 b	
Beech	Roots	1 ± 0.06 c	1.03 ± 0.06 b	ns	0.85 ± 0.05 c	0.80 ± 0.05 b	*	0.13 ± 0.02 a	0.20 ± 0.02 a	**	0.04 ± 0 a	0.03 ± 0.01 a	ns
	Stem	0.44 ± 0.03 a	0.27 ± 0.02 a	***	0.17 ± 0.01 a	0.15 ± 0.02 a	ns	0.24 ± 0.01 a	0.09 ± 0.01 a	***	0.04 ± 0.01 a	0.04 ± 0.01 a	ns
	Branches	0.69 ± 0.03 b	0.41 ± 0.02 a	***	0.47 ± 0.03 b	0.16 ± 0.02 a	***	0.15 ± 0.01 a	0.20 ± 0.02 a	*	0.07 ± 0 b	0.05 ± 0.01 a	*
	Twigs	1.12 ± 0.09 c	1.83 ± 0.10 c	***	0.43 ± 0.02 b	0.74 ± 0.08 b	**	0.55 ± 0.08 b	0.80 ± 0.07 b	*	0.14 ± 0.01 c	0.29 ± 0.03 b	***
	Leaves		8.59 ± 0.29 d			0.69 ± 0.03 b			7.05 ± 0.28 c			0.85 ± 0.05 c	

Legends

Figure 1. Average organ biomass of sessile oak and beech trees felled in January and June. Values are average ± SE (n=8 per species).

Figure 2. Distribution and variation of non-structural carbohydrates (NSC) and total carbon amounts expressed in gC among tree organs between January and June in oak and beech trees (n=4). Different letters indicate significant differences between organs (Tuckey Kramer honestly at $P<0.05$)

Figure 3. Distribution and variation of non-structural nitrogen compounds (NSNC) and total nitrogen amounts expressed in gN among tree organs between January and June in oak and beech trees (n=4). Different letters indicate significant differences between organs (Tuckey Kramer honestly at $P<0.05$)

Figure 1.

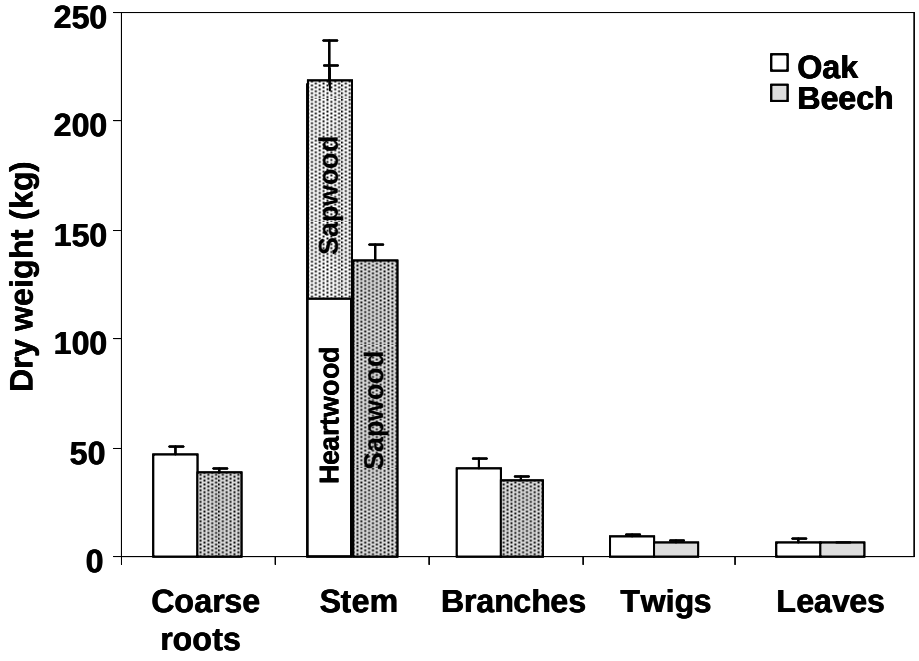

250
200
150
100
50
0
Dry weight (kg)
Oak
Beech
Sapwood
Heartwood
Sapwood
Coarse roots
Stem
Branches
Twigs
Leaves

Figure 2.

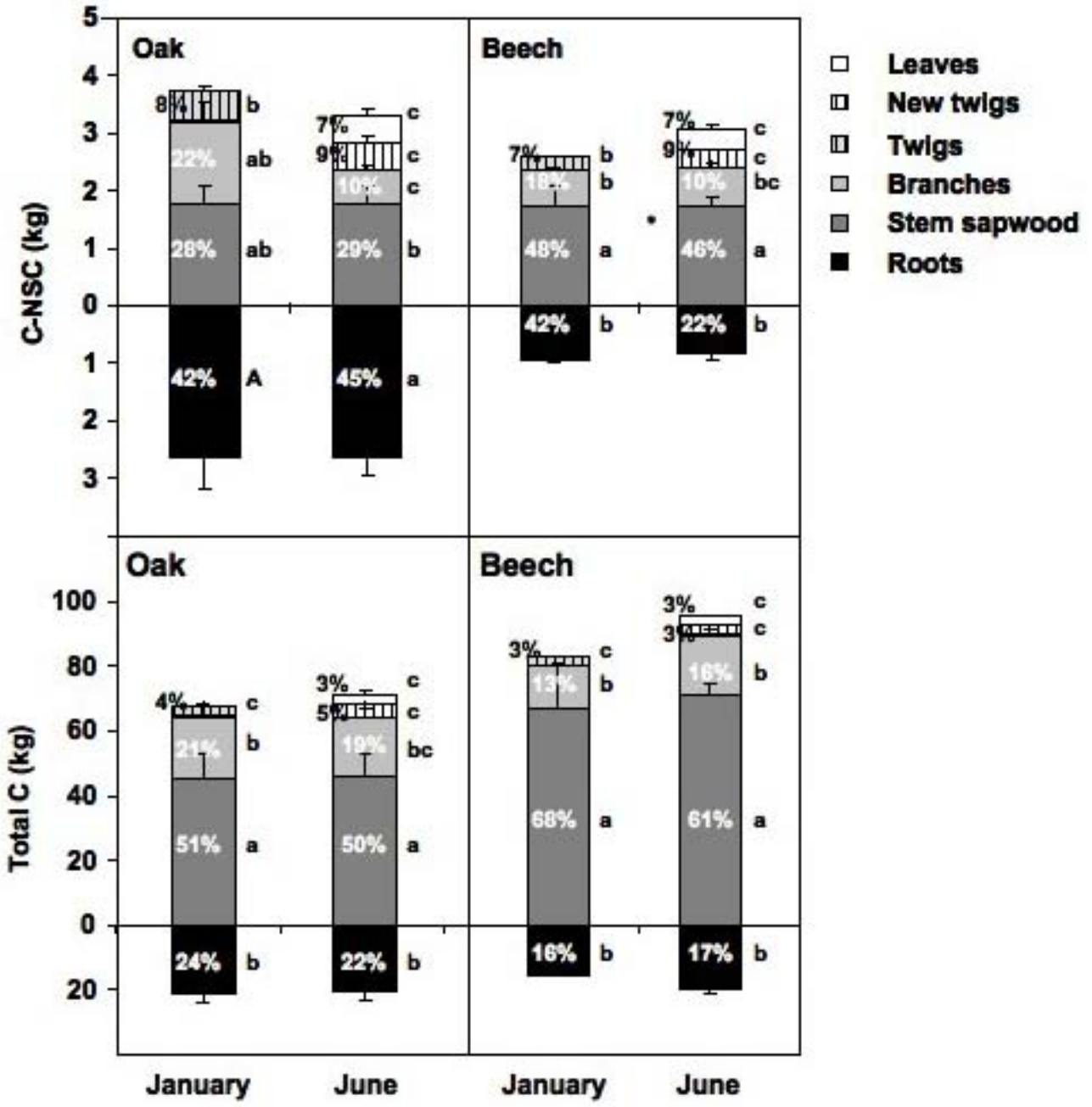
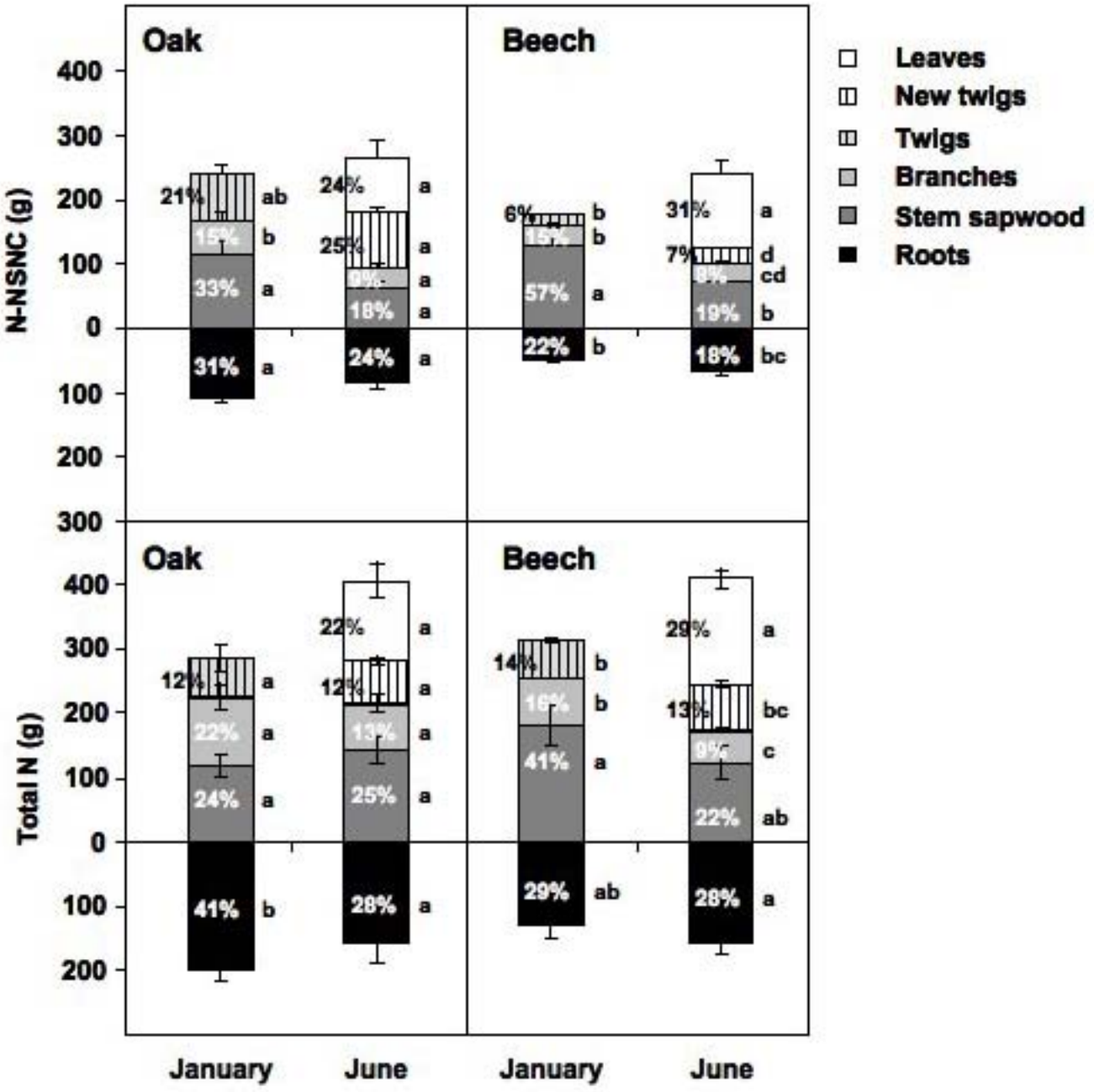

Oak
Beech
Oak
Beech
C-NSC (kg)
Total C (kg)
Leaves
New twigs
Twigs
Branches
Stem sapwood
Roots
January
June
January
June

Figure 3.


Oak
Beech
Oak
Beech
N-NSNC (g)
Total N (g)
Leaves
New twigs
Twigs
Branches
Stem sapwood
Roots
January
June
January
June

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Discussion générale et perspectives

Nous avons étudié la dynamique saisonnière des réserves carbonées et azotées chez le chêne sessile et le hêtre adultes, dans leur environnement naturel, en utilisant une démarche pluridisciplinaire (écophysiologique, biochimique et isotopique).

Au printemps, le marquage isotopique au ^{15}N a montré qu'aux premiers stades de développement chez le chêne sessile (Article 2), 90% de l'azote (N) des feuilles et des pousses provenaient de l'azote des réserves. C'est uniquement à la fin du débourrement que la contribution de l'azote nouvellement assimilé devient aussi importante que celle de l'azote des réserves. Ces résultats montrent l'importance des réserves azotées dans l'initiation de la croissance chez le chêne adulte, et leur contribution quantitative aux besoins en N requis pour le développement des nouveaux tissus. L'intensité de la remobilisation des réserves azotées lors de la mise en place du feuillage du chêne sessile de 50 ans est comparable à celle de jeunes plants puisque Vizoso et al. (2008) ont montré que 90% de l'N des feuilles provenaient des réserves lors de la 3ème année de croissance de chênes pédonculés cultivés en pot. Dans notre étude, nous avons étudié l'évolution de la composition isotopique de l'azote total dans les nouveaux organes. Des techniques de purification, séparant les composés azotés structuraux et non-structuraux, puis leur analyse isotopique, permettraient de déterminer sous quelle forme l'azote issu des réserves est investi dans les nouveaux organes.

Chez le hêtre, la croissance au printemps semble aussi fortement déterminée par les réserves comme l'ont montré des études réalisées sur de jeunes plants en conditions contrôlées (Dyckmans et Flessa, 2002). Nous n'avons pas étudié la remobilisation printanière de l'N chez le hêtre adulte. Notre expérience de marquage au ^{15}N, réalisée *in situ* sur du chêne sessile en futaie, est une des premières expériences de ce type (Article 2). D'ailleurs, Millard et Grelet, en 2010, soulignent l'absence de telles données sur des arbres adultes. Bien que ces expériences restent difficiles à réaliser en conditions non contrôlées et sur des arbres adultes ayant 20 m de hauteur, elles ne sont pas impossibles.

La reprise d'activité printanière correspond également à une période de transition hétérotrophie -autotrophie pour le carbone (C). Ainsi, des expériences de double marquage ^{13}C et ^{15}N permettraient d'estimer à la fois la contribution des réserves carbonées et celles azotées à l'initiation de la croissance. Les seules études par marquage isotopique au ^{13}C sur l'importance des réserves carbonées pour la croissance des nouveaux organes ont été réalisées sur des jeunes plants. Ainsi, les réserves carbonées contribuent pour 40% environ au C des nouvelles feuilles chez le hêtre

(Dyckmans et Flessa, 2001) et chez le chêne (Vizoso et al. 2008) à des stades juvéniles. A partir des données de Dyckmans et al. (2000) estimant que les réserves carbonées contribuent pour 44% au C des feuilles et pour 100% au C nécessaire à la croissance radiale, Barbaroux et al. (2003) ont établi un budget quasi complet du C nécessaire à la croissance printanière de chênes adultes.

A partir de notre estimation du pourcentage d'N remobilisé pour la croissance de la nouvelle pousse (Article 2), des données de biomasse et des concentrations en N total des nouveaux organes (Article 3), nous pouvons ainsi établir un bilan de la quantité d'N remobilisé pour la croissance printanière (Tableau 1). Ainsi, chez un chêne sessile de 50 ans, on estime que 107g d'N provenant des réserves participent à l'étalement complet des feuilles et à l'élongation des nouvelles pousses en Juin. En Janvier, la quantité d'azote non-structural (NSNC) des organes pérennes (racines, tronc, branches et pousses) est estimée à 351g (Article 3, Figure 3). Ainsi, 31% de cette quantité servirait à la mise en place des nouvelles pousses chez le chêne.

Tableau 1. Estimation du coût d'azote (g N) issu des réserves pour l'étalement des feuilles et pour l'élongation de la pousse de l'année.

Organes	Biomasse totale (kg)	N (%)	% N provenant des réserves	Coût N issu des réserves (g N)
	Article 3		*Article 2*	
Feuilles	6.65 ± 1.91	1.99 ± 0.13	47.0	62.2
Pousses	9.55 ± 0.68	0.73 ± 0.01	64.4	44.9

Au niveau du tronc, le suivi mensuel de la dynamique des réserves a montré une forte remobilisation des réserves carbonées (NSC) à partir des cernes les plus récents de l'aubier du tronc du chêne sessile, mais pas chez le hêtre (Article 1, Figures 1 et 2). Cette différence interspécifique pourrait résulter du rôle fonctionnel de la croissance radiale initiale dans la survie du chêne au printemps et confirme les résultats obtenus par Barbaroux et al. (2002 et 2003) et Genet et al. (2010). Chez le chêne, la sensibilité à l'embolie hivernale, inhérente aux caractéristiques anatomiques du bois (bois initial à zone poreuse avec de gros vaisseaux de xylème), nécessite une croissance printanière sur le carbone des réserves, puisque celle-ci s'instaure avant la mise en place de l'indice foliaire. Le hêtre est moins sensible à l'embolie hivernale du fait d'une anatomie de bois à pores diffus et des vaisseaux de xylème de petite taille (Cochard et al. 1992, Lemoine et al. 2002a). La nécessité d'une croissance radiale précoce est donc moins primordiale pour la

restauration de la conductance hydraulique de l'arbre. D'autre part, les concentrations en protéines solubles et en acides aminés n'ont pas montré de variations significatives dans les cernes de l'aubier des deux espèces, en accord avec les résultats de Valenzuela Nunez (2006). Cependant, on assiste à une remobilisation de deux polypeptides de 13 et 26 kDa accumulés dans l'aubier au moment de la sénescence foliaire (Article 1, Figures 1 et 2). Cette remobilisation est concomitante au débourrement chez les deux espèces, ce qui confère un rôle potentiel aux polypeptides dans le stockage transitoire de l'azote (Stepien et al. 1994). D'après nos résultats, l'N de ces polypeptides représente 10% de l'azote total de l'aubier du tronc, le devenir de l'N de ces polypeptides mériterait d'être étudié afin de savoir si cet azote est exporté vers des puits en croissance ou s'il est utilisé sur place pour la mise en place du cerne. L'idéal serait de pouvoir marquer ces polypeptides par un marquage au ^{15}N effectué à l'automne, et de suivre ce traceur au printemps. Le suivi mensuel (Article 1) a apporté de nouvelles connaissances sur la remobilisation de l'N à partir du tronc. Le bilan exhaustif des composés azotés non-structuraux à l'échelle de l'arbre, réalisés à deux dates (Article 3), nous a permis de mettre en évidence que tous les organes pérennes sont sollicités pour la croissance printanière. En effet, nous avons observé des concentrations plus faibles en composés carbonés (NSC) et azotés (NSNC) non-structuraux dans les organes pérennes (tronc, racines et branches) en Juin après l'achèvement de l'expansion foliaire par rapport à celles de Janvier en période de dormance (Article 3, Tableaux 2 et 3).

A l'échelle de l'arbre (Article 3), les jeunes pousses et les feuilles contiennent environ 50% des NSNC de l'arbre chez les deux espèces, malgré leur faible biomasse (3 et 2% de la biomasse totale de l'arbre, respectivement). Cette répartition reflète la forte demande en azote nécessaire à la photosynthèse. Par contre, ces nouveaux organes contiennent uniquement 17% des NSC de l'arbre alors que ce sont le siège de la photosynthèse, ce qui reflète l'allocation rapide des photosynthétats vers les organes puits de C. Il faut donc considérer que les NSC et les NSNC présents dans les différents organes après l'étalement complet des feuilles correspondent i) à du C et de l'N mis en réserve l'hiver précédent et redistribué lors de la croissance printanière et ii) à du C et de l'N nouvellement assimilés et circulant dans l'arbre. Par exemple, le phloème est enrichi en ^{15}N dès que les feuilles sont étalées, ce qui laisse supposer qu'il y a déjà une redistribution du nouvel N absorbé très tôt après le débourrement, dès la reprise de flux de sève brute (Article 2). Les outils de marquage semblent les plus adaptés afin de tracer l'allocation du C et de l'N nouvellement assimilés depuis les organes sources (feuilles et racines) vers les organes pérennes, permettant ainsi de les distinguer des NSC et NSNC provenant des réserves hivernales. Cependant, un marquage de courte durée au printemps ne permettrait pas de tracer de manière fiable les assimilats du fait de

l'activité intense de l'assimilation du C et de l'N au printemps et de l'allocation continuelle des formes mobiles dans l'arbre. D'un autre côté, le marquage des composés mis en réserve à l'automne ne permettrait pas d'estimer tout le stock des réserves étant donné que le marquage ne tracerait que les réserves se formant à partir de cette date. Dans l'article 1, nous avons montré que dans le tronc, le remplissage des réserves carbonées et celui des réserves azotées sont décalés dans le temps. Ceci met en évidence la complexité d'un double marquage et la difficulté de choisir une date appropriée. Le marquage (continu et/ou à plusieurs dates phénologiques) reste un outil plus facilement applicable sur des jeunes plants (herbacés et ligneux).

Dès l'étalement complet des feuilles en juin, nous avons observé un remplissage progressif de l'amidon dans les cernes de l'aubier du tronc des deux espèces (Article 1, Figures 1 et 2), parallèlement à la croissance du nouveau cerne, comme démontré par Barbaroux et Bréda (2002) lors d'une autre année d'étude. La concentration en réserves carbonées dans le tronc atteint sa valeur maximale en Octobre, comme démontré par Barbaroux et Bréda (2002), bien que l'année étudiée alors présentait un déficit hydrique estival. L'accumulation des polypeptides de 13 et 26 kDa dans l'aubier du tronc commence avec la sénescence foliaire (Octobre) induite par le changement de température et de photopériode (Article 1). Pour les arbres décidus, l'N du feuillage est d'une grande importance non seulement pour le recyclage interne annuel mais également à l'échelle du peuplement pour le retour d'N au sol par la litière (Regina, 2000a, Noh et al. 2010). Chez de jeunes plants de chêne, environ 45% de l'azote foliaire est recyclé par l'arbre lors de la sénescence (Vizoso et al. 2008).

En hiver, et parallèlement à des températures négatives entre Décembre et Février 2008, nous avons observé une conversion de l'amidon en sucres solubles *dans les cernes de l'aubier du tronc* (Article 1, Figures 1 et 2). L'accumulation de ces agents osmotiques permettrait à l'arbre de résister au froid et aux gelées en abaissant le point de congélation des tissus (Thomas et al. 2004, Morin et al. 2007, Repo et al. 2008). De manière intéressante, nous avons observé également une accumulation importante de sucres solubles dans tous les organes pérennes aériens des arbres abattus à la même période; cependant l'accumulation est moins importante dans les racines (Article 3) ce qui pourrait être lié à une exposition moins importante à des températures négatives (Sauter, 1988). Parallèlement à l'accumulation des sucres solubles, nous avons observé une accumulation croissante des deux polypeptides de 13 et 26 kDa dans les cernes de l'aubier du tronc du chêne et du hêtre (Article 1, Figures 1 et 2), ce qui pourrait leur conférer un rôle dans l'endurcissement au froid (Rowland et Arora, 1997). Les variations saisonnières des deux polypeptides mis en évidence pour

la première fois chez le chêne sessile et le hêtre, sont caractéristiques de protéines de réserve (O'Kennedy et Titus, 1979), mais leur forte accumulation pendant la période la plus froide de l'hiver n'exclut pas un rôle dans la tolérance au froid. Afin de confirmer ces deux hypothèses et mieux cerner leur rôle, des études plus approfondies en manipulant les sources d'N et en réponse à des stimuli externes (photopériode, accumulation du froid et du gel, et les blessures) sont indispensables. A une échelle plus fine, un séquençage et une caractérisation de leur composition pourrait éventuellement mettre en évidence des homologies de séquence avec d'autres protéines ayant une fonction physiologique déjà identifiée. Dans le contexte d'études *in situ*, les variabilités climatiques interannuelles sont importantes et un suivi de la dynamique de ces polypeptides sur plusieurs années permettrait aussi de tester la plasticité de leur cinétique.

A l'échelle de l'arbre, les quantités de NSC et de NSNC estimées en janvier correspondent aux réserves carbonées et azotées. L'étude de la composition protéique réalisée dans l'aubier du tronc (Article 1), mérite d'être complétée dans les autres organes pérennes. A cette période, le tronc et les racines constituent les stocks les plus importants, contrairement aux jeunes plants où les racines sont l'organe majeur de stockage (Cerasoli et al. 2004a et 2004b, Fotelli et al. 2004) et aux jeunes arbres (20 ans), où la contribution des racines est comparable à celle du tronc (Valenzuela Nunez, 2006). Cette différence de contribution relative des compartiments aériens et souterrains est à mettre en relation avec l'évolution du rapport aérien/souterrain (shoot/root ratio) en fonction de l'âge (Genet et al. 2010). Ces derniers auteurs montrent cependant que le rapport diminue à un âge plus précoce chez le hêtre que chez le chêne.

A l'échelle interspécifique, le chêne sessile montre des concentrations plus élevées en composés carbonés et azotés non-structuraux dans ses organes pérennes comparé au hêtre, quelle que soit la date, reflétant ainsi le fonctionnement physiologique contrasté des deux espèces. Chez le hêtre, les besoins en C pour la respiration d'entretien en hiver et pour la croissance radiale au printemps sont plus faibles par rapport au chêne (Barbaroux et Bréda, 2002, Barbaroux et al. 2003, Genet et al. 2010) ce qui est cohérent avec des teneurs en réserves carbonées plus faibles. Malgré cette différence, le stock des réserves carbonées du hêtre apparaît comme le paramètre principal du maintien physiologique de l'arbre (Genet, 2009) et garantit la restauration de l'intégrité physiologique de l'arbre après perturbation (Badeau et Bréda, 1997, Le Dantec et al. 2000, Genet, 2009). Ainsi chez les hêtres dépérissants, on assiste à une forte allocation du C vers la fonction stockage au dépend de la croissance radiale, permettant aux arbres de maintenir des concentrations en composés de réserves carbonées identiques à celles des arbres sains (Genet, 2009). Chez le

chêne, les concentrations élevées en N pourraient résulter aussi de sa respiration d'entretien élevée puisque la teneur en N des tissus est fortement corrélée à la respiration d'entretien (Ryan et al. 1991 et 1996, Maier et al. 1998). Chez le hêtre une forte teneur en azote foliaire, associée à une faible concentration en azote au niveau des branches et du tronc et une faible respiration d'entretien permettrait au hêtre de maximiser le gain de C (Martin et al. 1998).

Les trois années d'étude ont été caractérisées par un bilan hydrique favorable. Aucune sécheresse estivale ou défoliation n'a été enregistrée et aucune fructification significative n'a été observée, optimisant ainsi la croissance, l'assimilation et l'allocation du C et de l'N vers les réserves. Ainsi nos analyses de réserves carbonées et azotées sont certainement réalisées en conditions optimales. Ces bilans auraient été probablement différents en cas de perturbations d'origine biotique ou en cas de sécheresse. La teneur en amidon et en glucose des organes d'un arbre reflète sa capacité de résistance et de survie à des conditions de contrainte (Tschaplinski et Blake, 1994). Chez des chênes défoliés, la concentration en amidon en fin de saison de végétation permettait de prédire leur probabilité de survie (Marçais et Bréda, 2006). Ainsi, l'augmentation significative de la mortalité de chêne pédonculé suite à deux défoliations successives a été corrélée à une baisse drastique de la teneur en amidon dans l'aubier du tronc (Marçais et Bréda, 2006). En climat tempéré, un hiver long (5 à 6 mois, e.g. Körner, 1994), le flush de croissance au printemps (e.g. Kramer et Kozlowski, 1979, Höll, 1997), les années de fructifications intenses (e.g. Gäumann, 1935) et les sécheresses exceptionnelles (Bréda et al. 2006) représentent des événements physiologiques pouvant induire un épuisement progressif ou une reconstitution insuffisante du stock de C mobile chez les arbres décidus. Etant donné la quantité importante d'azote mobile dans les feuilles de chêne et de hêtre, une défoliation pourrait affecter le stock d'N et avoir des conséquences sur la capacité de la reprise de la croissance au printemps suivant. Ainsi, il serait intéressant de coupler des études sur les stocks de C et d'N dans des situations de dysfonctionnement de l'arbre.

En conclusion, l'étude des flux des composés de réserve permet de mieux comprendre les schémas d'allocation entre source et puits et d'autres fonctions à l'échelle de l'arbre. La quantification des stocks (dimension des réservoirs de C et d'N) dans des arbres adultes est indispensable au paramétrage initial des modèles fonctionnels de bilan couplé eau-carbone-azote et de croissance. La mise en œuvre de tels modèles constitue une perspective importante à la fois en terme d'intégration de nos connaissances sur ces dynamiques couplées phénologie - réserves et comme outil de recherche, afin de tester l'impact de contraintes climatiques (gel, sécheresse) ou biotiques (défoliations) sur les quantités et les dynamiques des réserves carbonées et azotées.

Cependant, peu de modèles sont, à ce jour, capables de coupler le fonctionnement de l'arbre et du sol, ce compartiment restant sous-étudié. La croissance et le renouvellement des racines fines sont mal connus sur des arbres *in situ*, la disponibilité des différentes formes d'azote dans le sol et la capacité d'assimilation des arbres, incluant la contribution des champignons mycorhiziens, restent à renseigner.

References

Adams, M., P.M. Attiwell and M.Wang-Liang. 1995. Effects of phosphorus supply on growth and nitrogen fractions in xylem sap and foliage of *Eucalyptus regnans* (F Muell.), *E. nitens* (Maiden) and *E. globulus* (Labill.) seedlings: implications for herbivory. Trees Struct. Func. 9: 324-331.

Aerts, R. 1990. Nutrient use efficiency in evergreen and deciduous species from heathlands. Oecologia. 84: 391-397.

Almeida, M.H., M.M. Chaves and J.C. Silva. 1994. Cold-acclimation in eucalypt hybrids. Tree Physiol. 14: 921-932.

Andersen, P.C., B.V. Brodbeck and R.F. Mizel III.1995. Diurnal variations in tension, osmolarity and the composition of nitrogen and carbon assimilated in xylem fluid of *Prunus persica*, *Vitis* hybrid and *Pyrus communis*. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 120: 600-606.

Andrianarisoa, K.S., B. Zeller, J.L. Dupouey and E. Dambrine. 2009. Comparing indicators of N status of 50 beech stands (Fagus sylvatica L.) in northeastern France. For. Ecol. Manag. 257: 2241-2253.

Anfodillo, T., G.B. Sigalotto, M. Tomasi, P. Semenzato and R. Velentini. 1993. Application of a thermal Imaging technique in the study of the Accent of sap in Woody species. Plant, Cell and Environ. 19: 997-1001.

Anttonen, S., A.M. Manninen, P. Saranpää , P. Kainulainen, S. Linder and E. Vapaavuori. 2002. Effects of long-term nutrient optimisation on stem wood chemistry in *Picea abies*. Trees Struct. Func.16:386-394.

Aranda, I., L. Gil and J.A. Pardos. 2000. Water relations and gas exchange in *Fagus sylvatica* L. and *Quercus petreae* (Mattuschka) Liebl. in a mixed stand at their southern limit of distribution in Europe. Trees Struct. Func.14: 344-352.

Ashworth E.N., S.R. Malone and Z. Ristic. 1993. Response of woody plant cells to dehydrative stress. Int. J. Plant Sci. 154: 90-99.

Attree, S.M., M.K. Pomeroy and L.C. Fowke. 1992. Manipulation of conditions for the culture of somatic embryos of white spruce for improved triacylglycerol biosynthesis and desiccation tolerance. Planta. 187: 395-404.

Aussenac, G. 1975. Relations between the weather and natural regeneration of Oak in the Nancy area from 1865 to 1972. Revue Forestière Française. 27:37-39.

Avice, J.C., F. Le Dily, E. Goulas, C. Noquet, F. Meuriot, J.J. Volenec, S.M. Cunningham, T.G. Sors, C. Dhont, Y. Castonguay, P. Nadeau, G. Bélanger, F.P. Chalifour, and A. Ourry. 2003. Vegetative storage proteins in overwintering storage organs of forage legumes: roles and regulation. Can. J. Bot. 81: 1198-1212.

Backes, K. and C. Leuschner. 2000. Leaf water relations of competitive *Fagus sylvatica* and *Quercus petreae* trees during 4 years differing in soil drought. Can. J. For. Res. 30: 335-346

Barbaroux, C. 2002. Analyse et modélisation des flux de carbone de peuplements forestiers pour la compréhension de la croissance de deux espèces feuillues *Quercus petraea* et *Fagus sylvatica*. Thèse de doctorat, Université Paris-Sud, Orsay, France, 182 p.

Barbaroux, C. and N. Bréda. 2002. Contrasting distribution and seasonal dynamics of carbohydrate reserves in stem wood of adult ring-porous sessile oak and diffuse-porous beech trees. Tree Physiol. 22: 1201-1210.

Barbaroux, C., N. Bréda and E. Dufrêne. 2003. Distribution of above-ground and below-ground carbohydrate reserves in adult trees of two contrasting broad-leaved species (*Quercus petraea* and *Fagus sylvatica*). New Phytol. 157: 605-615.

Bartelink, HH. 1998. A model of dry matter partitioning in trees. Tree Physiol. 18: 91-101.

Bernardo, A.L., M.G.F. Reis, G.G. Reis, R.B. Harrison and D.J. Firme, 1997. Effect of spacing on growth and biomass distribution in Eucalyptus camaldulensis. For. Ecol. Manage. 104: 1-13.

Binnie, S.C., S.C. Grossnickle and D.R. Roberts. 1994. Fall acclimation patterns of interior spruce seedlings and their relationship to changes in vegetative storage proteins. Tree Physiol. 14: 1107-1120.

Black, B.L., C.M. Parmentier-Line, L.H. Fuchigami, G.D. Coleman. 2001. Ecotypic and genetic variations in poplar bark storage protein gene expression and accumulation. Tree Physiol. 21: 1289-1297.

Blanchard, R.O., W.C. Shortle and W.Davis. 1983. Mechanism relating cambial electrical resistance to periodic growth rate of balsam fir. Can. J. For. Res. 13: 472-480.

Bode, J., H.P. Kuhn, and A. Wild. 1985. Die Akkumulation von Prolin in Nadeln geschldigter Fichten *(Picea abies* [L.] Karst). Forstw. Cbl. 104: 353-60.

Boehringer, S.A. 1984. Methods of enzymatic food analysis using single reagents. Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany, 79 p.

Boerner, R.E. 1984. Foliar nutrient dynamics and nutrient use efficiency of four deciduous tree species in relation to site fertility. J. Appl. Ecol. 21: 1029-1040.

Bollmark, L., L. Sennerby-Forsse and T. Ericsson. 1999. Seasonal dynamics and effects of nitrogen supply rate on nitrogen and carbohydrate reserves in cutting derived *Salix viminalis* plants. Can. J. For. Res. 29: 85-94.

Bory, G. and D.Clair-Maczulajtys. 1988. L'étude des métabolites de réserve. Bulletin de la Société Botanique de France. 135, Actualités Botaniques. 1: 5-8

Bory, G., M.D. Sidibe and D. Clair-Maczulajtys. 1991. Effects of cut- ting back on the carbohydrate and lipid reserves in the tree of heaven (*Ailanthus-Glandulosa Desf Simaroubaceae*). Ann. For. Sci. 48:1-13.

Breadmore, T., S. Wetzel and M. Kalous. 2000. Interactions of airborne methyljasmonate with vegetative storage protein gene and protein accumulation and biomass partitioning in *Populus* plants. Can. J. For. Res. 30: 1106-1113.

Bréda N., A. Granier and G.Aussenac. 2000. Evolutions possibles des contraintes climatiques et conséquences pour la croissance des arbres. Revue Forestière Française N° sp. 2000: 73-90.

Bréda N.J.J. 2003. Ground-based measurements of leaf area index: a review of methods, instruments and current controversies. J. Exp. Bot. 392: 2403-2417.

Bréda, N. 1994. Analyse du fonctionnement hydrique des chênes sessile (*Quercus petraea*) et pédonculé (*Quercus robur*) en conditions naturelles, effets des facteurs du milieu et de l'éclaircie. Thèse de doctorat, Nancy-université, p. 59.

Bréda, N. and A. Granier. 1996. Intra and interannual variations of transpiration, leaf area index and radial growth of a sessile oak stand (*Quercus petraea*). Ann. Sci. For. 53: 521-536.

Bréda, N. and V. Badeau. 2008. Forest tree responses to extreme drought and some biotic events: towards a selection according to hazard tolerance? C.R. Geoscience. 340: 651-662.

Bréda, N., A. Granier, F. Barataud and C. Moyne. 1995. Soil water dynamics in an oak stand. I. Soil moisture, water potential and water uptake by roots. Plant and Soil. 172: 17-27.

Bréda, N., H. Cochard , E. Dreyer and A. Granier. 1993a. Water transfer in a mature oak stand (*Quercus petraea*): seasonal evaluation and effects of a severe drought. Can J. For. Res. 23: 1136-1143.

Bréda, N., H. Cochard, E. Dreyer and A. Granier. 1993b. Field comparison of transpiration, stomatal conductance and vulnerability to cavitation of *Quercus petraea* and *Quercus robur* under water stress. Ann. Sci. For. 50: 571-582.

Bréda, N., R. Huc, A. Granier and E. Dreyer. 2006. Temperate forest trees and stands under severe drought: a review of ecophysiological responses, adaptation processes and long-term consequences. Ann. Sci. For. 63: 625-644.

Brett, C.T. and K.W. Wladron. 1996. Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls (2nd Ed.). Chapman and Hall, London.

Brown S. and P.E. Schroeder. 1999. Spatial patterns of aboveground production and mortality of woody biomass for eastern US forests. Ecol. Appl. 9: 968-980.

Brugière, N., F. Dubois, A.M. Limami, M. Lelandais, Y. Roux, R.S. Sangwan and B.Hirel. 1999. Glutamine synthetase in the phloem plays a major role in controlling proline production. Plant Cell. 11: 1995-2011.

Buckeridge, M.S., H.P. Santos and M.A.S. Tiné. 2000b. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds Plant Physiol. Biochem. 38: 141-156.

Cannell, M.G.R. and R.C. Dewar. 1994. Carbon allocation in trees: a review of concepts for modelling. Adv. Ecol. Res. 25: 59-104.

Cataldo, D.A., M. Haroon, L.E. Schrader and V.L. Youngs. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Com. Soil Sci. Plant Anal. 6: 71-80.

Cavender-Bares, J., P. Cortes, S. Rambal, R. Joffre, B. Miles and A. Rocheteau. 2005. Summer and winter sensitivity of leaves and xylem to minimum freezing temperatures: a comparison of co-occurring Mediterranean oaks that differ in leaf lifespan. New Phytol. 168: 597-611.

Cerasoli, S. 2002. Partiçao e mobilizaçao do carbono e do azoto no sobreiro (*Quercus suber* L.). Doutoramento em Engenharia Florestal, Universidade técnica de Lisboa- Lisboa, 96 p.

Cerasoli, S., A. Scartazza, E. Brugnoli, M.M. Chaves and J.S. Pereira. 2004b. Effects of partial defoliation on carbon and nitrogen partitioning and photosynthetic carbon uptake by two-year-old cork oak (*Quercus suber*) saplings. Tree Physiol. 24: 83-90.

Cerasoli, S., P. Maillard, A. Scartazza, E. Brugnoli , M.M. Chaves and J.S. Pereira. 2004a. Carbon and nitrogen winter storage and remobilisation during seasonal flush growth in two-year-old cork oak (*Quercus suber* L.) saplings. Ann. For. Sci. 61: 721-729.

Ceschia, E. 2001. Environmental effects on spatial and seasonal variations of stem respiration in European Beech and Norway Spruce. Acta Universitatis Agriculturae Sueciae (Silvestria) 219 p.

Ceulemans, R. and M. Mousseau. 1994. Effects of elevated atmospheric CO_2 on woody plants. Tansley Review N° 71. New Phytol. 127: 425-446.

Chapin, F.S. 1980. The mineral nutrition of wild plants. Ann. Rev. Ecol. Syst. 11: 233-260.

Chapin, F.S. and R.A. Kedrowski. 1983. Seasonal changes in nitrogen and phosphorus fractions and autumn retranslocation in evergreen and deciduous taiga trees. Ecology 64: 376-391.

Chapin, F.S., E.D. Schulze and H.A. Mooney. 1990. The ecology and economics of storage in plants. Annu. Rev. Ecol. Syst. 21: 423-447.

Chapin, F.S., H. Lambers and T.L. Pons. Plant physiological ecology. Eds. Springer 1998. Science and Business Media Inc, 539 p.

Chapin, F.S., J.D. McKendrick and D.A. Johnson. 1986. Seasonal changes in carbon fractions in Alaskan tundra plants of differing growth form – implications for herbivory. J. Ecol. 74: 707-731.

Chaves, M.M. 1991. Effects of water deficits on carbon assimilation. J. Exp. Bot. 42: 1-6.

Chemillier, P. 1997. L'effet de serre : Pourquoi et comment lutter contre ses conséquences ? *In*: Face aux changements climatiques. Aménagement et Nature. 126: 11-18.

Cheng, L. and L.H. Fuchigami. 2002. Growth of young apple trees in relation to nitrogen and carbohydrates. Tree Physiol. 22: 1297-1303.

Cherbury, B., R. Joffre, D. Gillon and S. Rambal. 2001. Internal remobilization of carbohydrates, lipids, nitrogen and phosphorus in the Mediterranean evergreen oak *Quercus ilex*. Tree Physiol. 21: 9-17.

Chomba, B.M., R.D. Guy and H.G. Weger. 1993. Carbohydrate reserve accumulation and pre-storage CO_2 enrichment. Tree Physiol. 13: 351-364.

Chuine, I. and P. Cour. 1999. Climatic determinants of budburst seasonality in four temperate-zone tree species. New phytol. 143: 339-349.

Clausen, S. and K. Apel. 1991. Seasonal changes in the concentration of the major storage proteins and its mRNA in the xylem ray cells of poplar trees. Plant Mol. Biol. 17: 669-678.

Cochard, H. and M.T. Tyree. 1990. Xylem dysfunction in *Quercus*: vessel sizes, tyloses, cavitation and seasonal changes in embolism. Tree Physiol. 6: 393-407.

Cochard, H., N. Bréda, A. Granier and G. Aussenac. 1992. Vulnerability to air embolism of three European oak species *Quercus petraea* (Matt) Liebl, *Q. pubescens* Willd, *Q. robur* L). Ann. Sci. For. 49: 225-233.

Coleman, G.D., Englert, J.M., Chen,T.H.H. and Fuchigami, L.H. 1993. Physiological and environmental requirements for poplar (*Populus deltoides*) bark storage protein degradation. Plant Physiol. 102: 53-59.

Coleman, G.D., M.P. Bañados and T.H.H. Chen. 1994. Poplar bark storage protein and a related wound-induced gene are differentially induced by nitrogen. Plant Physiol. 106: 211-215.

Coleman, G.D., T.H.H. Chen, S.G. Ernst and L. Fuchigami. 1991. Photoperiod control of poplar bark storage protein accumulation. Plant. Physiol. 96: 686-692.

Comps, B., J. Letouzey and J.M. Savoie. 1987. Phénologie du couvert arborescent dans une chênaie-hêtraie d'Aquitaine. Ann. Sci. For. 44: 153-170.

Cooke, J.E.K. and M. Weih. 2005. Nitrogen storage and seasonal nitrogen cycling in *Populus*: bridging molecular physiology and ecophysiology. New Phytol. 167: 19-30.

Cooper, H.D. and D.T. Clarkson. 1989. Cycling of amino-nitrogen and other nutrients between shoots and roots in cereals - a possible mechanism integrating shoot and root in the regulation of nutrient-uptake. J. Exp. Bot. 40:753-762.

Cyr, D.R. and J.D. Bewley. 1989. Carbon and nitrogen reserves of leafy spurge (*Euphorbia esula*) roots as related to over-wintering strategy. Physiol. Plant. 77: 62-72.

Cyr, D.R., J.D. Bewley and E.B. Dumbroff. 1990. Seasonal dynamics of carbohydrate and nitrogenous components in the roots of perennial weeds. Plant Cell Environ. 13: 359-365.

Dambrine, E., S.Le Goaster and J.Ranger. 1991. Croissance et nutrition minérale d'un peuplement d'épicéa sur sol pauvre. II Prélèvement racinaire et translocation d'éléments minéraux au cours de la croissance. Acta Oecol. 112: 791-808.

Damesin C, E. Ceschia, N. Le Goff, J.M. Ottorini and E. Dufrêne. 2002. Stem and branch respiration of beech: from tree measurements to estimations at the stand level. New Phytol. 153: 159-172.

Davidson, J. and A.K.M. Ekramoddoullah. 1997. Analysis of bark proteins in blister rust-resistant and susceptible western white pine (*Pinus monticola*). Tree Physiol. 17: 663-669

Davis, J.M., E.E. Egelkrout, G.D. Coleman, T.H.H. Chen, B.E. Haissig and D.E. Riemenschneider. 1993. A family of wound-induced genes in *Populus* shares common features with genes encoding vegetative storage proteins. Plant Mol. Biol. 23: 135-143.

Deléens, E., J.B. Cliquet and J.L. Prioul. 1994. Use of ^{13}C and ^{15}N plant label near natural abundance for monitoring carbon and nitrogen partitioning. Aust. J. Plant Physiol. 21: 133-146.

Deslauriers, A., A. Gioovannelli, S. Rossi, G. Castro, G. Fragnelli and L. Traversi. 2009. Intra-annual cambial activity and carbon availability in stem of poplar. Tree Physiol. 29: 1223-1235.

Dickson, R. E. 1989. Carbon and nitrogen allocation in trees. Ann. Sci. For. 46: 631- 647.

Dickson, R.E. 1991. Assimilate distribution and storage. *In* Physiology of Trees. Ed. A.S. Raghavendra. J. Wiley and Sons, New York, pp 51-85.

Differ, J. 2001. Phénologie des espèces arborées. Synthèse bibliographique. Analyse des données du réseau national de suivi à long terme des écosystèmes forestiers (RENECOFOR). Rapport ENGREF, 97 p. + annexes

Dixon, H.K., P.E. Schroeder and J.K. Winjum. 1991. Assessment of promising forest management practices and technologies for enhancing the conservation and sequestration of atmospheric carbon and their costs at the site level. Corvallis, Oregon: US Environmental Protection Agency.

Dixon, R.K., S. Brown, R.A. Houghton, A.M. Solomon, M.C. Trexler and J. Wisniewski. 1994. Carbon pools and flux of global forest ecosystems. Science. 263: 185-190.

Dougherty, P.M., R.O. Teskey, J.E. Phelps and T.M. Hinckley. 1979. Net photosynthesis and early growth trends of a dominant white oak (*Quercus alba* L.). Plant Physiol. 64: 930-935.

Drexhage, M., M. Chauvière, F. Colin and C.N.N. Nielsen. 1999. Development of structural root architecture and allometry of *Quercus petraea*. Can. J. For. Res. 29: 600-608.

Dubroca, E. 1983. Evolution saisonnière des réserves dans un taillis de châtaigniers, *Castanea sativa* Mill., avant et après la coupe. Ph.D. Thesis, Univ. of Paris XI, 209 p.

Duchemin, B., J. Goubier and G. Courrier. 1999. Monitoring phenological key stages and cycle duration of temperate deciduous forest ecosystems with NOAA/ AVHRR data. Remote Sens. Environ. 67: 68-82.

Dyckmans, J. and H. Flessa. 2001. Influence of tree internal N status on uptake and translocation of C and N in beech: a dual 13C and 15N labeling approach. Tree Physiol. 21: 395-401.

Dyckmans, J. and H. Flessa. 2002. Influence of tree internal nitrogen reserves on the responses of beech (*Fagus sylvatica*) trees to elevated atmospheric carbon dioxide concentration. Tree Physiol. 22: 41-49.

Ebringerova, A., Z. Hromadkova and T. Heinze. 2005. Hemicellulose. In Polysaccharides 1: Structure, Characterization and Use. Springer-Verlag, Berlin, pp 1–67.

Eckstein, R.L., P.S. Karlsson and M. Weih. 1999. Leaf life span and nutrient resorption as determinants of plant nutrient conservation in temperate-arctic regions. New Phytol. 143: 177-189.

Edwards, N.T. and P.J. Hanson. 1996. Stem respiration in a closed-canopy upland oak forest. Tree Physiol. 16: 433-439.

Eichhorn, J., P. Roskams and E. Beuker. 2008. Tree vitality and adaptation: planned activities under FutMon. ICP Forests Workshop on Future Forest Monitoring in Europe, 7/8 October 2008.

Ellenberg, H. 1996. Vegetation Mitteleuropas mit den Alpen. 5th Ed., Ulmer, Stuttgart, Germany.

Epron, D. and E. Dreyer. 1993. Long-term effects of drought on photosynthesis of adult oak trees *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L. in a natural stand. New Phytol. 125: 381-389.

Epron, D., D. Godard, G. Cornic and B. Genty. 1995. Limitations of net CO2 assimilation rates by internal resistances to CO2 transfer in leaves of two species (*Fagus sylvatica* L. and *Castanea sativa* Mill.). Plant Cell Env. 18: 43-15.

Esau, K. 1980. Anatomy of seed plants. Mir: Moscow.V. II. pp. 558.

Evans, J.R. 1989. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. Oecologia. 78: 9-19.

Evans, J.R. and J.R. Seemann. 1989. The allocation of protein nitrogen in the photosynthetic apparatus: costs, consequences, and control. *In* Photosynthesis. Ed. W.R. Briggs. Alan R. Liss, New York, pp 183-205.

Feirer, R.P., J.H. Conkey and S.A. Verhagen. 1989. Triglycerides in embryogenic calli: a comparison with zygotic embryos. Plant Cell Rep. 8: 207-209.

Field, C. and H.A. Mooney. 1986. The photosynthesis–nitrogen relationships in wild plants. *In* On the economy of plant form and function. T. Givnish. Cambridge University Press, New York. p. 25-55.

Fischer, C. and W. Höll. 1991. Food reserves of scots pine (*Pinus sylvestris* L.). 1. Seasonal changes in the carbohydrate and fat reserves of pine needles. Trees Struct. Func. 5: 187-195.

Fischer, C. and W. Höll. 1992. Food reserves of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). II. Seasonal changes and radial distribution of carbohydrate and fat reserves in pine wood. Trees 6: 147-155.

Fotelli, M.N., H. Rennenberg and A. Gessler. 2002b. Effects of drought on the competitive interference of an early successional species (*Rubus fruticosus*) on *Fagus sylvatica* L. seedlings: N-15 uptake and partitioning, responses of amino acids and other N compounds. Plant Biol. 4: 311-320.

Fotelli, M.N., M. Rienks, H. Rennenberg and A. Gessler. 2004. Climate and forest management affect ^{15}N-uptake, N balance and biomass of European beech seedlings. Trees. 18: 157-166.

Frak, E., P. Millard, X. Le Roux, S. Guillaumie and R. Wendler. 2002. Coupling sap flow velocity and amino acid concentrations as an alternative method to N-15 labeling for quantifying nitrogen remobilization by walnut trees. Plant Physiol. 130: 1043-1053.

Frak, E., X. Le Roux, P. Millard, S. Guillaumie and R. Wendler. 2005. Nitrogen availability, local light regime and leaf rank effects on the amount of sources of N allocated within the foliage of young walnut (*Juglans nigra * regia*) trees. Tree Physiol. 26: 43-49.

Gallet-Budynek, A., E. Brzostek, V.L. Rodgers, J.M. Talbot, S. Hyzy and A.C. Finzi. 2009. Intact amino acids uptake by northern hardwood and conifer trees. Oecologia. 160: 129-138.

Gansert, D. and W. Sprick. 1998. Storage and mobilization of non- structural carbohydrates and biomass development of beech seed- lings (*Fagus sylvatica* L.) under different light regimes. Trees. 12: 247-257.

Gasson, P. 1987. Some implications of anatomical variations in the wood of pedunculate oak (*Quercus robur* L.), including comparison with common beech (*Fagus sylvatica* L.) IAWA Bull. 8: 149-166.

Gäumann, E. 1935. Der Stoffhaushalt der Buche (*Fagus sylvatica* L.) im Laufe eines Jahres. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 44: 157-334.

Genet, H. 2009. Ageing and site fertility impacts on carbon allocation to growth, carbohydrate storage and reproduction in oak and beech. PhD thesis. Henri Poincaré University, Nancy, France, p.235

Genet, H., N. Bréda and E. Dufrene. 2010. Age-related variation in carbon allocation at tree level and stand scales in beech (*Fagus sylvatica*) and sessile oak (*Quercus petreae* (Matt.) Liebl.) using a chronosequence approach. Tree Physiol. 30: 177-192.

Gessler A., S. Schneider, P. Weber, U. Hanemann and H. Rennenberg. 1998a. Soluble N compounds in trees exposed to high loads of N: a comparison between the roots of Norway spruce (*Picea abies*) and beech (*Fagus sylvatica*) trees grown under field conditions. New Phytol. 138: 385-399.

Gessler, A., H. Rennenberg and C. Keitel. 2004. Stable isotope composition of organic compounds transported in the phloem of European beech- Evaluation of different methods of phloem sap collection and assessment of gradients in carbon isotope composition during leaf-to-stem transport. Plant Biol. 6: 721-729.

Gessler, A., H.M. Duarte, A.C. Franco, U. Lüttge, E.A. de Mattos, M. Nahm, P.J.F.P. Rodrigues, F.R. Scarano and H. Rennenberg. 2005a. Ecophysiology of selected tree species in different plant communities at the periphery of the Atlantic forest of SE-Brazil. III: Three legume trees in a semi-deciduous dry forest. Trees. 19: 523-530.

Gessler, A., M. Schultze, S. Schrempp, H. Rennenberg. 1998c. Interaction of phloem-translocated amino compounds with nitrate net uptake by the roots of beech (*Fagus sylvatica*) seedlings. J. Exp. Bot. 49: 1529-1537.

Gessler, A., P. Weber, S. Schneider and H. Rennenberg. 2003. Bidirectional exchange of amino compounds between phloem and xylem during long-distance transport in Norway spruce trees (*Picea abies* [L.] Karst). J. Exp. Bot. 54: 1389-1397.

Gessler, A., S. Kopriva and H. Rennenberg. 2004. Regulation of nitrate uptake at the whole-tree level: interaction between nitrogen compounds, cytokinins and carbon metabolism. Tree Physiol. 24: 1313-1321.

Gessler, A., S. Schneider, P. Weber, U. Hanemann and H. Rennenberg. 1998b. Soluble N compounds in trees exposed to high loads of N: a comparison between the roots of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst) and beech *(Fagus sylvatica*) trees grown under field conditions. New Phytol. 138: 385-399.

Glass, A.D.M. and M.Y. Siddiqi. 1995. Nitrogen absorption by plant roots. *In* Srivastava H.S., Singh R.P., Eds. Nitrogen Nutrition in Higher Plants. New Delhi: Associated Publishing Co., 21-56.

Glerum, C. and J.J. Balatinecz. 1980. Formation and distribution of food reserves during autumn and their subsequent utilization in jack pine. Can. J. Bot. 58: 40-54.

Gloser, V. 2005. The consequences of low nitrogen availability in autumn for internal nitrogen reserves and spring growth of *Calamagrostis epigejos*. Plant Ecology, 179: 119-126.

Gomez, L. and M. Faurobert. 2002. Contribution of vegetative storage proteins to seasonal nitrogen variations in the young shoots of peach trees (*Prunus persica* L. Batsch.). J. Exp. Bot. 379: 2431-2439.

Granier, A., E. Ceschia, C. Damesin. E. Dufrêne, D. Eprin, P. Gross, S. Lebaube, V. Le Dantec, N. Le Goff. D. Lemoine, E. Lucot, J.M. Ottorini, Y. Pontailler and B. Saugier. 2000b. The carbon balance of a young Beech forest. Funct. Ecol. 14: 312-325.

Granier, A., P. Biron and D. Lemoine. 2000*a*. Water balance, transpiration and canopy conductance in two beech stands. Agric. For. Meteorol. 100:291-308.

Grassi, G., P. Millard, R. Wendler, G. Minotta and M. Tagliavini. 2002. Measurement of xylem sap amino acid concentrations in conjunction with whole tree transpiration estimates spring N remobilization by cherry (*Prunus avium* L.) trees. Plant Cell Environ. 25:1689-1699.

Grigova, M., M. Kubes, N. Drazna., T. Rezanka and H. Lipavska. 2007. Storage lipid dynamics in somatic embruos of Norway spruce (*Picea abies*): histochemical and quantitative analyses. Tree Physiol. 27: 1533 –1540

Grulke, N.E. and W.A. Retzlaff. 2001. Changes in physiological attributes of ponderosa pine from seedling to mature tree. Tree Physiol. 21: 275-286.

Guak, S., D. Neilsen, P. Millard and G.H. Neilsen. 2003. Determining the role of N remobilization for growth of apple (*Malus domestica* Borkh.) trees by measuring xylem-sap flux. J. Exp. Bot. 54: 2121-2131.

Gulmon, S. L. 1983. Carbon and nitrogen economy of *Diplacus aurantiacus*, a Californian Mediterranean-climate drought-deciduous shrub. *In* Mediterranean-Type Ecosystems. The Role of Nutrients. Eds. F.J. Kruger, D.T. Mitchell and J.U.M. Jarvis. Berlin: Springer-Verlag, p.167-176.

Guy, C.L. 2003. Freezing tolerance of plants: current understanding and selected emerging concepts. Can. J. For. Res. 81: 1216-1223.

Hacke, U. and J.J. Sauter. 1996. Xylem dysfunction during winter and recovery of hydraulic conductivity in diffuse-porous and ring-porous trees. Oecologia 105: 425-439.

Hänninen, H. 1990. Modelling bud dormancy release in trees from cool and temperate regions. Acta For. Fen. 213: 1-47.

Hansen J., G. Vogg and E. Beck. 1996. Assimilation, allocation and utilization of carbon by 3-year-old Scots pine (*Pinus sylvestris*) trees during winter and early spring. Trees. 11: 83-90.

Hansen, J. and E. Beck. 1960. The fate and path of assimilation products in the stem of 8 year old Scots pine (*Pinus sylvestris*) L.) trees. Trees. 4: 16-21.

Hansen, J. and I. Moller. 1975. Percolation of starch and soluble carbohydrates from plant tissue for quantitative determination with anthrone. Anal. Biochem. 68: 87-94.

Hansen, P. 1977. Carbohydrate allocation. IN Landsberg J.J., Cutting C.V. Eds Environmental effects on crop physiology. Academic press, London, pp 247- 255.

Hansen, P. and J. Grauslund. 1973. ^{14}C studies on apple trees. VIII. The seasonal variation and nature of reserves. Physiol. Plant. 28: 24-32.

Harrison, R.B., G.G. Reis, M.D.G.F. Reis, A.L. Bernardo and D.J. Firme. 2000. Effect of spacing and age on nitrogen and phosphorous distribution in biomass of *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus pellita* and *Eucalyptus urophylla* plantations in southeastern Brazil. For. Ecol. Manage. 133: 167-177.

Haynes, R.J., 1986. Mineral nitrogen in the plant-soil system. Academic press, Orlando San Diego New York Austin Boston London Tokyo Toronto.

Helinska-Raczkowska, L. 1994. Variation of vessel lumen diameter in radial direction as an indication of the juvenile wood growth in oak (*Quercus petraea* Liebl). Ann. For. Sci. 51: 283-290.

Helmisaari, H.S. 1992. Nutrient retranslocation in three *Pinus sylvestris* stands. For. Ecol. Manage. 51: 347–367.

Hinckley, T.M. and J.P. Lassoie. 1981. Radial growth in conifers and deciduous trees: a comparaison. Mitt. Forstl. Bundesversanst. Wien. 142: 17-56.

Hoch, G. 2005. Fruit-bearing branchlets are carbon autonomous in mature broad-leaved temperate forest trees. Plant Cell Environ. 28: 651-659.

Hoch, G. 2007. Cell wall hemicelluloses as mobile carbon stores in non-reproductive plant tissues. Funct. Ecol. 21: 823-834.

Hoch, G. and C. Körner. 2003. The mobile carbon supply of pines at the climatic treeline: a global comparison. Oecologia. 135: 10-21.

Hoch, G., A. Richter and C. Korner. 2003. Non-structural carbon compounds in temperate forest trees. Plant Cell Environ. 26: 1067-1081.

Hoch, G., P. Marianne and C. Körner. 2002. Altidunal increase of mobile carbon pools in Pinus cembra suggests sink limitation of growth at the Swiss treeline. Oikos. 98: 361-374.

Hoekstra F.A., Golovina E.A., Buitnik J. 2001. Mechanism of plant desiccation tolerance. Trends Plant Sci. 6: 431-438.

Höll, W. 1985. Seasonal fluctuation of reserve materials in the trunkwood of spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. J. Plant Physiol. 117: 355-362.

Höll, W. 1997. Storage and mobilization of carbohydrates and lipids. *In* Trees- Contributions to Modern Tree Physiology. Eds. H. Rennenberg, W. Eschrich and H. Ziegler. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands, pp 197-211.

Hörtensteiner, S. and U. Feller. 2002. Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. J. Exp. Bot. 53: 927-937.

Iivonen, S., S. Kaakinen, A. Jolkkonen, E. Vapaavuori and S. Linder. 2006. Influence of long-term nutrient optimization on biomass, carbon and nitrogen acquisition and allocation in Norway spruce. Can. J. For. Res. 36: 1563-1571.

IPCC. Special report on land use, land-use change and forestry, 1998.

Jeremias, K. 1968. Die Veranderung des Fettgehaltes in Rinden der Pappelsorten Oxford, Rochester und Androscoggin in Verlauf eines Jahres. Mitt. Forstl. Standortskunde Forstpfl. Zucht., 19: 58-66.

Kaakinen, S., A. Jolkkonen, S. Iivonen and E. Vapaavuori. 2004. Growth, allocation and tissue chemistry of *Picea abies* seedlings affected by nutrient supply during the second growing season. Tree Physiol. 24: 707-719.

Kang S.M. and J.S. Titus. 1980. Qualitative and quantitative changes in nitrogenous compounds in senescing leaf and bark tissues of apple. Physiol. Plant. 50: 285-290.

Kang, S.M and J.S. Titus. 1989. Specific proteins may determine maximum cold resistance in apple shoots. J. Hort. Sci. 62: 281-285.

Kang, S.M., K.C. Ko and J.S. Titus. 1982. Mobilization and metabolism of protein and soluble nitrogen during spring growth of apple trees. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 107: 209-213.

Karnik, M.G., R. Bhatia and J. Lal. 1966. Seasonal variation in pine needle oil from *Pinus roxburghii*. Ind. For. 92: 521-522.

Keel, S.G. and C. Schädel. 2010. Expanding leaves of mature deciduous forest trees rapidly become autotrophic. Tree Physiol. 30: 1253-1259.

Kelley, K.R., D.C. Ditsch and M.M. Alley. 1991. Diffusion and automated nitrogen-15 analysis of low-mass ammonium samples. Soil Sc. Soc. Amer. J. 55: 1016-1020.

Killingbeck, KT. 1996. Nutrients in senesced leaves: keys to the search for potential resorption and resorption proficiency. Ecology 77: 1716-1727.

Kilpeläinen, A., H. Peltola, A. Ryppo, K. Sauvala, K. Laitinen and S. Kellomäki. 2003. Wood properties of Scots pines (*Pinus sylvestris*) grown at elevated temperature and carbon dioxide concentration. Tree Physiol. 23: 889-897.

Körner, C. 2003. Carbon limitation in trees. J. Ecol. 91: 4-17.

Kosola, K.R., D.I. Dickmann, E.A. Paul and D. Parry. 2001. Repeated insect defoliation effects on growth, nitrogen acquisition, carbohydrates, and root demography of poplars. Oecologia 129: 65-74.

Kovac, M. and I. Kregar. 1989. Starch metabolism in silver fir seed during germination. Plant Physiol. Biochem. 27: 873-880.

Koyama, L., N. Tokuchi, K. Fukushima, M. Terai and Y. Yamamoto. 2008. Seasonal changes in nitrate use by three woody species: the importance of the leaf expansion period. Trees. 22: 851-859.

Kozlowski , T.T. 1992. Carbohydrate sources and sinks in woody plants. Bot. Rev. 58: 107-222.

Kozlowski, T.T. 1971. Leaf growth and development. *In* Kozlowski T.T. (Ed.), Growth and development of trees. Volume I. Seed germination, ontogeny, and shoot growth. Academic Press, London, UK, pp. 207-244.

Kozlowski, T.T. and S.G. Pallardy. 1991. Physiology of woody plants. 2nd Eds. Academic Press, San Diego.

Kozlowski, T.T. and S.G. Pallardy. 1997. Physiology of Woody Plants (2nd Eds.). Academic Press, San Diego.

Kozlowski, T.T., P.J. Kramer and S.G. Pallardy. 1991. The physiological ecology of woody plants. Academic Press, San Diego, CA.

Kramer, K. 1995. Phenotypic plasticity of the phenology of 7 europoean tree species in relation to climatic warming. Plant Cell Environ. 18: 93-104.

Kramer, P. J. and T.T. Koslowski. 1979. Physiology of woody plants. Academic Press, London. 811 p.

Kramer, P.J. and T.T. Kozlowski. 1960. Physiology of trees. McGraw Hill Book Company, New York. USA. 642 p.

Krasowski, M.J. and J.N. Owens. 1993. Ultrastructural and histochemical postfertilization megagametophyte and zygotic embryo development of white spruce (*Picea glauca*) emphasizing the deposition of seed storage products. Can. J. Bot. 71: 98-112.

Kreuzwieser, J., C. Herschbach, I. Stulen, P. Wiersema, W. Vaalburg and H. Rennenberg. 1997. Interactions of NH_4^+ and L-glutamate with NO_3^- transport processes of non-mycorrhizal *Fagus sylvatica* roots. J. Exp. Bot. 48: 1431-1438.

Lachaud, S. and J.L. Bonnemain. 1981. Xylogénèse chez les Dicotylédones arborescentes. I. Modalités de la remise en activité du cam- bium et de la xylogénèse chez les Hêtres et les Chênes âgés. Can. J. Bot. 59: 1222-1230.

Lacointe A. 2001. Gestion et dynamique inter-annuelle des réserves. Premières Rencontres d'Ecophysiologie de l'Arbre. Ecole thématique (INRA), Autrans, 16 – 19 janvier 2001.

Lacointe, A. 2000. Carbon allocation among tree organs: a review of basic processes and representation in functional–structural tree models. Ann. For. Sci. 57: 521-533.

Lacointe, A., A. Kajji, F.A. Daudet, P. Archer and J.S. Frossard. 1993. Mobilization of carbon reserves in young walnut trees. *In* Cambium, Production de Bois et Développement de l'Arbre. Eds. A.M. Catesson and S. Lachaud. Acta Bot. Gall. 140: 435-441.

Lacointe, A., E. Deléens, T. Améglio, B. Sainte-Joanis, C. Lelarge, M. Vandame, G.C. Song and F.A. Daudet. 2004. Testing the branch autonomy theory: a 13C /14C double-labelling experiment on differentially shaded branches. Plant Cell Environ. 27: 1159-1168.

Lacointe, A., J.J. Sauter, T. Améglio, U. Harms, V. Pellicer and J.S. Frossard. 1994. Carbohydrate and protein reserves in trees. EUROSILVA. Contribution to forest tree physiology. Dourdan (France), 7-10 novembre 1994. Les colloques n°76 (Eds. H. Sandermann Jr, M. Bonnet-Masimbert, Ed. INRA, Paris) pp 273- 296.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.

Landmann, G., E. Ulrich and M. Kaennel. 1991. Les emissions d'ammoniac: leurs origines et leur effet sur les ecosytèmes forestiers. Rapport programme DEFORPA.

Langheinrich, U. 1993. Clonal variation in apical growth and content in vegetative storage proteins in *Populus*. Trees Struct. Func. 7: 242-249.

Langheinrich, U. and R. Tischner. 1991. Vegetative storage proteins in poplar: induction and characterization of a 32- and 36-kilodalton polypeptide. Plant Physiol. 97: 1017-1025.

Lanier, L. 1994. Précis de sylviculture. 2ème edition. ENGREF, Nancy, 477 p.

Larcher, W. 2003. Physiological Plant Ecology. 4th edition. Eds. Berlin. Springer. pp 513.

Lavarenne, S., P. Champagnat and P. Barnola. 1971. Croissance rythmique de quelques végétaux ligneux de regions tempérées, cultivés en chambres climatisées à température élevée et constante et sous diverses photopériodes. Bull. Soc. Bot. Fr. 118: 131-162.

Lawrence, S.D., J.E.K. Cooke, J.S. Greenwood, T.E. Korhnak and J.M. Davis. 2001. Vegetative storage protein expression during terminal bud formation in poplar. Can. J. For. Res. 31: 1098-1103.

Lawrence, S.D., J.S. Greenwood, T.E. Korhnak and J.M. Davis. 1997. A vegetative storage protein homolog is expressed in the growing shoot apex of hybrid poplar. Planta 203: 237-244.

Le Roux, X., A. Lacointe, A. Escobar-Gutierrez and S. Le Dizès. 2001. Carbon-based models of individual tree growth: a critical appraisal. Ann. For. Sci. 58: 469-506.

Lebaube, S., N. Le Goff, J.M. Ottorini and A. Granier. 2000. Carbon balance and tree growth in a Fagus sylvatica stand. Ann. For. Sci. 57: 49-61.

Lebedenko, L.A. 1966. Hystochemical characteristics of processes of growing together of larch inoculations. *In* Collected scientific-investigated works on forestry. Leningrad, 133-137.

Lebourgeois F., J. Differt, A. Granier, N. Bréda and E. Ulrich. 2002. Initial phenological observations on the stands in the national long term monitoring network of forest ecosystems (RENECOFOR). Revue Forestière Française (Nancy). 54: 407-418.

Lebourgeois, F., A. Granier and N. Bréda. 2001. Une analyse des changements climatiques régionaux en France entre 1956 et 1997. Réflexions en terme de conséquences pour les écosystèmes forestiers. Ann. Sci. For. 58: 733-753.

Lennartsson, M. 2003. Cold hardening and dehardening in *Salix*. De- partment of Forest Genetics and Plant Physiology, Swedish University of Agricultural Science, Umea, 39 p.

Lennartsson, M. and E. Ögren. 2003. Predicting the cold hardiness of willow stems using visible and near-infrared spectra and sugar concentrations. Trees 7: 463-377.

Leuschner, C. 1994. Walddynamik auf Sandböden in der Lüneburger Heide, NW-Deutschland. Phytocoenol. 22: 289-324.

Leuschner, C. 2000. Root competition between beech and oak: a hypothesis changes in forest ecosystem function with succession in the Lüneburger Heide. *In*: Tenhumen, J., Lenz, R., Hantschel *Eds*. Ecosystem approaches to landscape management in central Europe. Ecological studies. Springer, Berlin.

Leuschner, C., K. Backes, D. Hertel, F. Schipka, U. Schmitt, O. Terborg and M. Runge. 2001. Drought responses at leaf, stem and fine root levels of competitive *Fagus sylvatica* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. Trees in dry and wet years. For. Ecol. Manage. 149: 33-46.

Lewis, O.A.M. 1986. Plant and Nitrogen: Studies in Biology. Arnold E, Baltimore.

Liu, S.B., X.C. Chang, M.J. Shi, Y.Y. Chen, Z.H. Hu and W.M. Tian. 2009. Vegetative storage protein with trypsin inhibitor activity in *Sapindus Mukorasi*, a Sapindaceae deciuous tree. J. Integ. Plant Biol. 51: 352-359.

Lotova, L.I. 1987. Anatomy of conifers bark. Nauka, Moscow. pp. 150.

Ludovici K.H., H.L. Allen, T. J. Albaugh and P.M. Dougherty. 2002. The influence of nutrient and water availability on carbohydrate storage in loblolly pine. For. Ecol. Manage. 159: 261-270.

Magel, E., C. Hillinger, W. Höll, and H. Weigler. 1997. Biochemistry and physiology of heartwood formation: role of reserve substances. *In* trees: Contribution to Modern Tree Physiology. Eds. H. Rennenberg, W. Eschrich and H. Zeigler. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands. pp. 477-506.

Maier, C.A., S.J. Zarnoch and P.M. Dougherty. 1998. Effects of temperature and tissue nitrogen on dormant season stem and branch maintenance respiration in a young loblolly pine (*Pinus taeda*) plantation. Tree Physiol. 18: 11-20.

Maillard, P., D. Garriou, E. Deléens, P. Gross and J.M. Guehl. 2004. The effects of lifting on mobilization and new assimilation of C and N during regrowth of transplanted Corsican pine seedlings. A dual 13C and 15N labelling approach. Ann. For. Sci. 61: 795-805.

Malaguti, D., P. Millard, R. Wendler, A. Hepburn and M. Tagliavini. 2001. Translocation of amino acids in the xylem of apple (*Malus domestica* Borkh.) trees in spring as a consequence of both N remobilization and uptake by root. J. Exp. Bot. 52: 1665-1671.

Marcais, B. and N. Bréda. 2006. Role of an opportunistic pathogen in the decline of stressed oak trees. J. Ecol. 94: 1214-1223.

Marschner, H. and B. Dell. 1994. Nutrient uptake in mycorrizal symbiosis. Plant Soil. 159: 89-102.

Marmann P., R. Wendler, P. Millard and H. Heilmeier. 1997. Nitrogen storage and remobilisation in ash (*Fraxinus excelsior*) under field and laboratory conditions. Trees. 11: 298-305.

Martin, J.G., B.D. Kloeppel, T.L. Schaefer, D.L. Kimbler and S.G. McNulty. 1998. Aboveground biomass and nitrogen allocation of ten deciduous southern Appalachian tree species. Can. J. For. Res. 28: 1648-1659.

Martinez-Trinidad, T., W.T. Watson, M.A. Arnold, and L. Lombardini. 2009b. Investigations of exogenous applications of carbohydrates on the growth and vitality of live oaks. Urb. For. Urb. Green. 8: 41-48.

Martinez-Trinidad, T., W.T. Watson, M.A. Arnold, L. Lombardini and D.N. Appel. 2009c. Carbohydrate injections as a potential option to improve growth and vitality of live oaks. Arbori. Urb. For. 35: 142-147.

Martinez-Trinidad, T., W.T. Watson, M.A. Arnold, L. Lombardini and D.N. Appel. 2010. Comparing various techniques to measure tree vitality of live oaks. Urb. For. Urb. Green. 9: 199-203.

Masclaux C., I. Quilleré, A. Gallais and B. Hirel. 2001. The challenge of remobilisation in plant nitrogen economy. A survey of physio-agronomic and molecular approaches. Ann. Appl. Biol. 138: 69-81.

M^{c}Cullough, D.G. and M.R. Wagner. 1987. Evaluation of four techniques to assess vigor of water-stressed ponderosa pine. Can. J. For. Res. 17: 138-145.

May, C., G. Schmidt and G. Gebauer (1996) The fate of [N-15]ammonium and [N-15]nitrate in the soil of a 140-year-old spruce. Isotopes in environmental and health studies 32: 149-158.

Mead, D.S. and W.L. Pritchett. 1975. Fertilizer movement in a slash pine ecosystem 11. N distribution after two growing seasons. Plant Soil 43:4677478.

Migita, C., Y. Chiba and T. Tange. 2007. Seasonal and spatial variations in leaf nitrogen content and resorption in a *Quercus serrata* canopy. Tree Physiol. 27: 63-70.

Millard, P. 1988. The accumulation and storage of nitrogen by herbaceous plants. Plant Cell Environ.11: 1-8.

Millard, P. 1993. A review of internal cycling of nitrogen within trees in relation to soil fertility. *In* Optimization of plant nutrition, MAC Fragoso and ML Van Beusichem, Eds Kluwer academic publishers. The Netherlands, pp 623-628.

Millard, P. 1994. Measurement of the remobilization of nitrogen for spring leaf growth of trees under field conditions. Tree Physiol. 14: 1049-1054.

Millard, P. 1996. Ecophysiology of internal cycling of nitrogen for tree growth. Zeitschrift für Pflanzenernährung & Bodenkunde, 159: 1-10.

Millard, P. and C.M. Thomson. 1989. The effect of autumn senescence of leaves on the internal cycling of nitrogen for the spring growth of apple trees. J. Exp. Bot. 40: 1285-1289.

Millard, P. and G.A. Grelet. 2010. Nitrogen storage and remobilization by trees: ecophysiological relevance in a changing world. Tree Physiol. 30: 1083-1095.

Millard, P. and G.H. Neilsen. 1989. The influence of nitrogen supply on the uptake and remobilization of stored N for the seasonal growth of apple trees. Ann. Bot. 63: 301-309.

Millard, P. and M.F. Proe. 1991. Leaf demography and the seasonal internal cycling of nitrogen in sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) seedlings in relation to nitrogen supply. New Phytol. 117: 587-596.

Millard, P. and M.F. Proe. 1992. Storage and internal cycling of nitrogen in relation to seasonal growth of Sitka spruce. Tree Physiol. 10:33-43.

Millard, P. and M.F. Proe. 1993. Nitrogen uptake, partitioning and internal cycling in *Picea sitchensis* (Bog.) Carr. as influenced by nitrogen supply. New Phytol. 125: 113-119.

Millard, P., A. Hester, R. Wendler and G. Baillie. 2001. Interspecific defoliation responses of trees depend on sites of winter nitrogen storage. Funct. Ecol. 15: 535-543.

Millard, P., M. Sommerkorn and G.A. Grelet. 2007. Environmental change and carbon limitation in trees: a biochemical, ecophysiological and ecosystem appraisal. New Phytol. 175: 11-28.

Millard, P., R. Wendler, A. Hepburn and A. Smith. 1998. Variations in the amino acid composition of xylem sap of *Betula pendula* Roth. trees due to remobilization of stored N in the spring. Plant Cell Environ. 21: 715-722.

Millard, P., R. Wendler, G. Grassi, G.-A. Grelet and M. Tagliavini. 2006. Translocation of nitrogen in the xylem of field-grown cherry and poplar trees during remobilisation. Tree Physiol. 26: 527-536.

Miller, H.G and J.D. Miller. 1987. Nutritional requirements of Sitka spruce. Proc. R. Soc. Edinb. 85B: 83-96.

Miller, H.G. 1986. Carbon x nutrient interactions-the limitations to productivity. Tree Physiol. 2: 373-385.

Monson, R.K., T.N. Rosenstiel, T.A. Forbis, D.A. Lipson and C.H. Jaeger. 2006. Nitrogen and carbon storage in alpine plants. Integ. Comp. Biol. 46: 35-48.

Morin, X., T. Ameglio, R. Ahas, C. Kurz-Besson, V. Lanta, F. Le Bourgeois, F. Miglietta and I. Chuine. 2007. Variation in cold hardiness and carbohydrate concentration from dormancy induction to bud burst among provenances of three European oak species. Tree Physiol. 27: 817-825.

Mortier, F. 1995. Le CO_2 et la forêt. Bulletin Technique de l'ONF N° 29.

Muller, B, B. Touraine and H. Rennenberg. 1996. Interaction between atmospheric and pedospheric nitrogen nutrition in spruce (*Picea abies* L. Karst) seedlings. Plant Cell Environ. 19: 345-355 .

Muller, B. and B. Touraine. 1992. Inhibition of nitrate uptake by various phloem-translocated amino acids in soybean seedlings. J. Exp. Bot. 43: 617-623.

Munns, R. 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together. New Phytol. 167, 645-663.

Murray M., M. Cannell and R. Smith. 1989. Date of budburst of 15 tree species in Britain following climatic warming. J. Appl. Ecol. 26: 693-700.

Nabuurs, G.J., R. Päivinen, R. Sikkema and G.M. Mohren. 1997. The role of European forests in the global carbon cycle: a review, Biom. Bioen. 13: 345-358.

Nambiar, E.K.S. and D.N. Fife. 1987. Growth and nutrient retranslocation in needles of radiata pine in relation to nitrogen supply. Ann. Bot. 60: 147-156.

Nambiar, E.K.S. and D.N. Fife. 1991. Nutrient retranslocation in temperate conifers. Tree Physiol. 9: 185-207.

Näsholm, T., A. Nordin, A.B. Edfast and P. Hogberg. 1997. Identification of coniferous forestry in the incipient nitrogen saturation through analysis of arginine and nitrogen-15 abundance of trees. J. Env. Qual. 26: 302-309.

Neilsen, D., P. Millard, G.H. Neilsen and E.J. Hogue. 1997. Sources of N used for leaf growth in a high density apple (*Malus domestica*) orchard irrigated with ammonium nitrate solution. Tree Physiol. 17: 733-739.

Nelson, E.A. and R.E. Dickson. 1981. Accumulation of food reserves in cottonwood stems during dormancy induction. Can. J. For. Res. 11: 145-154.

Newell, E.A., S.S. Mulkey and S.J. Wright. 2002. Seasonal patterns of carbohydrate storage in four tropical tree species. Oecologia 131: 333-342.

Nguyen, P.V., D.I. Dickmann, K. Pretgtizer and R. Hendrick. 1990. Late-season changes in allocation of starch and sugar to shoots, coarse roots and fine roots in two hybrid poplar clones. Tree Physiol. 113: 503 510.

Nielsen, T.H., U. Deiting and M. Stitt. 1997. A β-amylase in potato tubers in induced by storage at low temperature. Plant Physiol. 113: 503-510.

Noh, N.J., Y. Son, R.H. Kim, K.W. Son, J.W. Koo, I.H. Park, Y.J. Lee, K.H. Lee and Y.M. Son. 2007. Biomass accumulations and the distribution of nitrogen and phosphorus within three *Quercus acutissima* stands in central Korea. J. Plant Biol. 50: 461-466

Noh, N.J., Y. Son, S.K. Lee, K.W. Seo, S.J. Heo, M.J. Yi, P.S. Park, R.H. Kim, Y.M. Son and K.H. Lee. 2010. Carbon and nitrogen storage in an age-sequence of *Pinus densiflora* stands in Korea. Sci. China. 53: 822-830.

Nomura, K., A. Ikegami, A. Koide and F. Yagi. 2007. Glutathione transferase, but not agglutinin, is a dormancy-related protein in *Castanea crenata* trees. Plant Physiol. and Biochem. 45: 15-23.

Nomura, K., A. Ikegami, A. Koide and F. Yagi. 2008. Japanese chestnut (*Castanea crenata*) agglutinin may have a role as vegetative storage protein. J. Plant Physiol. 165: 671-675.

Ögren, E. 1999. Fall frost resistance in willows used for biomass production. II. Predictive relationships with sugar and dry matter content. Tree Physiol 19: 755-760.

Ögren, E. 2000. Maintenance respiration correlates with sugar but not nitrogen concentration in dormant plants. Physiol. Plant. 108: 295-299.

O'Kennedy, B.T. and J.S. Titus. 1979. Isolation and mobilization of storage proteins from apple shoot bark. Physiol. Plant. 45: 419-424.

Oribe, Y., R. Funada, M. Shibagaki and T. Kubo. 2001. Cambial reactivation in locally heated stems of the evergreen conifer *Abies sachalintensis* (Schmidt) Masters. Planta. 212: 684-691.

Osaki, M., S. Yamada and T. Tadano. 1995. Effect of sink manipulation on nitrogen accumulation and distribution among organs of *gramineae* and *leguminosae*, Soil Sci. Plant Nutr. 41: 33-44.

Ottorini, J.M. and N. Le Goff. 1998. Biomasses aériennes et racinaires et accroissements annuels en biomasse dans le dispositif écophysiologique de la Forêt de Hesse. Rapport scientifique annuel, convention de recherche ONF-INRA 'Etude de la croissance du hêtre sur le plateau Lorrrain'.

Overgaard, R., P. Gemmel and M. Karlsson. 2007. Effects of weather conditions on mast year frequency in beech (*Fagus sylvatica* L.) in Sweden. Forestry. 80: 553-563.

Pagter, M., C.R. Jensen, K.K. Petersen, F. Lui and R. Arora. 2008. Changes in carbohydrates, ABA and bark proteins during seasonal acclimation and deacclimation in *Hydrangea* species differing in cold hardiness. Physiol. Plant. 134: 473-485.

Palacio, S., A.J. Hester, M. Maestro and P. Millard. 2008. Browsed *Betula pubescens* trees are not carbon-limited. Funct. Ecol. 22: 808-815.

Palacio, S., M. Maestro and G. Montserrat-Marti. 2007. Seasonal dynamics of non structural carbohydrates in two species of med- iterranean sub-shrubs with different leaf phenology. Env. Exp. Bot. 59: 34-42.

Palonen, P., Buszard, D. and D. Donnelly. 2000. Changes in carbohydrates and freezing tolerance during cold acclimation of red raspberry cultivars grown in vitro and in vivo. Physiol. Plant. 110: 393-401.

Percival, G.C. and G.A. Fraser. 2005. Use of sugars to improve root growth and increase transplant success of birch (*Betula pendula* Roth). J. Arbor. 31: 66-77.

Peuke, A. 2000. The chemical composition of xylem sap in *Vitis vinifera* L. cv. Riesling during vegetative growth on three different Franconian vineyard soils and as influenced by nitrogen fertilizer. Am. J. Enol. Viticul. 51: 329-339.

Pfanz, H., G. Aschan, R. Langenfeld-Heyser, C. Wittmann and M. Loose. 2002. Ecology and ecophysiology of tree stems: corticular and wood photosynthesis. Naturwiss. 89: 147-162.

Piispanen, R. and P. Saranpää. 2001. Variation of non-structural carbohydrates in silver birch (*Betula pendula* Roth) wood. Trees 15: 444-451.

Pisek, A. and W. Tranquillini. 1959. Sind unsere immergrünen Nadelhölzer auch im Winter tätig? – Umschau 2: 44-46.

Plassard, C., B. Bonafos and B. Touraine. 2000. Differential effects of mineral and organic N sources, and of ectomycorrhizal infection by *Hebeloma cylindrosporanum*, on growth and N utilization in *Pinus pinaster*. Plant Cell Environ. 23: 1195-1205.

Plomion, C., G. Leprovost and A. Stockes. 2001. Wood formation in trees.Plant Physiol. 127: 1513-1523.

Poirier M., A. Lacointe and T. Améglio. 2010. A semi-physiological model of cold hardening and dehardening in walnut stem. Tree Physiol. 30: 1555-1569.

Poirier, M. 2008. Etude écophysiologique de l'endurcissement au gel des arbres. Impact des conditions estivales de croissance sur la résistance au gel des arbres. Thèse de Doctorat, Université Blaise Pascal, Clermont. 314 p.

Pomeroy, M.K., D. Simonovitch and F. Wightman. 1970. Seasonal biochemical changes in the living bark and needles of red pine (*Pinus resinosa*) in relation to adaptation to freezing. Can. J. Bot. 48: 953-967.

Prima Putra D. and B. Botton. 1998. Organic and inorganic com- pounds of xylem exudates from five woody plants at the stage of bud breaking. J. Plant Physiol. 153: 670-676.

Proe, M.F. and P. Millard. 1994. Relationships between nutrient supply, nitrogen partitioning and growth in young Sitka spruce seedlings. Plant Soil. 168/169: 313-317.

Rameau, J.C., D. Mansion and G. Dumé. 1989. Flore forestière française. 1 Plaine et collines. IDF Eds., 1785 p.

Rappoport, H.F. and R.S. Loomis. 1985. Interaction of storage root and shoot of grafted sugarbeet and chard. Crop Sci. 25: 1074-1084.

Regier, N., S. Streb, S.C. Zeeman and B. Frey. 2010. Seasonal changes in starch and sugar content of poplar (*Populus detoides* x *nigra* cv. Dorskam) and the impact of stem girdling on carbohydrate allocation to roots. Tree Physiol. 30: 979-987.

Regina, I.S. 2000a. Organic matter distribution and nutrient fluxes within a sweet chestnut (*Castane sativa* Mill.) stand of the Sierra de Gata, Spain. Ann. For. Sci. 57: 691-700.

Regina, I.S. 2000b. Biomass estimation and nutrient pools in four *Quercuc pyrenica* in Sierra de Gata Mountains, Salamanca, Spain. For. Ecol. Manage. 132 : 127-141.

Reich, P.B., B.D. Kloeppel, D.S. Ellsworth and M.B. Walters. 1995. Different photosynthesis–nitrogen relations in deciduous hardwood and evergreen coniferous tree species. Oecologia, 104: 24-30.

Renaud J. P. and Y. Mauffette 1991. The relationships of crown dieback with carbohydrate content and growth of sugar maple (*Acer saccharum*). Can. J. For. Res. 21: 1111-1117

Renault, S. and J.J. Zwiazek. 1997. Cell wall composition and elasticity of dormant and growing white spruce (*Picea glauca*) seedlings. Physiol. Plant. 101: 323-327.

Rennenberg H. and A. Gesssler. 1999. Consequences of N deposition to forest ecosystems – recent results and future research needs. Water Air Soil Poll. 116: 47-64.

Rennenberg H., K. Kreutzer, H. Papen and P. Weber. 1998. Consequences of high loads of nitrogen for spruce (*Picea abies*) and beech (*Fagus sylvatica*) forests. New Phytol. 139: 71-86.

Rennenberg H., S. Schneider and P. Weber. 1996. Analysis of uptake and allocation of nitrogen and sulphur compounds by trees in the field. J. Exp. Bot. 47: 1491-8.

Rennenberg, H., H. Wildhagen and B. Ehlting. 2010. Nitrogen nutrition of poplar trees. Plant Biol. 12: 275-291.

Rennenberg, H., K. Kreutzer, H. Papen, and P. Weber. 1998. Consequences of high loads of nitrogen for spruce (*Picea abies*) and beech (*Fagus sylvatica*) forests. New Phytol. 139: 71-86.

Rennenberg, H., M. Dannenmann, A. Gessler, J. Kreuzwieser, J. Simon and H. Papen. 2009. Nitrogen balance in forest soils: nutritional limitation of plants under climate change stresses. Plant Biol. 11: 4-23.

Repo, T., K. Mononen, L. Alvila, T.T. Pakkanen and H. Hänninen. 2008. Cold acclimation of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) at its northernmost distribution range. Env. Exp. Bot. 63: 59-70.

Repyakh, S.M., N.N. Chuprova and N.D. Barabash. 1983. Extractive substances of tree green. Wood Chem. 4: 62-64.

Riedacker, A. 1981. Le hêtre: croissance aérienne et souterraine. Institut national de la recherché agronomique. p: 160-168.

Roberntz, P. and S. Linder. 1999. Effects of long-term CO_2 enrichment and nutrient availability in Norway spruce. II. Foliar chemistry. Trees 14: 17-27.

Roberts, D.R., P. Toivonen and S.M. M^{c}Innis. 1991. Discrete proteins associated with overwintering of interior spruce and Douglas-fir seedlings. Can. J. For. Res. 69: 437-441.

Rohde, M., R. Waldmann and J. Lunderstadt. 1996. Induced defence reaction in the phloem of spruce (*Picea abies*) and larch (*Larix decidua*) after attack by *Ips typographus* and *Ips cembrae*. For. Ecol. Manage. 86: 51-59.

Rowland, A.J., A.M. Borland and P.J. Lea. 1988. Changes in amino acids, amines, and proteins in response to air pollutants. In *Air Pollution and Plant Metabolism*, Eds. S. Schulte-Hostede, N.M. Darrall, L.W. Blank and A. R. Wellburn. Elsevier, London, pp. 189-221.

Rowland, L.J. and R. Arora. 1997. Proteins related to endodormancy (rest) in woody perennials. Plant Science**.** 126: 119-144.

Rubchevskaya, L.P. and E.D. Levin. 1981. About neutral lipids of cambial zone of Siberian larch. Wood Chem. 4: 106-109.

Rubchevskaya, L.P. and E.D. Levin. 1982. About acylglycerols of cambial zone of Siberian larch. Wood Chem. 1: 107-109.

Ryan, M.G. 1991. The effect of climate change on plant respiration. Ecol. Appl. 1: 157-167.

Ryan, M.G. 1995. Foliar maintenance respiration of subalpine and boreal trees and shrubs in relation to nitrogen content. Plant Cell Environ. 18: 765-772.

Ryan, M.G., R.M. Hubbard, S. Pongracic, R.J. Raison and R.E. McMurtrie. 1996. Foliage, fine-root, woody-tissue and stand transpiration in *Pinus radiata* in relation to nitrogen status. Tree Physiol. 16: 333-343.

Sakai, A. and W. Larcher. 1987. Frost survival of plants. Ecol. Stud., 62: 1-340.

Samuelson LJ, Kelly JM. 1996. Carbon partitioning and allocation in northern red oak seedlings and mature trees in response to ozone. Tree Physiol. 16: 853-858.

Sanchez, E.E., T.L. Righetti, D. Sugar, and P.B. Lombard. 1991. Recycling of nitrogen in field-grown ‘Comice’ pears. J. Hortic. Sci. 66: 479-486.

Saranpää P. and R. Piispanen. 1994. Variation in the amount of triacylglycerols and steryl esters in the outer sapwood of *Pinus sylvestris* L. Trees. 8: 228-231.

Saranpää, P. and H. Nyberg. 1987. Seasonal variation of neutral lipids in *Pinus sylvestris* L. sapwood and heartwood. Trees. 1: 139-144.

Saranpää, P. and W. Höll. 1989. Soluble carbohydrates of *Pinus sylvestris* L. sapwood and heartwood. Trees 3:138-143.

Sauter J.J., van Cleve B. 1990. Biochemical, immunochemical, and ultrastructural studies of protein storage in poplar (Populus · canadensis 'robusta') wood. Planta, 183, 92–100.

Sauter, J.J. 1981. Season variation in amino acids and amides in the xylem sap of *Salix*. Zeitschnift für Pflanzenphysiologie. 98: 377-391.

Sauter, J.J. 1988. Temperature-induced changes in starch and sugars in the stem of *Populus* × *canadensis ‹robusta›*. J. Plant Physiol. 132: 608-612.

Sauter, J.J. and B. Van Cleve. 1994. Storage, mobilization and interrelation of starch, sugars, protein and fat in the ray storage tissue of poplar trees. Trees 8: 297-304.

Sauter, J.J. and S. Wellenkamp. 1998. Seasonal changes in content of starch, protein and sugars in the wood of *Salix caprea* L. Holzforschung 52: 255-262.

Sauter, J.J. and U. Neumann. 1994. The accumulation of storage materials in ray cells of poplar wood (*Populus * Canadensis robusta*): effect of ringing and defoliation. J. Plant Physiol. 143: 21-26.

Sauter, J.J. and W. Witt. 1997. Structure and function of rays: storage, mobilization, trasport. *In*: Trees, contribution to modern tree physiology. Eds H. Rennenberg, W. Eschrich W and H. Zeigler. Bankhuys, Leiden, The Netherlands, pp 177- 195

Sauter, J.J., and B. Van Cleve B. 1992. Seasonal variation of amino acids in the xylem sap of ''*Populus * canadensis*'' and its relation to protein body mobilization. Trees Struct. Func. 7: 26-32.

Sauter, J.J., B. Van Cleve and K. Apel. 1988. Protein bodies in ray cells of *Populus * canadensis* Moench ''*robusta*''. Planta. 173: 31-34.

Sauter, J.J., B. van Cleve and S. Wellenkamp. 1989. Ultrastructural and biochemical results on the localization and distribution of storage proteins in a poplar tree and in twigs of other tree species. Holzforschun. 43: 1-6.

Saxe, H., D. Ellsworth and J. Heath. 1998. Tree and forest functioning in an enriched CO_2 atmosphere. Transley Review N° 98. New Phytol. 139: 395-436.

Schaberg, P.G., M.C. Snyder, J.B. Shane and J.R. Donnelly. 2000. Seasonal patterns of carbohydrates reserves in red spruce seedlings. Tree Physiol. 20: 549-555.

Schädel, C., A. Blöchl, A. Richter and G. Hoch. 2009. Short-term dynamics of non-structural carbohydrates and hemicelluloses in young branches of temperate forest trees during bud break. Tree Physiol. 29: 901-911.

Schneider, A., J. Kreuzwieser, R. Schupp, J.J. Sauter and H. Rennenberg. 1994. Thiol and amino acid composition of the xylem sap of poplar trees (*Populus * canadensis 'robusta'*). Can. J. Bot. 72: 347-351.

Schneider, S., A. Gessler, P. Weber, D. Von Sengbusch, U. Hanemann and H. Rennenberg. 1996. Soluble N compounds in trees exposed to high loads of N: a comparison of spruce (*Picea abies*) and beech (*Fagus sylvatica*) grown under field conditions. New Phytol. 134: 103-114.

Schneider, S.H. 1989. The greenhouse effect; science and policy. Science. 243: 771-781.

Schrader, S. and J.J. Sauter. 2002. Seasonal changes of sucrose-phosphate synthase and sucrose synthase activities in poplar wood (*Populus * canadensis* Moench '*robusta*') and their possible role in carbohydrate metabolism. J. Plant Physiol. 159: 833-843.

Schulman, E. 1958. Bristlecone pine, oldest known living thing. Natl. Geogr. Mag. 113: 355-372.

Sharkov, V.I. and E.S. Tsvetkova. 1950. Change of chemical composition of wood during process of its growing. Trudi VNIIGIS, 3: 69-84.

Sharma, S.S. and K.J. Dietz. 2006. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. J. Exp. Bot. 57: 711-726.

Shim, K.K., J.S. Titus and W.E. Splittstoesser. 1972. The utilization of post-harvest urea sprays by senescing apple leaves. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 97: 552-596.

Shweingruber, F.H. 1988. Tree rings. Basic and applications of dendrochronology. D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland. 276 p.

Silla, F. and A. Escudero. 2003. Uptake, demand and internal cycling of nitrogen in saplings of Mediterranean *Quercus* species. Oecologia 136: 28-36.

Silpi, U., A. Lacointe, P. Kasempsap, S. Thanysawanyangkura, P. Chantuma, E. Gohet, N. Musigamart, A. Clément, T. Améglio and P. Thaler. 2007. Carbohydrate reserves as a competing sink: evidence from tapping rubber trees. Tree Physiol. 27:881-889.

Siminovitch, D., B. Rheaume, K. Pomeroy and M. Lepage. 1968. Phospholipids, protein and nucleic acid increases in protoplasm and membrane structures associated with development of extreme freezing resistance in bark locust tree cells. Cryobiology, 5: 202-225.

Sinnott, E.W. 1918. Factors determining character and distribution of food reserves in woody plants. Bot. Gaz. 66: 162 -175.

Skeffington, R.A. and E.J. Wilson. 1988. Excess nitrogen deposition: Issues for consideration. Envir. Pollution. 54: 159-184.

Sorensen, P. and E. Steen Jensen. 1991. Sequential diffusion of ammonium and nitrate from soil extracts to polytetrafluoroethylene trap for ^{15}N determination. Analytica Chimica Acta. 252: 201-203.

Spann, T.M., R.H. Beede and T.M. De Jong. 2008. Seasonal carbohydrate storage and mobilization in bearing and non-bearing pistachio (*Pistacia vera*) trees. Tree Physiol. 28: 207-213.

Stassen, P.J.C., D.K. Strydom and H.W. Stindt. 1981. Seasonal changes in carbohydrate fractions of young kakamas peach trees. Agroplantae. 13: 47-53.

Staswick, P. E. 1994. Storage proteins of vegetative plant tissue. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 45: 303-322.

Staswick, P.E. 1989. Developmental regulation and the influence of plant sinks on vegetative storage protein gene expression in soybean leaves. Plant Physiol. 89: 309-315.

Staswick, P.E. 1994. Storage proteins of vegetative plant tissue. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 45: 303-322.

Stepien V., J.J. Sauter and F. Martin. 1994. Vegetative storage proteins in woody plants. Plant Physiol. Biochem. 32:185-192.

Stepien, V. and F. Martin. 1992. Purification, characterization and localization of the bark storage proteins of poplar. Plant Physiol. Biochem. 30: 399-407.

Stepien, V. and J.J. Sauter. 1994. Ringing induces the accumulation of vegetative storage proteins in poplar bark. Trees Struct. Func. 9: 88-92.

Stoerner, H., B. Seith, U. Hanemann, E. George and H. Rennenberg. 1997. Nitrogen distribution in young Norway spruce (*Picea abies*) trees as affected by pedospheric nitrogen supply. Physiol. Plant. 101: 764-769.

Sudachkova, N.E. 1977. Metabolism of conifers and wood formation. Nauka, Novosibirsk. pp. 222.

Sudachkova, N.E., I.L. Milyutina, L.I. Romanova and G.P. Semenova. 2004. The annual dynamics of reserve compounds and hydroliyic enzymes activity in the tissues of *Pinus sylvestris* L. and *Larix sibirica* Ledeb. The metabolism of reserve compounds in the tissues of siberian conifers. Eurasian J. For. Res. 7: 1-10.

Tagliavini, M., M. Quartieri and P. Millard. 1997. Remobilised nitrogen and root uptake of nitrate for spring leaf growth, flowers and developing fruits of pear (*Pyrus communis* L.) trees. Plant Soil 195: 137-142.

Tagliavini, M., P. Millard and M. Quartieri. 1998. Storage of foliar-absorbed nitrogen and remobilization for spring growth in young nectarine (*Prunus persica* var. *nectarina*) trees. Tree Physiol. 18: 203-207.

Thomas, F.M., G. Meyer and M. Popp. 2004. Effects of defoliation on the frost hardiness and the concentrations of soluble sugars and cyclitols in the bark tissue of pedunculate oak (*Quercus robur* L.). Ann. Sci. For. 61: 455-463.

Thomas, H. and J.L. Stoddart. 1980. Leaf senescence. Ann. Rev. Plant Physiol. 31: 83-111.

Tian ,W.M., Y.Q. Han, J.L. Wu and B.Z. Hao. 1998. Characteristics of protein-storing cells associated with a 67 kDa protein in *Hevea brasilensis*. Trees. 12: 153-159.

Tian W. M., J. L.Wu, B. Z. Hao and Z. H. Hu. 2003. Vegetative storage proteins in the tropical tree *Swietenia macrophylla*: seasonal fluctuation in relation to a fundamental role in the regulation of tree growth. Can. Bot. J. 81: 492-500.

Tian, W.M. and B.Z. Hao. 1999. Protein-storing cells with a 67 kDa protein in regularly tapped *Hevea* trees and in trees affected by tapping panel dryness. J. Rubb. Res. 2: 183-191.

Tian, W.M., S.Q. Peng, X.C. Wang, M.J. Shi, Y.Y. Chen and Z.H. Hu. 2007. Vegetative storage protein in *Litchi chinensis* Sonn., a subtropical evergreen fruit tree, possesses trypsin inhibitor activity. Ann. Bot. 100: 1199-1208.

Titus, J.S. 1989. Nitrogen recycling in the apple (*Malus domestica* Borkh.). Ann. Sci. For. 46: 654-659.

Titus, J.S. and S.M. Kang. 1982. Nitrogen metabolism, translocation, and recycling in apple trees. Hort. Rev. 4: 204-246.

Trethewey, R.N. and A.M. Smith. 2000. Starch metabolism in leaves. *In* Photosynthesis: Physiology and Metabolism. Advances in photosynthesis, Vol 9, Leegood R.C., Sharkey T.D., S. Von Caemmerer. Eds Kluwer Academic Publishers, the Netherlands, p 205- 231.

Tromp, J. 1970. Storage and mobilization of nitrogenous compounds in apple trees with special reference to arginine. *In*: Physiology of trees crops. Edité par Luckwill LC Cuttings CV. New York Academy.

Tromp, J. 1983. Nutrient reserves in roots of fruit trees, in particular carbohydrates and nitrogen. Plant Soil 71: 401-413.

Tromp, J. and J.C. Ovaa. 1985. Response of young apple trees to time of nitrogen fertilization with respect to the nitrogen, potasium, and calcium levels in xylem sap, new biomass production, and the tree as a whole. J. Plant Physiol. 119: 301-309.

Tromp, J. and J.V. Ovaa. 1971. Phloem translocation of nitrogen in apple. Physiol. Plant. 25: 407-413.

Tschaplinski, T.J., Blake, T.J., 1994. Carbohydrate mobilization following shoot defoliation and decapitation in hybrid poplar. Tree Physiol. 14: 141-151.

Ueda, M.U., E. Mizumachi and N. Tokuchi. 2009. Allocation of nitrogen within the crown during leaf expansion in *Quercus serrata* saplings. Tree Physiol. 29: 913-919.

Uemura, M., G. Warren and P.L. Steponkus. 2003. Freezing sensitivity in the sfr4 mutant of Arabidopsis is due to low sugar content and is manifested by loss of osmotic responsiveness. Plant Physiol. 131: 1800-1807.

Valenzuela Nunez, L. 2006. Comparaison interspécifique de la dynamique saisonnière de composes azotes et carbonés chez le chêne sessile (*Quercus petraea* Matt. Liebl.), le chêne pédonculé (*Quercus robur* L.) et le hêtre (*Fagus sylvatica* L.) aux stades juvéniles et adultes ;effet de la défoliation et de la lumière sur la gestion des réserves. PhD thesis, Henri Poincaré University, Nancy, France, 141 p.

Van Cleve, B. and K. Apel. 1993. Induction by nitrogen and low temperature of storage protein synthesis in poplar trees exposed to long days. Planta. 189: 157-160.

Van Damme, E.J.M., B. Hause, J. Hu, A. Barre, P. Rougé, P. Proosr and W.J. Peumans. 2002. Two distinct Jacalin-related lectins with a different specificity and subcellular location are major vegetative storage proteins in the bark of black mulberry tree, Plant Physiol. 130: 757-769.

Vande Walle, I.A., S.B. Mussche, R.A. Samson, N.B. Lust and R. Lemeur. 2001. The above- and belowground carbon pools of two mixed deciduous forest stands located in East-Flanders (Belgium). Ann. For. Sci. 58: 507-517.

Vander Mijnsbrugge, K., H. Meyermans, M.Van Montagu, G. Bauw, and W. Boerjan. 2000. Wood formation in poplar: identification, characterization and seasonal variation of xylem proteins. Planta. 210: 589-598.

Vanderklein, D.W. and P.B. Reich. 1999. The effect of defoliation intensity and history on photosynthesis, growth and carbon reserves of two conifers with contrasting life spans and growth habits. New phytol. 144: 121-132.

Vitousek, P. 1982. Nutrient cycling and nutrient use efficiency. Am. Nat. 119: 553-572.

Vizoso, S. 2004. Effets combinés de l'augmentation de la concentration atmosphérique en CO2 et du niveau de fertilisation azotée sur la gestion du carbone et de l'azote chez le chêne pédonculé (*Quercus robur*) et le hêtre (*Fagus sylvatica*). Thèse de Doctorat, Université de Nancy I, p. 122.

Vizoso, S., D. Gérant, J.M. Guehl, R. Joffre, M. Chalot, P. Gross and P. Maillard. 2008. Do elevation of CO_2 concentration and nitrogen fertilization alter storage and remobilization of carbon and nitrogen in pedunculate oak saplings? Tree Physiol. 28: 1729-1739.

Vollenweider, P., I. Dustin, R.M. Hofer, P. Vittoz and P. Hainard. 1994. A study of the cambial zone and conductive phloem of common beech (*Fagus sylvatica* L.) using an image analysis method. I. Influence of tree age on the structure. Trees 9: 106-112.

Wanner, L.A. and O. Junttila. 1999. Cold-induced freezing tolerance in Arabidopsis. Plant Physiol 120: 391-399.

Wargo, P.M., 1975. Estimating starch content in roots of deciduous trees - a visual technique. US Dept. Agric. For. Serv. Res. Pap. NE. 313. Upper Darby, PA.

Waring, R. H. and W.H. Schlesinger. 1985. Forest Ecosystems: Concepts and Management, Academis Press, Orlando, Florida. 340p.

Weber, P., H. Stoermer, A. Gessler, S. Schneider, D. von Sengbusch, H. Hanemann and H. Rennenberg. 1998. Metabolic responses of Norway spruce (*Picea abies*) trees to long-term forest management practices and acute $(NH_4)_2SO_4$ fertilization: transport of soluble non-protein nitrogen compounds in xylem and phloem. New Phytol. 140: 461-475.

Wendler, R. and P. Millard. 1996. Impacts of water and nitrogen supplies on the physiology, leaf demography and nitrogen dynamics of *Betula pendula*. Tree Physiol. 16: 153-159.

Wendler, R., P.O. Carvalho, J.S. Pereira and P. Millard. 1995. Role of nitrogen remobilisation from old leaves for new leaf growth of eucalyptus globules seedlings. Tree Physiol. 15: 679-683.

Wetzel, S. and J.S. Greenwood. 1989. Proteins as a potential nitrogen storage compound in bark and leaves of several softwoods. Trees. 3: 149-153.

Wetzel, S., C. Demmers and J.S. Greenwood. 1989. Seasonally fluctuating bark proteins are a potential form of nitrogen storage in three temperate hardwoods. Planta. 178: 275-281.

Wetzel, S., J.S. Greenwood. 1991. A survey of seasonal bark proteins in eight temperate hardwoods. Trees Struct. Func. 5: 153-157.

Wisniewski, M., C. Bassett and R. Arora. 2004. Distribution and partial characterization of seasonally expressed proteins in different aged shoots and roots of 'Loring' peach (*Prunus persica*). Tree Physiol. 2: 339-345.

Witt, W. and J.J. Sauter. 1994. Starch metabolism in poplar wood ray cells during spring mobilization and summer deposition. Physiol. Plant. 92: 9-16.

Wittenbach, V.A. 1983. Effect of pod removal on leaf photosynthesis and soluble protein composition of field grown soybean. Plant Physiol. 73, 121-124.

Wittmann, C., G. Aschan and H. Pfanz, 2001. Leaf and twig photosynthesis of young beech (*Fagus sylvatica*) and aspen (*Populus tremula*) trees grown under different light regime. Bas. Appl. Ecol. 2: 145-154.

Wong, B.L., K.L. Bagget and A.H. Rye. 2003. Seasonal patterns of reserve and soluble carbohydrates in mature sugar maple (*Acer saccharum*). Can. J. Bot. 81: 780-788.

WRB. 2006. World reference base for soil resources 2006. A framework for international classification, correlation and communication. World soil resources reports 103, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2006, 127 p.

Würth, M.K.R., S. Peláez-Riedl, S.J. Wright and C. Körner. 2005. Non-structural carbohydrate pools in a tropical forest. Oecologia. 143: 11-24.

Yemm E. W. and E. C. Cocking. 1955. The determination of amino acids with ninhydrin. Analyst. 80: 209-213.

Yeoh, H.H. and Y.C. Wee. 1994. Leaf protein contents and nitrogen-to-protein conversion factors for 90 plants species. Food Chemistry. 49: 245-250.

Yoshida, K., K. Baba, N. Yamamoto and K. Tazaki. 1994. Cloning of a lectin cDNA and seasonal changes in levels of the lectin and its m-RNA in the inner bark of *Robinia pseudoacacia*. Plant. Mol. Biol. 255: 845-853.

Youssefi, F., P.H. Brown and S.A. Weinbaum. 2000. Relationship between tree nitrogen status, xylem and phloem sap amino acid concentrations, and apparent soil nitrogen uptake by almond trees (*Prunus dulcis*). J. Hortic. Sci. Biotech. 75: 62-68.

Zapater, M., C. Barlet, Y. Lefèvre, A. Granier and N. Bréda. 2008. An efficient pump : contribution of fine roots of forest trees in clay layers drying out during drought events. *In*: SEC-Volume 1, International Symposium Drought and Construction, J.P. Magnan, R. Cojean, Y.J. Cui Eds, Laboratoire central des ponts et chaussées, Marne-la-Vallée : 103-111.

Zhu, B. and G.D. Coleman. 2001. Phytochrome-mediated photoperiod perception, shoot growth, glutamine, calcium, and protein phosphorylation influence the activity of the poplar bark storage protein gene promoter (bspA). Plant Physiol. 126: 342-351.