

TRAITS FONCTIONNELS, TOLERANCES ET DISTRIBUTIONS DES ESPECES
HERBACEES SUR UN GRADIENT DE DISPONIBILITE EN EAU
UNE APPROCHE PREDICTIVE PAR MODELE D'EQUATION STRUCTURALE

par

Michaël Belluau

thèse présentée au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de docteur ès sciences (Ph.D.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, 7 Décembre 2017

Le 7 Décembre 2017

*le jury a accepté la thèse de Monsieur Michaël Belluau
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur Bill Shipley
Directeur de recherche

Professeur Vincent Maire
Évaluateur externe
Université de Québec à Trois-Rivières

Professeur Mark Vellend
Évaluateur interne

Professeur Dominique Gravel
Président-rapporteur

SOMMAIRE

L'assemblage des espèces (leurs présences/absence) dans une communauté naturelle est la conséquence de plusieurs mécanismes de filtrage réalisés par l'environnement. Parmi ces filtres, le filtre abiotique sélectionne les espèces capables de tolérer les conditions environnementales locales. La variation de la disponibilité de l'eau dans le sol est l'un des principaux gradients environnementaux selon lesquels les espèces végétales sont différemment réparties. Considérant l'hypothèse que les traits fonctionnels et leurs relations sont hiérarchisées, les préférences d'habitat des espèces le long de gradients environnementaux devraient être déterminées par une combinaison de traits physiologiques et morpho-anatomiques hiérarchisés.

Au cours de ce doctorat, mon objectif général est d'identifier les traits fonctionnels morphologiques, anatomiques et physiologiques de tolérance à la sécheresse qui peuvent prédire la présence des espèces le long d'un gradient d'hydrologie des sols. Plus spécifiquement, nous cherchons à savoir : (i) Quels sont les traits physiologiques qui reflètent le mieux la tolérance à la sécheresse ? (ii) Quelles sont les relations entre les traits morpho-anatomiques et les traits physiologiques de tolérance ? (iii) Quels sont les traits morpho-anatomiques en conditions optimales permettant de prédire la tolérance des espèces herbacées à la sécheresse ? (iv) Quelles formes ont les relations qui existe entre les traits morpho-anatomiques de tolérance en condition optimale et la présence des espèces en cas de sécheresse ? (v) Peut-on prédire les présences des espèces en cas de sécheresse à partir de leurs traits morpho-anatomiques?

Nos résultats montrent (1) qu'il est possible de prédire la distribution des espèces sur un gradient d'hydrologie des sols à partir de cinq traits physiologiques de tolérance à la sécheresse. Ces cinq traits sont la photosynthèse nette maximale, la conductance stomatique maximale, le potentiel hydrique du sol au point de flétrissement, la conductance stomatique au point de flétrissement et l'efficacité d'utilisation de l'eau au point de flétrissement. Nous avons montré que (ii) les traits physiologiques de tolérance à la sécheresse sont prédits par les traits morpho-anatomiques en conditions optimales (surface spécifique foliaire, teneur en matière sèche des feuilles, teneur en azote foliaire, longueur spécifique racinaire et surface stomatique). (iii) Les traits morpho-

anatomiques seuls ne sont pas de bons prédicteurs de l'hydrologie des espèces et (iv) que la séquence « traits morpho-anatomiques → traits physiologiques → hydrologie des espèces » donne les meilleures prédictions. Cependant, (v) le modèle ne donne pas de prédictions fiables si l'on utilise des traits morpho-anatomiques mesurés en conditions naturelles. Ces résultats confirment, au moins partiellement, l'hypothèse que la distribution des espèces sur un gradient hydrologiques peut être prédite à partir de leurs traits de tolérance à la sécheresse eux-mêmes prédits par leurs traits morpho-anatomiques.

En résumé, nous avons utilisé une approche fonctionnelle en construisant un modèle causal prédictif qui nous a permis de nous intéresser aux mécanismes de filtrage environnementaux et plus précisément au rôle de la niche hydrologique des espèces dans l'assemblage des communautés végétales.

Mots clés : Préférence d'habitat, affinité hydrologiques, distribution des espèces, disponibilité en eau, sécheresse, stress hydrique, dicotylédones herbacées, tolérance, évitement, photosynthèse nette, potentiel hydrique du sol, conductance stomatique, efficacité d'utilisation de l'eau, point de flétrissement, surface spécifique foliaire, teneur en matière sèche des feuilles, teneur en azote foliaire, longueur spécifique racinaire, surface stomatique, niche hydrologique, niche fondamentale, niche réalisée, analyses de piste, cumulative link model.

ABSTRACT

Species assembly (their presence/absence) in a natural community is the consequence of several filtering mechanisms made by the environment. Among these filters, the abiotic filter selects species able to tolerate local environmental conditions. Variation in water availability in the soil is one of the main environmental gradients according to which plant species are differently distributed. Considering the hypothesis that functional traits and their relationships are hierarchical, habitat preferences of species along environmental gradients should be determined by a combination of hierarchical physiological and morpho-anatomical traits.

During this PhD, my overall goal is to identify morphological, anatomical and physiological drought tolerance functional traits that can predict the presence of species along a soil hydrology gradient. More specifically : (i) What are the physiological traits that best reflect drought tolerance? (ii) What are the relationships between morpho-anatomical traits and physiological traits of tolerance? (iii) What are the optimal morpho-anatomical traits for predicting tolerance of herbaceous species to drought? (iv) What forms of relationships exist between optimal morpho-anatomical traits of tolerance and the presence of species in drought condition? (v) Can the presence of species in drought condition be predicted from their morpho-anatomical features?

Our results show (1) that it is possible to predict the distribution of species on a soil hydrology gradient from five physiological traits of drought tolerance. These five traits are maximum net photosynthesis, maximum stomatal conductance, water potential of the soil at the wilting point, stomatal conductance at the wilting point, and efficiency of water use at the wilting point. We have shown that (ii) the physiological traits of drought tolerance are predicted by optimal morpho-anatomical traits (leaf area, leaf dry matter content, leaf nitrogen content, root length and stomatal surface). (iii) Morpho-anatomical features alone are not good predictors of species hydrology and (iv) the sequence “morpho-anatomical traits → physiological traits → species hydrology” gives the best predictions. However (v) the model does not provide reliable predictions using morpho-anatomical traits measured under natural conditions. These results

confirm, at least partially, the hypothesis that the distribution of species on a hydrological gradient can be predicted from their drought tolerance traits themselves predicted by their morpho-anatomical features.

In summary, we used a functional approach by constructing a predictive causal model that allowed us to focus on environmental filtering mechanisms and more specifically on the role of the species hydrological niche in assembling plant communities.

Key words: Habitat preferences, hydrological affinity, species distribution, water availability, drought, water stress, herbaceous dicotyledons, tolerance, avoidance, net photosynthesis, soil water potential, stomatal conductance, water use efficiency, leaf wilting point, leaf area, leaf dry matter content, leaf nitrogen content, root length, stomatal area, hydrological niche, fundamental niche, realized niche, path analyzes, cumulative link model

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement mon directeur, Bill Shipley, pour son soutien sans faille, ses conseils éclairés et sa confiance renouvelée au fil des années et pour m'avoir offert la chance de réaliser un doctorat sur un sujet passionnant, dans cette magnifique région. Je me dois de remercier le CRSNG (Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada) d'avoir financé ce doctorat.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de conseillers, Mark Vellend et Robert Bradley, pour leurs commentaires toujours pertinents et constructifs ainsi que tous les membres du jury, notamment Dominique Gravel et Vincent maire, d'avoir accepté de participer à la fin de cette aventure. Pour les relectures, critiques et commentaires de mes articles, je remercie Marc Vellend, Bill Parsons, Diana Soriano, Cédric Frenette-Dussault, François Rousseu, Françoise Cardou et Yuanzhi Li. Cédric et François pour leur aide en statistique. Benoit Lapointe pour ses bonnes idées. Daniel Garneau pour son travail exceptionnel en analyse d'image.

Il me faut aussi remercier les nombreux stagiaires et techniciennes qui ont participé aux prises de mesures, longues et fastidieuses. Sans votre aide, rien n'aurait été possible : Anthony Roy, Alexandra Arès Bruneau, Stéphanie Blanchette, Nikola Tutic, Felix Plante, Sydney Gilmour, Didier Labarre, Chiara Chelo et Mathias Gagnon-Barbin.

Je tiens maintenant à remercier les étudiants et personnels, passés et présents, des labos « Bradley-Calmé-Gravel-Shipley-Vellend ». Mentions spéciales à : Antoine T. (pour ton accueil icite), P.O., Antoine BS, Hipolito, Françoise, Steve, Az, Matilde, la liste est longue... Et les autres : Louis-Valentin et Laure (mes loulous), Pascal (cochin !), Martin, Vincent, Cat, Geneviève T., Clarence, le Dude, Dido et Claire, Titi, Ithieux...

Un énorme merci à Maïka et Idaline pour m'avoir accompagné dans les hauts et supporté dans les bas. Je vous dois bien plus que ce que vous imaginez.

Enfin, je tiens de tout mon cœur mes parents (je vous dois tant) et ma famille (celle du sang et celle du cœur, vous vous reconnaitrez !) d'avoir été à mes côtés pendant tout ce doctorat. Merci à vous Arnaud, David et à toi Julie, vous êtes les piliers qui me permettent d'avancer dans cette vie.

Je vous aime fort, 'stie !

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE	I
ABSTRACT	III
REMERCIEMENTS	V
TABLE DES MATIERES	VI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XI
LISTE DES TABLEAUX	XIII
LISTE DES FIGURES	XV
CHAPITRE 1 - INTRODUCTION GENERALE	1
Approche fonctionnelle en écologie	1
<i>Traits et syndrome de traits</i>	3
Le filtrage environnemental	8
<i>Des filtres emboîtés</i>	8
<i>Niches des espèces</i>	10
<i>Interactions biotiques</i>	11
Importance du filtre abiotique de l'eau	12
<i>Une question d'échelle</i>	13
La prépondérance des études sur les arbres et herbacées cultivées	15
Stratégie de survie face à la sécheresse	16
<i>Écophysiologie d'utilisation de l'eau</i>	16
<i>Traits morphologiques et écophysiologiques reliés au stress hydrique</i>	20
Hiérarchisation des traits	21
Objectifs	24
Méthodes	26
<i>Première expérience : en conditions contrôlées</i>	26
<i>Deuxième expérience : en conditions naturelles</i>	35
Contributions et originalités du sujet	37
CHAPITRE 2 - PREDICTING HABITAT AFFINITIES OF HERBACEOUS DICOTS TO SOIL WETNESS BASED ON PHYSIOLOGICAL TRAITS OF DROUGHT TOLERANCE	38
Description de l'article et contribution	38
Predicting habitat affinities of herbaceous dicots to soil wetness based on physiological traits of drought tolerance	40
Abstract	40
Introduction	41

Materials and methods	44
<i>Study site and experimental design</i>	44
<i>Measurements</i>	47
<i>Data analysis</i>	50
Results	53
<i>Univariate differences in traits between species of different habitat types.</i>	55
<i>Predicting habitat affinities from combinations of traits.</i>	58
Discussion	63
<i>Dynamic response of gas exchange to drying soils</i>	63
<i>Linking traits to habitat affinities.</i>	65
References	68

CHAPITRE 3 - LINKING HARD AND SOFT TRAITS: PHYSIOLOGY, MORPHOLOGY AND ANATOMY INTERACT TO DETERMINE HABITAT AFFINITIES TO SOIL WATER AVAILABILITY IN HERBACEOUS DICOTS. 72

Description de l'article et contribution	72
Linking hard and soft traits: Physiology, morphology and anatomy interact to determine habitat affinities to soil water availability in herbaceous dicots.	74
Abstract	74
Introduction	75
Material and Methods	76
<i>Experimental design</i>	77
<i>Measurements</i>	79
<i>Data analysis</i>	81
Results	85
<i>Predictive ability of hydrological groups using soft versus hard traits</i>	85
Discussion	87
<i>Soft traits alone don't predict habitat preferences</i>	89
<i>Can species' hard traits be predicted from their soft traits?</i>	89
<i>Direct and indirect relationships between soft traits, hard traits and habitat preferences.</i>	90
<i>Antagonistic and synergistic direct and indirect effects of soft traits on habitat preferences</i>	91
References	94

CHAPITRE 4 - TESTING A PREDICTIVE MODEL OF HERBACEOUS SPECIES' OCCURRENCE ALONG A GRADIENT OF WATER AVAILABILITY : FROM EXPERIMENTATION TO NATURE. 98

Description de l'article et contribution	98
Testing a predictive model of herbaceous species' occurrence along a gradient of water availability: from experimentation to nature.	99
Abstract	99

Introduction.....	100
Material and Methods	102
<i>Study sites and soil wetness descriptors</i>	102
<i>Species trait measurements</i>	104
<i>Data analysis</i>	107
Results.....	109
<i>Site wetness clustering</i>	109
<i>Species trait values</i>	111
<i>Observed presence of species and communities</i>	111
<i>Predicted presence of species and communities</i>	112
<i>Comparison between observed and predicted presence for species and communities</i>	112
Discussion.....	112
<i>Model predictions don't follow the observations</i>	114
<i>Limits and perspectives of the model</i>	114
References.....	118
CHAPITRE 5 - DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION.....	121
Contexte.....	121
Prédire les habitats d'espèces sur un gradient hydrologique à partir de leurs traits physiologiques	122
<i>Les traits physiologiques de tolérance à la sécheresse prédisent les préférences d'habitat</i>	122
<i>L'apport des modèles prédictifs</i>	125
Liens entre physiologie et morphologie, causalité et prédiction	126
<i>Les traits morpho-anatomiques seuls prédisent mal les préférences d'habitat</i>	127
<i>Les traits morpho-anatomiques prédisent les traits physiologiques</i>	128
<i>Les analyses de pistes révèlent l'existence d'effets confondants</i>	129
Fiabilité du modèle causal prédictif.....	130
<i>Les traits morpho-anatomiques in situ prédisent mal les présences observées des espèces</i>	130
Limites et perspectives du modèle prédictif	131
<i>Le choix des « meilleurs » traits fonctionnels</i>	132
<i>La classification des sites le long du gradient hydrologique</i>	133
<i>La distribution des espèces n'est pas déterminée que par l'hydrologie</i>	134
<i>L'importance des niches fondamentales et réalisées</i>	135
<i>Prise en compte des interactions biotiques</i>	136
Conclusion.....	140
ANNEXES A - APPENDICES TO CHAPTER 1	142
Content :.....	142
Table A.1	143

Table A.2.....	144
Table A.3.....	146
ANNEXES B - APPENDICES TO CHAPTER 2.....	147
Content :.....	147
Table B.1.....	148
Appendix BA: Relations between measures of water content (VWC/RWC/water potential).....	152
Appendix BB : Segmented linear regression for dynamic response of stomatal conductance.....	154
Figure B.2.....	156
Table B.2.....	157
Table B.3.....	158
Appendix BC: R script for CLM, path analysis and other functions.....	159
ANNEXES C - APPENDICES TO CHAPTER 3 :.....	161
Content :.....	161
Table C.1.....	162
Table C.2.....	163
References.....	166
ANNEXES D - PREDICTING HABITAT AFFINITIES OF PLANT SPECIES USING COMMONLY MEASURED FUNCTIONAL TRAITS.....	168
Predicting habitat affinities of plant species using commonly measured functional traits.....	168
Abstract.....	168
Introduction.....	169
Methods.....	173
<i>Data base for developing prediction equations.....</i>	<i>173</i>
<i>Statistical analysis and development of the prediction equations.....</i>	<i>174</i>
<i>Evaluating predictive error.....</i>	<i>175</i>
<i>Independent validation of the prediction equations.....</i>	<i>176</i>
Results.....	180
Discussion.....	188
<i>Trait – environment relationships.....</i>	<i>188</i>
<i>Predictive accuracy and generality.....</i>	<i>189</i>
Acknowledgements.....	192
References.....	192
Supplementary material.....	197
<i>Ellenberg scores for irradiance level ("light"), moisture and soil fertility.....</i>	<i>197</i>
<i>A worked example of calculations.....</i>	<i>198</i>

BIBLIOGRAPHIE 200

LISTE DES ABRÉVIATIONS

LHS	Leaf-Height-Seed	Page 6
CSR	Stratégie compétitive (C), tolérante au stress (S) et rudérale (R)	Page 6
SEF	Spectre d'économie foliaire	Page 6
LES	Leaf Economic Spectrum	Page 6
LMA	Leaf mass area	Page 8
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations	Page 13
IA	Indice d'Aridité	Page 14
ABA	Acide Abscisique	Page 20
PAR	Photosynthetically Active Radiation	Page 26
NPK	Azote (N) Phosphore (P) Potassium (K)	Page 26
VWC	Volumetric Water Content	Page 27
RWC	Relative Water Content	Page 27
Ψ	Potentiel hydrique	Page 27
g_s	Conductance stomatique	Page 32
A	Photosynthèse nette	Page 32
WUE	Water Use Efficiency	Page 32
SLA	Specific Leaf Area / Surface spécifique foliaire	Page 33
LDMC	Leaf Dry Matter Content / Teneur en matière sèche des feuilles	Page 33
LNC	Leaf Nitrogen Content / Teneur en azote foliaire	Page 33
stom _{area}	Stomatal Area / Surface stomatique	Page 33
SRL	Specific Root Length / Longueur spécifique racinaire	Page 33
ACP	Analyses en Composante Principale	Page 34
ANOVA	ANalysis Of Variance / Analyse de variance	Page 34
CLM	Cumulative Link Model	Page 39
g_s^{\max}	Maximum stomatal conductance	Page 49
g_s^{\inf}	Stomatal conductance at inflection point	Page 49
g_s^{\min}	Minimum stomatal conductance	Page 49
g_s^{wilt}	Stomatal conductance at stage 2 wilting point	Page 49
Ψ_{inf}	Soil moisture content at inflection point	Page 49
Ψ_{wilt}	Soil water potential at stage 2 wilting point	Page 49
A_{max}	Maximum net photosynthesis	Page 49
A_{wilt}	Net photosynthesis at stage 2 wilting point	Page 49
WUE_{max}	Maximum water use efficiency	Page 49
WUE_{wilt}	Water use efficiency at stage 2 wilting point	Page 49
VWC_{wilt}	Volumetric water content at stage 2 wilting point	Page 51
VWC_{inf}	Volumetric water content at inflection point	Page 51
<i>sem</i>	Structural equation model	Page 53
MLM	Maximum likelihood estimator	Page 53
WMW	Wilcoxon Mann–Whitney test	Page 53
T_d	Threshold values of latent score between the groups dry and intermediate	Page 58
T_w	Threshold values of latent score between the groups intermediate and wet	Page 58
CFI	Comparative fit index	Page 62
RMSEA	Root mean square error of approximation	Page 62
AIC	Akaike information criterion	Page 62
Ind _{Sor}	Sørensen index	Page 99
USDA	United States Department of Agriculture	Page 101

PCA	Principal Component Analysis	Page 107
CWM	Community Weighted Means	Page 105
VWV _{grow}	Volumetric Water Content for the growing season	Page 107
%>2 mm	Site percentage of soil portion above 2mm	Page 107
% sand	Site percentage of sand	Page 110
% silt	Site percentage of silt	Page 110
KW	Kruskal-Wallis test	Page 111
Ψ_{feuille}	Potentiel hydrique de la feuille	Page 124
HV	Hauteur végétative	Page 143
MS _{tot}	Masse sèche totale	Page 143
RGR	Relative Growth Rate / Taux de croissance relatif	Page 143
SF _{tot}	Surface foliaire totale	Page 143
NF	Nombre de feuilles	Page 143
RRC	Ratio racinaire / caulinaire	Page 143
RRF	Ratio racinaire / foliaire	Page 143
SF _{moyen}	Surface foliaire unitaire moyenne	Page 144
TCF	Teneur en carbone de la feuille	Page 144
RCA	Ratio carbone / azote foliaire	Page 144
DN	Densité de nervures	Page 144
Stom _{long}	Longueur stomatique	Page 144
Stom _{larg}	Largueur stomatique	Page 144
Stom _{dens}	Densité stomatique	Page 144
Stom _{spec}	Densité spécifique stomatique	Page 144
TMST	Teneur en matière sèche de la tige	Page 146
DST	Densité spécifique de la tige	Page 146
Ψ_{tige}	Potentiel hydrique de la tige	Page 146
TMSR	Teneur en matière sèche de la racine	Page 146
LR	Longueur racinaire	Page 146
PPT	Annual precipitation,	Page 148
PET	Annual evapotranspiration	Page 148
AI	Average annual aridity index	Page 148
P_{dry}	Probalilité pour une espèce d'appartenir au groupe « dry »	Page 158
P_{med}	Probalilité pour une espèce d'appartenir au groupe « medium »	Page 158
P_{wet}	Probalilité pour une espèce d'appartenir au groupe « wet »	Page 158
NIRS	Near Infrared Spectrometric signatures	Page 171
LA	Leaf area	Page 173
SM	Seed mass	Page 173
LS _i	Latent score for species i	Page 174
MPE	Mean predictive error	Page 176

LISTE DES TABLEAUX

Table 1.1 : Liste des 25 espèces sélectionnées pour l'expérience en conditions contrôlées.....	28
Table 2.1 : Species list with soil hydrological classification, life cycle, orders and families. ...	45
Table 2.2 : List and description of the traits used in the analysis.....	49
Table 2.3 : Cumulative link model analysis explaining groups of habitat wetness.	59
Table 3.1 : Species list containing soil hydrological classification, life cycle, orders and families.	78
Table 3.2 : List and description of the soft and hard traits used in the analysis.....	80
Table 3.3 : Cumulative link model analysis of the hard and soft traits as predictors of the habitat wetness preferences : (A) with the five soft traits identified in the present path analysis explaining 12.9 % of total deviance. (B) with the five hard traits from Belluau and Shipley (2017) explaining 48.1% of total deviance.....	86
Table 3.4 : Stepwise backward linear regression, based on AIC values, of each of five hard traits (A_{wilt} , g_s^{wilt} , Ψ_{wilt} , g_s^{max} , A_{max}) on a linear combination of five soft traits (leaf dry matter content (LDMC, $g\ g^{-1}$), specific leaf area (SLA, $m^2\ kg^{-1}$), leaf nitrogen content (LNC, $mg\ g^{-1}$), stomatal area ($stom_{area}$, μm) and specific root length (SRL, $m\ g^{-1}$))......	86
Table 4.1 : Species list with life cycle, orders and families.	105
Table 4.2 : Mean values of SLA, LDMC, LNC and stomatal area for each of the 19 species and community weighted values of the 13 communities.....	106
Table 4.3 : Soil hydrological descriptors and derived soil wetness groups for each study site.	110
Table 4.4 : Observed and predicted presence on each soil wetness group.....	113
Table 4.5 : Sørensen index on each soil wetness group.	114
Table A.1 : Traits morpho-anatomiques des espèces, mesurés à l'échelle de l'individu, mais non inclus dans les analyses.....	143

Table A.2 : Traits morpho-anatomiques des espèces, mesurés à l'échelle de la feuille, mais non inclus dans les analyses.	145
Table A.3 : Traits morpho-anatomiques des espèces, mesurés à l'échelle de la tige et des racines, mais non inclus dans les analyses.....	146
Table B.1 : Information used to create the ordinal wetness habitat classification.	150
Table BA.1 : Estimate from the quadratic regression of soil volumetric water content (VWC, m ³ water/m ³ soil, expressed in %) by soil relative water content (RWC, g water/g soil)	152
Table B.2 : Traits used in the cumulative link model and path analysis.....	157
Table B.3 : Scores, probabilities and ranking of the species.....	158
Table C.1 : Traits used in the analysis. Traits values are the mean of five individuals per species.	162
Table C.2 : References reporting correlations between variables included in our model (Fig. 3.3).....	165
Table C.1 : The number of species (% of total) having complete information on the four traits and for which the Ellenberg scores for nutrients, moisture and light are known.	174
Table C.2 : Results of the cumulative link model (Equations 1 and 2), giving the probabilities that a species with given ln-transformed values of leaf area (LA, mm ²), leaf dry matter content (LDMC, g g ⁻¹), specific leaf area (SLA, mm ² mg ⁻¹) and seed mass (SM, mg) would be classified in each of the nine ordinal Ellenberg classes for site irradiance level (light), site soil nutrients, and soil moisture level.	178
Table C.3 : Levels of prediction error in cross-validated data (100 independent runs, 20% of data for each run) for the Ellenberg scores of soil nutrients, habitat moisture, and irradiance, each having 9 levels.....	180

LISTE DES FIGURES

Figure 1.2 : Représentation schématique selon Keddy (1992) d'une matrice espèces / traits pour tu traits et s espèces (d'après Garnier et Navas, 2013).....	3
Figure 1.3 : Représentation des stratégies dans le modèle CSR de Grime (1977).....	5
Figure 1.4 : Relations entre les six traits de feuille en fonction de la masse de feuilles par unité d'aire (LMA), l'un des traits essentiels dans le spectre économique foliaire.	8
Figure 1.6 : Représentation graphique des hypothèses et objectifs de l'étude.	25
Figure 2.1 : Schematic representation of stomatal conductance behaviour during drought, based on piecewise regressions.	51
Figure. 2.2 : Dynamic responses of stomatal conductance ($\text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) versus soil volumetric water content (m^3 expressed as %).	52
Figure 2.3 : Dynamic responses of stomatal conductance ($\text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) according to habitat wetness.	54
Figure 2.4 : Responses of net CO_2 assimilation rate ($\text{mmol}_{\text{CO}_2} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and water use efficiency ($\text{mmol}_{\text{CO}_2} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1} / \text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) according to habitat wetness.	56
Figure 2.5 : Responses of stage 2 leaf wilting points according to habitat wetness.....	57
Figure 2.6 : Species scores and the predicted probability of being classified in each habitat group (dry, intermediate, wet).....	60
Figure 2.7 : Path analysis of selected traits.	62
Figure. 3.1 : Initial (hypothetical) path model of the physiological and morphological traits. .	83
Figure 3.2 : Box plots showing the differences between species means of the soft trait values, measured at field capacity, grouping species according to affinity for habitat wetness; "D" (species typical of "dry" soils), "I" (species typical of "intermediate" soils), "W" (species typical of "wet" soils).....	84
Figure 3.3 : Path analysis of the physiological and morphological traits.....	88
Figure 4.1 : Principal component analysis of the soil hydrological descriptors for each soil wetness group.....	109

Figure 5.1 : Représentation graphique des hypothèses et résultats de l'étude. 139

Figure BA.1 : (A) Relationship between soil volumetric water content (VWC, m³ water/m³ soil, expressed in %) and soil relative water content (RWC, g water/g soil) with fitted regression. (B) Relationship between soil relative water content (RWC, g water/g soil) and soil water potential (Ψ , MPa). (C) Relationship between soil volumetric water content (VWC, m³ water/m³ soil, expressed in %) and soil water potential (Ψ , MPa). 153

Figure B.2 : Initial hypothesized causal structure. 156

Figure D.1 : The observed Ellenberg indicator values for soil nutrient, soil moisture and irradiance plotted against the mean Ellenberg indicator values predicted by four traits: specific leaf area, leaf dry matter content, leaf area and seed mass. Results based on 922 (nutrients), 981 (moisture) and 988 (irradiance) species. 181

Figure D.2 : The predicted Ellenberg indicator values for soil nutrient status as a function of each plant trait. 183

Figure D.3 : The predicted Ellenberg indicator values for soil moisture status as a function of each plant trait. 184

Figure D.4 : The predicted Ellenberg indicator values for irradiance as a function of each plant trait. 185

Figure D.5 : Predicted mean Ellenberg indicator values for soil nutrient and moisture status, as well as site irradiance. 187

Chapitre 1

-

INTRODUCTION GENERALE

Approche fonctionnelle en écologie

Depuis toujours, les êtres humains cherchent à comprendre et à classer les êtres vivants. Théophraste (IIe siècle av. J.-C.) fut l'un des premiers à classer les végétaux en "arbres", "arbrisseaux", "sous-arbrisseaux" et "plantes herbacées". Depuis, la botanique et l'écologie n'ont cessé de se développer et de chercher à mieux décrire le monde qui nous entoure.

Entre le XIXe et le XXe siècle, avant le développement de la phylogénétique moléculaire, de nombreux botanistes et écologues ont mis en place des systèmes de classification des végétaux, certains encore couramment utilisés. Les types biologiques développés par Raunkiaer *et al.* (1934) sont basés sur la position des bourgeons latents de survie. Une autre classification, mise en place par Hallé et Oldeman (1970), se base sur l'architecture des plantes, c'est-à-dire leurs modes de croissance et de ramification. Cependant, la classification la plus connue à l'heure actuelle est celle développée par Grime (1977). Celle-ci se fonde sur l'étude des caractéristiques morphologiques, physiologiques et phénologiques pour classer les plantes en trois catégories le long de gradients environnementaux : les plantes compétitrices, les plantes rudérales et les plantes tolérantes au stress. Chacune de ces catégories présente des caractéristiques bien distinctes.

Ces caractéristiques, appelées "traits" sont défini par Shipley (2010) comme "n'importe quelle propriété mesurable d'une chose ou une propriété moyenne d'un ensemble de choses et qui soit reliée à sa valeur sélective. Violle *et al.* (2007) définit un trait comme "toute caractéristique morphologique, physiologique ou phénologique mesurable au niveau d'un individu, de la cellule à l'organisme entier, sans qu'il soit fait référence à aucun niveau d'organisation ni à aucun facteur du milieu". Cette caractérisation est centrale dans "l'approche fonctionnelle" de la diversité. En effet, ces traits sont dits fonctionnels lorsqu'ils sont reliés à des fonctions de l'organisme et

influent sur leur valeur sélective. Par exemple, l'acquisition de ressources, la capacité à tolérer des conditions environnementales extrêmes ou la capacité à rivaliser avec ses voisins sont des fonctions qui déterminent la performance d'un individu dans son milieu (Fig. 1.1). L'approche par les traits fonctionnels constitue un outil puissant pour appréhender les interactions entre les organismes et les composantes de leur environnement. L'écologie fonctionnelle s'intéresse aux traits des espèces et non pas à leurs identités taxonomiques. Cette approche permet de "s'affranchir" de considérations taxonomiques et de regrouper les espèces en types fonctionnels. De cette façon, les interprétations des études sont plus facilement généralisables.

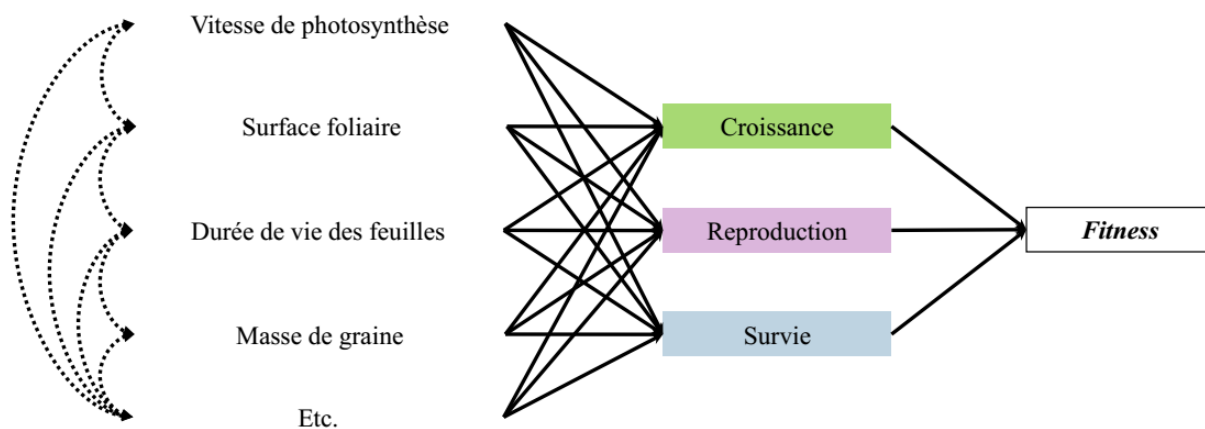


Figure 1.1 : **Relations entre les traits fonctionnels, les fonctions associées et la valeur sélective (*Fitness*) qui en découle. Les traits peuvent être corrélés entre eux et être liés à plusieurs fonctions (d'après Garnier et Navas, 2013).**

Cette approche fonctionnelle s'inscrit alors de façon naturelle dans le cadre de l'écologie comparative. L'écologie comparative consiste à synthétiser les informations concernant un trait ou un groupe de trait pour un grand nombre d'espèces. Cette approche est orthogonale à l'autoécologie qui étudie un grand nombre de traits mais pour une espèce donnée dans un contexte biotique ou abiotique donné (Fig. 1.2) (Keddy, 1992).

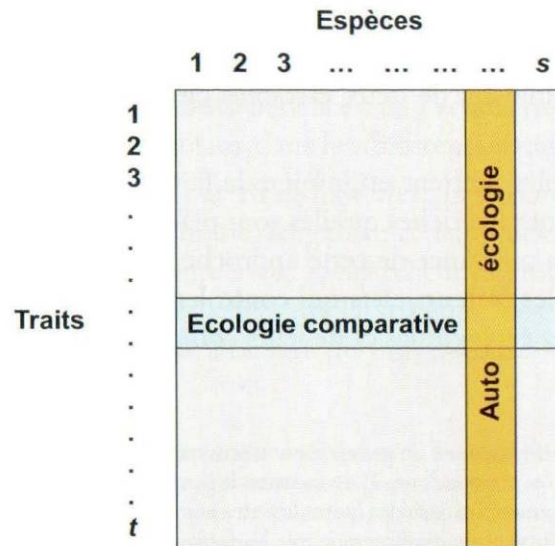


Figure 1.2 : Représentation schématique selon Keddy (1992) d'une matrice espèces / traits pour t traits et s espèces (d'après Garnier et Navas, 2013)

L'écologie végétale comparative est l'étude des relations interspécifiques entre les traits des organismes et les gradients environnementaux. Une approche comparative en écologie fonctionnelle se base sur la comparaison de ces traits entre de nombreuses espèces le long de gradients environnementaux (Shipley *et al.*, 2006). Duarte *et al.* (1995) souligne le besoin de faire des recherches centrées sur les fonctions des organismes et sur un grand nombre d'espèces pour s'affranchir de certaines considérations environnementales et d'autoécologie.

Traits et syndrome de traits

Pour qu'un trait soit pertinent en écologie fonctionnelle comparative, celui-ci doit remplir certains critères. Par définition, ce trait doit être relié à une fonction de la plante. Deuxièmement, il doit être mesurable selon un protocole standardisé et répétable sur une gamme d'espèces. Depuis la création de bases des données de traits à l'échelle mondiale portant sur de très larges gammes d'espèces, le besoin de répétabilité et de standardisation des protocoles est devenu encore plus important (TRY, Kattge *et al.*, 2011 ; LEDA, Kleyer *et al.*, 2008 ; GLOBNET, Reich *et al.*, 2007). Pour que les informations des bases de données soient les plus fiables

possible, la façon dont les traits sont mesurés doit être la plus semblable possible, quelle que soit la personne faisant la mesure. Certains considèrent qu'un trait pertinent doit également être relativement facile à observer ou à mesurer. Cependant, nous préférons suivre la conception de Violle *et al.* (2007) qui définit un trait comme "toute caractéristique mesurable".

Dans la mesure où les traits nous renseignent sur l'identité fonctionnelle des espèces, il faut que le trait mesuré présente des variations entre espèces plus fortes qu'à l'intérieur d'une même espèce (McGill *et al.*, 2006). Certains auteurs (Cornelissen *et al.*, 2003 ; Kazakou *et al.*, 2014) considèrent que les traits fonctionnels doivent en plus nous permettre de hiérarchiser les espèces entre elles. Cependant, nous jugeons ce critère trop restrictif pour être pris en compte dans le choix d'un trait.

Suite à l'accumulation de campagnes de mesures de traits fonctionnels depuis les années 70, il est apparu que ceux-ci sont rarement indépendants les uns des autres. Plusieurs auteurs majeurs (Chapin III *et al.*, 2002 ; Grime, 1977) ont mis en évidence des patrons de covariations fréquentes entre paires ou groupes de traits. Ces patrons de covariations sont également appelés syndrome de traits. L'étude de ces patrons de covariations et leur récurrence a montré l'existence de grands axes de variations correspondant à des stratégies d'existence des végétaux.

Dans le but de classer et de comprendre les relations entre les propriétés des plantes et leurs rôles dans les écosystèmes, Grime (1977) développe une théorie expliquant la distribution des espèces en se basant sur la compétition et deux gradients environnementaux, le stress et la perturbation. Grime pense que ces gradients limitent la présence des individus, et que seules des combinaisons d'intensités faibles à modérées de ces facteurs permettent l'établissement de la végétation.

Ces trois facteurs, le stress, la compétition et la perturbation permettent de tracer un triangle dont deux des côtés représentent les gradients de stress et de perturbation. La compétition désigne la capacité des plantes à utiliser et entrer en concurrence pour les ressources ou pour l'espace. Le stress correspond à tout facteur abiotique entraînant une limitation de la croissance des végétaux comme le manque de lumière, de nutriments, d'eau ou encore des conditions extrêmes de température. La perturbation est définie comme tout facteur susceptible d'entraîner une destruction partielle ou totale de biomasse, par exemple le feu ou le pâturage (Grime 1977).

Les pointes du triangle correspondent à un type de stratégie développée par les plantes (Fig. 1.3).

Les espèces compétitrices (C) sont des espèces à forte stature, à croissance rapide, produisant peu de graines. Leurs capacités d'acquisition de ressources et leurs fortes aptitudes à la compétition leur permettent d'être dominantes dans les milieux productifs et peu perturbés. Les espèces tolérantes au stress (S) ont une croissance lente et une faible allocation à la reproduction. Elles dominent les milieux peu perturbés et peu productifs. Enfin, les espèces rudérales (R) ont une durée de vie courte, une croissance rapide, une forte allocation vers la reproduction et une forte aptitude à la colonisation. Elles dominent les milieux perturbés et potentiellement productifs. Il existe toutefois des stratégies intermédiaires entre C, S et R (par exemple CS, CR, CSR...).

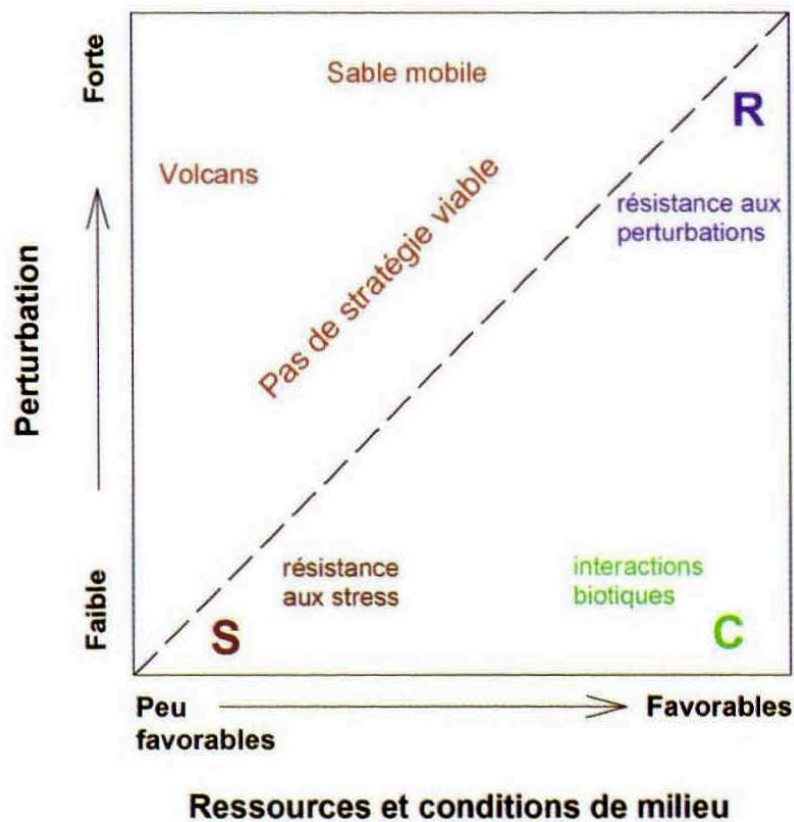


Figure 1.3 : Représentation des stratégies dans le modèle CSR de Grime (1977). C, stratégie compétitrice ; S, stratégie stress tolérante ; R, Stratégie Rudérale (d'après Garnier et Navas, 2013).

Une des limites du triangle CSR défini par Grime vient du fait qu'il n'y a pas de méthodologie simple pour positionner les espèces sur le triangle. L'autre limitation, largement critiquée, vient du fait que ce triangle est basé sur des espèces du Royaume-Uni et ne peut pas, par conséquent, s'appliquer à tous les biomes. Des auteurs ont depuis tenté de rendre cette théorie applicable à d'autres flores (Hodgson *et al.*, 1999 ; Pierce *et al.*, 2013) et de permettre le positionnement des espèces dans le triangle, par des mesures précises de traits des plantes associés à chaque face du triangle (Pierce *et al.*, 2013).

Westoby (1998) développe une autre approche des stratégies des plantes, appelé "LHS" (pour "Leaf-Height-Seed"), présentant trois axes de variations des espèces végétales, chacun associé à des traits précis. Ces trois axes sont liés à des fonctions de la plante : la gestion des ressources, l'aptitude à la compétition et la capacité de régénération. Westoby relie ces fonctions à des traits mesurables sur les espèces. La gestion des ressources est mesurée par la surface spécifique foliaire (un indice de densité de la feuille), l'aptitude à la compétition est estimée par la hauteur de la plante et la capacité de régénération par la masse des graines. Ce système de stratégie se veut une amélioration du système triangulaire CSR de Grime (1977) par l'utilisation d'un minimum de traits permettant de décrire la variabilité fonctionnelle. Ces deux systèmes de stratégie sont largement critiqués et discutés dans la communauté scientifique (Garnier et Navas, 2013 ; Grime, 2002 ; McGill *et al.*, 2006). Cependant, le système de stratégie le plus utilisé est celui de Grime et fait même l'objet d'améliorations et de mises à jour (Pierce *et al.*, 2013).

Un autre patron de covariation (ou "syndrome") particulièrement intéressant est le "Spectre Économique Foliaire" (SEF ou LES pour "Leaf Economic Spectrum"). Le SEF repose sur un compromis entre les fonctions d'acquisition des ressources et de conservation de celles-ci. Ce syndrome de traits a été mis en évidence de façon conjointe par plusieurs auteurs entre les années 1990 et 2000 (Cornelissen *et al.*, 1996 ; Shipley *et al.*, 2006 ; Reich, 2014 ; Wright *et al.*, 2004 et 2005 ; Wright et Westoby, 1999). Des campagnes d'acquisition de données en grande quantité, à grande échelle et sur un grand nombre d'espèces et de conditions environnementales (par exemple : TRY, Kattge *et al.*, 2011, LEDA, Kleyer *et al.*, 2008 ; GLOBNET, Reich *et al.*, 2007), ont permis de révéler des corrélations fortes et stables entre divers traits fonctionnels de la feuille, et ce, indépendamment de l'espèce et du climat.

Ce spectre est composé de 7 à 10 traits suivant les auteurs (Garnier et Navas, 2013, Wright *et al.*, 2004). Les 7 traits concernés sont : la surface spécifique foliaire, la teneur en azote foliaire, la teneur en phosphore foliaire, la durée de vie des feuilles, le taux de croissance relative, la vitesse maximale de photosynthèse et la vitesse de respiration foliaire. À ceux-là peuvent s'ajouter la résistance à la fracture et la vitesse de décomposition de la litière (Freschet *et al.*, 2012). Le point important dans ce spectre d'économie foliaire n'est pas la valeur prise par un trait, mais bien les corrélations existant entre eux. Une analyse en composante principale sur ces traits permet de représenter le SEF selon un seul axe d'ordination. L'axe principal du SEF est conservé, quels que soient les formes de croissance, les groupes fonctionnels et les biomes, y compris sur des gradients de température et de pluviosité (Reich, 2014 ; Wright *et al.*, 2005). L'axe principal du spectre s'étend d'espèces à retour rapide sur investissement (en termes de nutriment et de masse sèche) dans des milieux riches, à des espèces à lent potentiel de retour dans des habitats stressés. Les espèces à retour rapide ont de forts taux de nutriments foliaires (azote (N) et phosphate (P), de photosynthèse et de respiration, des feuilles à durées de vie courte (quelques semaines) et de faible ratio masse sèche par aire de feuille. Les espèces à retour lent sont des espèces avec des feuilles à fort ratio de masse sèche par aire de feuille, de faibles concentrations en nutriments, à longue durée de vie (allant jusqu'à plusieurs années) et de faible taux de photosynthèse (Fig. 1.4). Plusieurs études de ce compromis au niveau des tiges (Chave *et al.*, 2009) et des racines (Prieto *et al.*, 2015) des plantes ont été récemment publiées (Diaz *et al.*, 2016 ; Freschet *et al.*, 2010) ouvrant ainsi des réflexions sur l'existence d'un spectre économique végétal (un « plant economic spectrum »).

Ceci illustre le fait que dans un environnement donné, chaque espèce doit faire à plusieurs compromis de réponse. La façon dont la plante gère ces compromis entraîne une sélection différentielle en fonction de la variation environnementale subie.

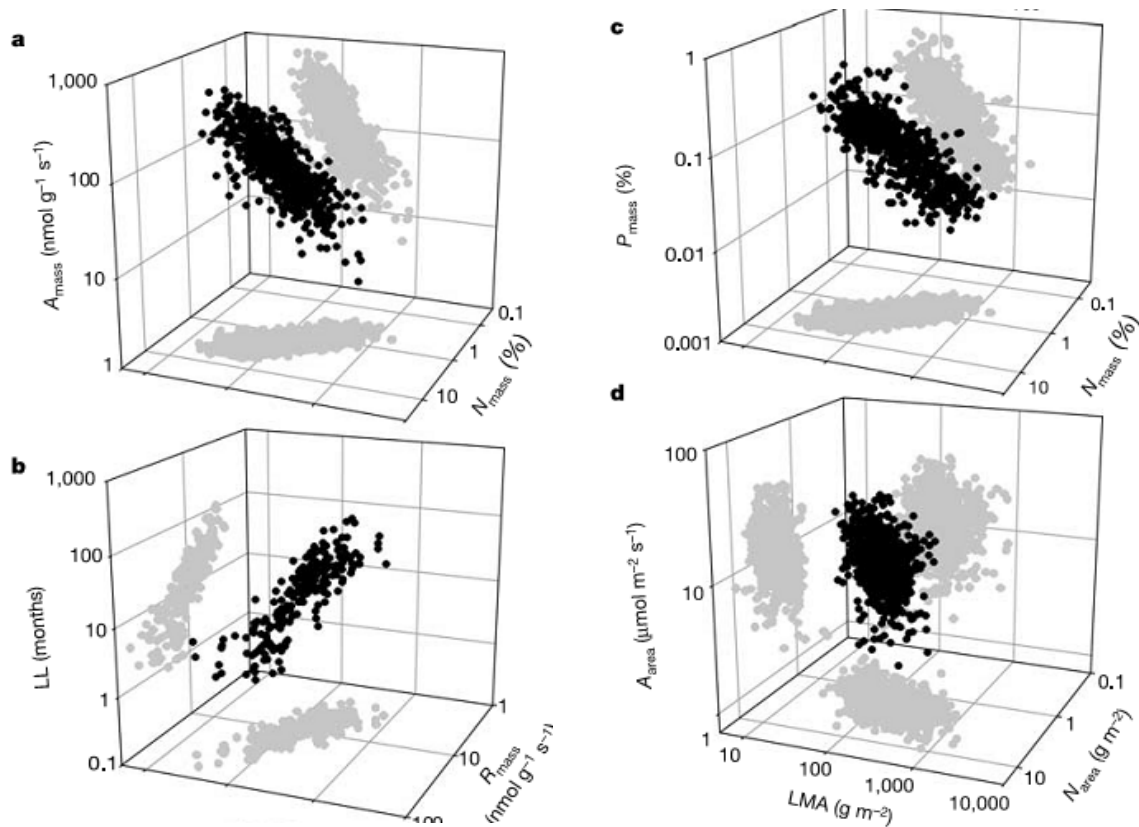


Figure 1.4 : Relations entre les six traits de feuille en fonction de la masse de feuilles par unité d'aire (LMA), l'un des traits essentiels dans le spectre économique foliaire. La direction du nuage de point dans l'espace à trois dimensions peut être déterminée à partir de l'ombre projetée sur le sol et les murs de l'espace à trois dimensions. (d'après Wright *et al.*, 2004).

Le filtrage environnemental

Des filtres emboîtés

La présence ou l'absence d'une espèce dans une communauté naturelle est la conséquence de plusieurs mécanismes de filtrage réalisés par l'environnement. Le tout premier niveau de filtrage est évolutif et biogéographique. Il représente une sélection non directionnelle et

(quasi-) stochastique, c'est-à-dire qu'elle est liée à des événements touchant les espèces à très larges échelles spatiales et temporelles. Par exemple, la présence d'une barrière géographique (montagne, fleuve, mer) peut empêcher une espèce d'atteindre un milieu. C'est aussi un filtre historique qui dépend de l'histoire évolutive des espèces, leurs capacités migratoires, des spéciations ou des extinctions locales. Ce filtrage définit le réservoir régional d'espèces ("pool" régional d'espèces), c'est-à-dire, les espèces ayant réussi à atteindre l'environnement régional. Ce "pool" régional va ensuite subir un filtrage abiotique puis biotique.

Le filtre abiotique est l'ensemble des contraintes environnementales abiotiques locales que vont subir les espèces. Ces contraintes sont par exemple les propriétés physico-chimiques du sol, la pluviosité, la température, etc. Certaines de ces contraintes sont des filtres directs, comme la température, alors que d'autres sont complexes et composés d'un ensemble de filtres directs. L'altitude est un filtre complexe, composé des filtres de température, de disponibilité en eau et d'ensoleillement. Le filtrage abiotique sélectionne les espèces capables de tolérer les conditions environnementales locales.

Le troisième niveau de filtre est le filtre biotique correspondant aux interactions entre les individus à une échelle locale. Ces interactions sont les interactions plante-plante de compétition ou de facilitation, le parasitisme ou encore les mutualismes entre plantes et champignons ou bactéries. Les études d'écologie des communautés s'intéressent particulièrement à ce niveau de filtrage à cause de son importance dans les processus expliquant la structure des communautés locales (Lortie *et al.*, 2004 ; McGill *et al.*, 2006) (Fig. 1.4).

Les filtres abiotiques et biotiques sont communément représentés de façon superposée ou emboîtés. Une raison à cela vient du fait que le filtre abiotique s'applique dès la phase d'installation des plantes. Ainsi, les conditions locales d'existence déterminent si un individu est capable, ou non, de s'établir dans la communauté, puis une fois l'individu installé, celui-ci fait alors face au filtrage biotique. On pourrait alors penser que le filtre abiotique agit en premier et le filtre biotique ultérieurement. Toutefois, dès la phase d'établissement passée, les deux filtres agissent simultanément et devraient donc être représentés l'un à côté de l'autre.

Dans ce doctorat, nous allons nous intéresser particulièrement aux filtres abiotiques de l'eau et plus précisément à un filtre majeur qu'est la sécheresse et la diminution de la disponibilité en eau.

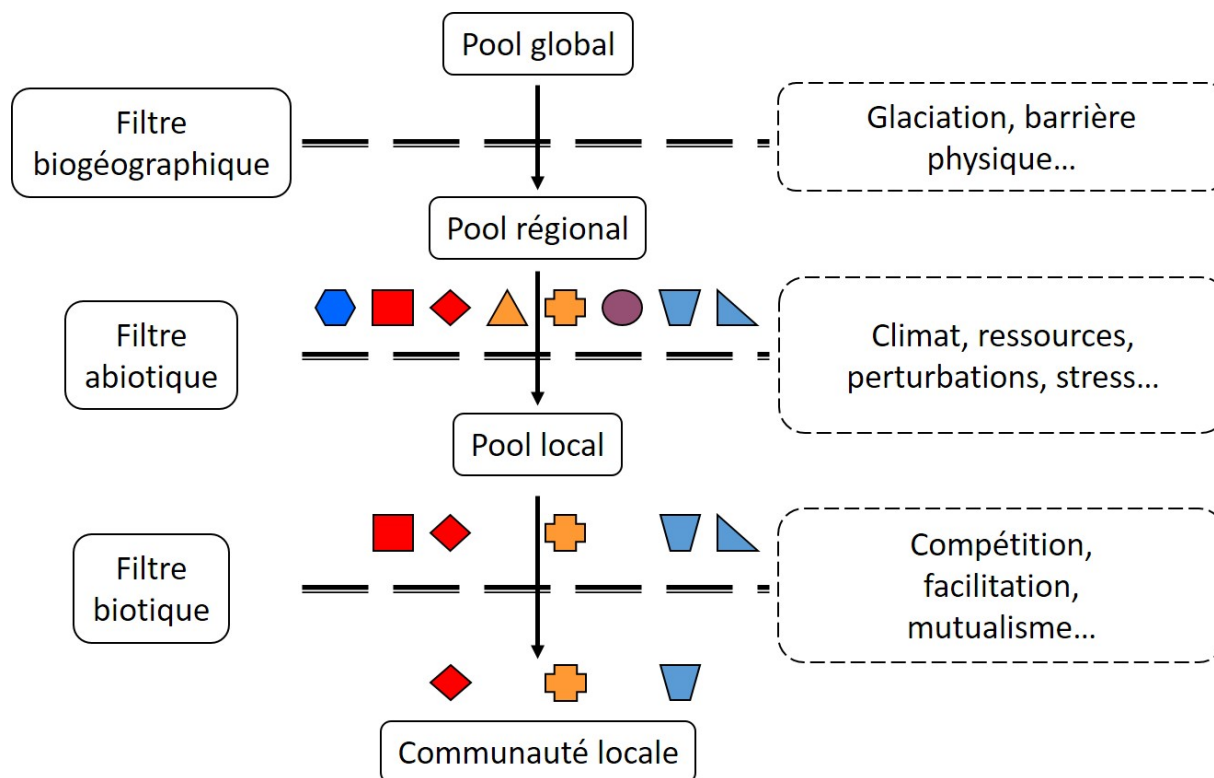


Figure 1.4 : **Filtres environnementaux emboîtés.** Chaque symbole représente une espèce particulière dont les caractéristiques propres sont figurées par sa couleur et sa forme. Les rectangles en pointillés sont les facteurs ou mécanismes impliqués dans chaque niveau de filtre. Les espèces faisant partie du pool régional doivent passer à travers le filtre abiotique et biotique pour participer à la composition actuelle de la communauté (d'après Garnier et Navas, 2013 ; Lortie *et al.*, 2004 ; Woodward et Diament, 1991).

Niches des espèces

Le concept de filtrage environnemental à plusieurs niveaux est également relié à la théorie de la niche écologique. Hutchinson (1957) définit une niche écologique comme un hypervolume où chaque dimension de l'espace représente une ressource (nutriments, lumière, eau) ou une condition de l'environnement (température, précipitation, acidité, etc.). Ce volume, propre à chaque espèce représente sa niche écologique. Lorsqu'une espèce n'est soumise à aucune

interaction biotique (ce qui est quasiment impossible en conditions naturelles), le volume défini par ses besoins en ressources et en conditions environnementales est appelé sa niche potentielle. Lorsque des espèces différentes ont besoin de la même ressource, elles rentrent en interaction. Ces interactions modifient la niche potentielle d'une espèce en une niche réalisée. Il est communément admis que la niche réalisée est plus réduite que la niche potentielle (même si dans des cas de facilitation, la taille de la niche tendrait à augmenter. La modification de la niche potentielle vers la niche réalisée est dépendante des interactions entre les espèces (Araya *et al.*, 2011 ; Markesteijn *et al.*, 2001 ; McGill *et al.*, 2006). Ces interactions biotiques sont principalement la compétition et la facilitation. Les modalités de transformation d'une niche vers l'autre et la façon dont ces niches réagissent aux changements des conditions environnementales ou de la richesse en espèces sont encore à l'étude (Hofmann *et al.*, 2013 ; Li *et al.*, *in press* ; Maire *et al.*, 2012).

Interactions biotiques

Compétition. Le terme compétition englobe l'ensemble des processus induit par l'interaction entre les individus pour l'acquisition d'une ressource et ayant un effet négatif sur leurs performances. Ces effets sont mesurables au niveau de la biomasse, de la reproduction ou de la survie des individus (Calow, 1999). La compétition peut avoir lieu entre des individus d'espèces différentes (compétition interspécifique) ou entre individus de la même espèce (compétition intraspécifique). Chaque espèce possède des capacités compétitrices propres dépendantes de ses tolérances. De manière générale, la compétition (comme les autres interactions biotiques) se fait de manière indirecte entre des individus. Par exemple, l'occupation de l'espace par un individu, la production de composés chimiques rendant l'espace impropre à l'existence des autres espèces ou la consommation plus importante d'une ressource partagée sont des interactions indirectes.

Facilitation. Le terme de facilitation regroupe l'ensemble des processus menant à une amélioration de la performance d'un individu par la présence d'un autre organisme. À l'opposé de la compétition, la facilitation regroupe toutes les interactions positives entre les individus ou les espèces (Callaway, 1995). Ces interactions peuvent être obligatoires, facultatives,

récioproques (mutualisme) ou non (commensalisme). Les exemples classiques sont les interactions plantes - champignons ou plantes - microorganismes qui sont généralement récioproques, mais pas nécessairement obligatoires. Une relation récioproque et obligatoire est une symbiose. On peut ainsi voir la mycorhization ou la fixation d'azote par les nodosités comme des processus de facilitation entre espèces. La facilitation est, elle aussi, souvent indirecte. Par exemple, la formation d'ombre par une plante de la canopée peut faciliter l'existence de plante poussant dans le sous-bois.

Importance du filtre abiotique de l'eau

Au cours des dernières décennies, les scientifiques ont constaté l'apparition d'une crise écologique majeure. Ces derniers ont vu une disparition d'un grand nombre d'espèces ainsi qu'une modification de leurs répartitions et de leurs aires de distributions. Ces "changements planétaires" affectent l'état et la dynamique des écosystèmes selon quatre composantes (Chapin III *et al.*, 2000 ; Sala *et al.*, 2000 ; Vitousek *et al.*, 1997) :

- La première est la modification de l'utilisation des terres par l'homme. Ceci comprend la déforestation et les changements de certaines pratiques agricoles.
- La seconde est l'altération des cycles biogéochimiques, c'est-à-dire, la modification du cycle des éléments entre les différents réservoirs de la planète. Ceci concerne principalement les cycles de l'eau, du carbone et de l'azote. Les perturbations du cycle de l'eau correspondent à une augmentation du ruissellement, au détournement des cours d'eau, à l'épuisement des nappes phréatiques ou encore à une diminution de l'évapotranspiration. Des modifications du régime des précipitations dans le temps et l'espace sont également observées.
- La troisième composante est la modification directe de la composition biotique. Celle-ci comprend l'introduction de nouvelles espèces (invasions biologiques), le prélèvement d'espèces par la pêche, la chasse ou la cueillette pouvant aller jusqu'à leur destruction directe.
- La dernière composante correspond aussi aux modifications de la moyenne et de la variabilité des estimateurs du climat. On constate des modifications de la température, de l'humidité et de la pluviosité de façon locale comme globale.

Une question d'échelle

À l'échelle globale : *Notion d'évapotranspiration potentielle et effective.* Les plantes consomment des quantités d'eau bien supérieures à celles qu'elles fixent dans leurs tissus ; elles sont constamment traversées par un flux d'eau dont la majeure partie est transpirée et donc relarguée dans l'atmosphère. On nomme évapotranspiration l'ensemble de l'eau cédée par la végétation (transpiration) et par le sol (évaporation). Pour étudier les bilans de circulation de l'eau et notamment pour déterminer les besoins en eau des cultures, Thornthwaite (1948), puis Penman (1948) créent deux notions : l'évapotranspiration potentielle et l'évapotranspiration réelle. Ces deux notions sont couramment mises en opposition.

L'évapotranspiration potentielle est définie comme la quantité maximum d'eau pouvant s'évaporer et transpirer à partir d'un paysage non limité en eau (Lu *et al.*, 2005). Selon les auteurs et les méthodes, l'évapotranspiration potentielle est liée à différents paramètres météorologiques, physiques ou biologiques : par exemple le rayonnement solaire, la température, l'humidité de l'air, le vent, mais aussi l'espèce végétale, l'ouverture des stomates... (Schulze *et al.*, 1994). Le site internet de la FAO fournit des outils pour le calcul des évapotranspirations potentielles à l'échelle de pays ou de régions (<http://www.fao.org/nr/water/aquastat/quickWMS/climcropwebx.htm>). De même, des équipes telles que le « Climate Research Unit » (<http://www.cru.uea.ac.uk/>) ou le Ministère des Ressources Naturelles du Canada (<https://www.rncan.gc.ca/accueil>) peuvent fournir ce type de données à différentes échelles.

L'évapotranspiration effective désigne la quantité exacte d'eau évapotranspirée par une couverture végétale réelle. La différence entre les deux évapotranspirations est que l'évapotranspiration effective est limitée par les conditions du milieu. Cette caractéristique explique le fait que l'évapotranspiration effective est toujours inférieure à l'évapotranspiration potentielle. De nombreux facteurs, biotiques (type de plante, pourcentage de couverture du sol, taille...) et abiotiques (radiation solaire, humidité, température, disponibilité en eau, type de sol...), rentrent en compte pour calculer l'évapotranspiration effective. Ces contraintes rendent l'évapotranspiration effective impossible à mesurer à grande échelle, par exemple, pour une parcelle ou une région.

La différence entre l'évapotranspiration potentielle et la pluviosité constitue une mesure de l'aridité d'une région ou d'une parcelle. Cet indice d'aridité est très faible pour des régions humides (Sheffield, Royaume-Uni, IA=0.706 ; Amsterdam, Pays-Bas, IA=0.756) et très fort pour des régions sèches (Montpellier, France, IA=1.416 ; Cordoba, Espagne, IA=2.490, Bouarfa, Maroc (proche du Sahara), IA=14.651) (Frenette-Dussault *et al.*, 2012). Pour la région de Sherbrooke, la pluviosité annuelle est en moyenne de 1000 mm et l'évapotranspiration est de 720. Pour cette région, l'indice d'aridité annuel moyen est de 0.69. Cet indice est différent si l'on s'intéresse seulement aux mois d'été. De mai à juin, l'indice d'aridité est de 2.09, ce qui correspond à des sécheresses proches de celles observées dans le sud de l'Europe (France, Espagne). Cependant, en Estrie, les épisodes de pluie sont répartis relativement équitablement au cours de l'été et ne génèrent pas de fortes sécheresses estivales.

À l'échelle régionale : les facteurs influençant la disponibilité en eau et comment la mesurer. À l'échelle locale ou régionale, la disponibilité en eau représente la principale limitation à la productivité primaire, cette limitation étant dominante pour la majorité des biomes (Chapin III *et al.*, 2002 ; Churkina et Running, 1998).

La disponibilité en eau à l'échelle locale ou régionale est dépendante de plusieurs facteurs comme le climat local ou les reliefs. Le volume de précipitations et la température sont les premiers facteurs affectant la disponibilité en eau, mais celle-ci est également modulée par l'évaporation de l'eau, le type de sol, la présence de nappes phréatiques, le drainage et la transpiration par les plantes. Cependant, la quantité d'eau retenue par le sol est fonction de sa texture, sa composition, sa granulométrie, sa profondeur : un sol sableux retient moins d'eau qu'un sol glaiseux ou argileux (0.12 g g⁻¹ de sol contre 0.25 g g⁻¹ de sol et 0.40 g g⁻¹ de sol) (Poorter *et al.*, 2012) ; la présence de roche ou de composés inertes diminue également la capacité de rétention d'un sol.

La caractérisation du statut hydrique du sol notamment la disponibilité en eau d'un sol est capitale en biologie végétale et se mesure généralement sur la base du potentiel hydrique du sol. Le potentiel hydrique du sol permet de déterminer le sens des échanges hydriques entre le sol et la plante. En effet, l'eau circule toujours des potentiels hydriques les plus élevés vers les potentiels hydriques les plus bas. La relation entre le contenu en eau et le potentiel hydrique est

une caractéristique constante pour chaque type de sol (McDowell *et al.*, 2008 ; Poorter *et al.*, 2012).

La quantité d'eau disponible dans le sol peut également être mesurée par la teneur en eau volumétrique et la teneur en eau relative (teneur gravitaire). Les relations entre la teneur volumétrique (volume d'eau rapporté à un volume de terre), la teneur relative (masse d'eau rapportée à une masse de terre) et le potentiel hydrique du sol sont liées au type de sol, à sa densité ou à sa compaction. Les relations entre ces trois mesures et le passage de l'une à l'autre sont faciles à estimer de façon empirique (Ting et Chen, 2012 ; Topp *et al.*, 1984 ; Varble et Chávez, 2011) (voir Appendix BA, Annexes B).

La prépondérance des études sur les arbres et herbacées cultivées

En anglais, le terme "forbs" décrit les plantes herbacées à feuilles larges qui poussent dans un champ ou prairie, en opposition aux mousses, fougères et graminées. Ce terme n'existe cependant pas en français. Nous utiliserons le terme "plantes herbacées" comme synonyme de "plantes herbacées non cultivées, hors mousse, fougères et graminées".

La très grande majorité des études en écologie fonctionnelle et en écophysologie portent sur des espèces d'arbres, de buissons ou d'espèces herbacées cultivées ayant des applications pour l'homme (maïs, riz, blé...). Très peu d'études portent sur des espèces herbacées qui ne sont pas des graminées (*Poaceae*). Ce déséquilibre s'accroît encore plus lorsque l'on s'intéresse aux études sur la gestion de l'eau dans la plante.

Concernant la conductance stomatique, la plupart des études portent sur les arbres (Augé et Moore, 2002 ; Bartlett *et al.*, 2012a ; Brodribb et Holbrook, 2003 ; Mitchell *et al.*, 2008a ; Tardieu *et al.*, 1996 ; Sack and Holbrook, 2006) ou des espèces d'intérêt économique (Galmés *et al.*, 2013). On peut cependant noter les travaux de Schulze *et al.* (1994) sur des espèces graminées et de Galmés *et al.* (2007a ; 2007b) sur des plantes herbacées.

La photosynthèse chez les angiospermes a été largement étudiée chez les arbres (Abrams *et al.*, 1994 ; Ebrahimiyan *et al.*, 2013 ; Medrano *et al.*, 2002 ; Lu *et al.*, 2010). Sur les espèces graminées, on note l'existence des travaux de Lelièvre *et al.* (2011) et celui de Marino *et al.* (2010) sur les plantes herbacées.

L'étude de la cavitation des vaisseaux conducteurs est presque intégralement basée sur des études portant sur des espèces ligneuses : arbres, arbustes et buissons (Alameda et Villar, 2012 ; Blackman *et al.*, 2010 ; Reich *et al.*, 2003 ; Sack *et al.*, 2003 ; Tyree *et al.*, 2003). On peut toutefois remarquer une étude récente d'Olano *et al.* (2013) qui étudie les risques de cavitation dans le collet de *Silene ciliata* (Pourr.), une plante herbacée des régions tempérées.

Sur des considérations écologiques plus larges, comme l'étude des communautés, on peut noter les travaux de Holub *et al.* (2013) sur la productivité des prairies ou les travaux de Garnier *et al.* (2007) et Volaire (2008) sur les communautés prairiales. Dans le domaine de l'étude des communautés, il existe un plus grand nombre d'études sur des plantes herbacées. Ceci est lié aux études sur les relations entre les communautés végétales et le pâturage ou l'herbivorie.

Il apparaît évident qu'un champ complet de la diversité des plantes a été sous-étudié. Les plantes herbacées représentent une grande part des plantes de sous-bois et de prairie et constituent une part importante de la biomasse et de la diversité végétale que nous ne pouvons pas laisser de côté dans nos études. Au cours de ce doctorat, nous allons étudier la tolérance de ces espèces herbacées à un stress hydrique et tenter de prédire l'importance et les impacts de cette tolérance sur les dynamiques des communautés locales.

Stratégie de survie face à la sécheresse

Au cours de ce doctorat, nous allons chercher à quantifier le rôle des mécanismes de tolérance mis en place par les espèces herbacées le long d'un gradient de disponibilité en eau. Nous allons ainsi tester les effets des facteurs biotiques et abiotiques sur la performance des espèces et des différents types fonctionnels.

Écophysiologie d'utilisation de l'eau

La disponibilité en eau est le principal facteur limitant la distribution et l'abondance des espèces végétales. La compréhension des mécanismes de gestion de l'eau dans la plante est un thème central en physiologie des plantes depuis des décennies (Chapin III *et al.*, 2002). Il est particulièrement important de comprendre la réponse des plantes à la disponibilité de l'eau

sachant que les modèles de changements climatiques prévoient des modifications de l'intensité et de la fréquence des précipitations dans les décennies à venir (Douma *et al.*, 2012 ; IPCC, 2014). Le manque d'eau a un impact sur tous les compartiments de la plante (Lavorel et Garnier, 2002). Il s'agit pour les scientifiques actuels de mieux comprendre les mécanismes de résistance des plantes à la sécheresse et de les lier à leur survie, qui à son tour affecte la répartition des espèces à l'échelle locale et régionale (Tyree *et al.*, 2003).

Échanges gazeux, transpiration, stomates. Les plantes ont besoin d'eau pour vivre et assurer leur fonctionnement. Elles prélèvent l'eau dans le sol, la font circuler dans les différentes parties de la plante et la transpirent au niveau des feuilles, où a lieu la photosynthèse.

Pour effectuer la photosynthèse, la feuille consomme du CO₂ et de l'eau, ce qui produit de l'oxygène et de l'énergie chimique. La feuille constitue la porte d'entrée du CO₂ et de sortie de l'oxygène et de l'eau (Cochard *et al.*, 2002). Cette porte d'entrée/sortie est le stomate. Le stomate est un ensemble de deux cellules réniformes appelées "cellule de garde" et forme un orifice stomatique ou ostiole. Cet ostiole est plus ou moins ouvert en fonction de la turgescence des cellules de garde. Les plantes sont capables d'ajuster l'ouverture stomatique pour réguler les pertes en eau au niveau de la feuille. Parce que l'ouverture stomatique régule également les entrées de CO₂, les plantes sont inévitablement soumises à un compromis entre acquisition de carbone et perte en eau (Chapin III *et al.* 2002).

Les échanges gazeux au niveau des stomates sont mesurés par la conductance stomatique. Celle-ci est conditionnée par le statut hydrique de la plante. En effet, l'ouverture ou la fermeture des stomates est dépendant du transport d'eau dans la plante. Au cours des dernières décennies, la fermeture stomatique a été reconnue comme le principal déterminant de la diminution de la photosynthèse de la plante lorsqu'elle est soumise à une sécheresse (Medrano *et al.*, 2002). La conductance stomatique est un des traits que nous utiliserons dans cette étude comme un estimateur de la tolérance des plantes à la sécheresse.

Transport de l'eau et conductance hydraulique. L'eau circule dans la plante par des différentiels de pressions au travers d'un vaste réseau de vaisseaux qui vont de la racine à la feuille. Ce réseau constitue l'architecture hydraulique de la plante (Tyree et Zimmermann, 2002). On peut

considérer une plante ou un arbre comme un système hydraulique. Il existe une différence de pression partielle de vapeur d'eau entre l'air et l'intérieur des feuilles. Cette différence de pressions entraîne à son tour le transport de l'eau le long d'un gradient de pression depuis la racine jusqu'aux feuilles, ce qui entraîne à son tour le mouvement de l'eau du sol vers l'intérieur des racines (Craine *et al.*, 2012).

Les racines absorbent l'eau du sol pour compenser les pertes occasionnées par la transpiration au niveau des feuilles. Au niveau racinaire, l'absorption de l'eau se fait de manière passive, par différence de potentiel hydrique entre le sol et la racine. Il existe aussi des moyens actifs d'absorption de l'eau au niveau des racines. Ces mécanismes sont complexes et ne seront pas discutés ici.

Ce flux d'eau passe ensuite dans les tiges, toujours par différence de potentiel. Le flux d'eau dans les tiges se mesure par la conductance hydraulique qui représente la facilité avec laquelle l'eau se déplace dans les vaisseaux (Sack et Holbrooks, 2006). Elle est définie comme le rapport du taux d'écoulement par la différence de pression entre deux points (Sperry *et al.*, 2002). Au niveau des tiges, la conductance hydraulique dépend à la fois de la conductivité hydraulique individuelle de chaque vaisseau et du nombre de vaisseaux. La conductance hydraulique des tiges fait partie des traits que nous pensons être de bons prédicteurs de la tolérance à la sécheresse.

Le flux d'eau passe ensuite dans les feuilles où l'eau sera utilisée pour la photosynthèse. Au niveau des feuilles, il existe de nombreuses façons de caractériser le transport de l'eau. La conductance hydraulique ou le potentiel hydrique de la feuille sont des moyens de quantifier le flux d'eau ou la demande en eau de la feuille. Le maintien du transport de l'eau dans la plante est un problème auquel font face toutes les espèces végétales. Dans des conditions de sécheresse, si les racines ne sont plus capables de prélever l'eau du sol pour compenser la transpiration foliaire, des tensions se créent dans le système vasculaire des plantes. Ces tensions peuvent entraîner des défaillances au niveau du transport d'eau si la plante ne régule pas l'ouverture de ses stomates (Blackman *et al.*, 2010). La formation de bulles d'air dans les vaisseaux, un phénomène appelé cavitation, peut interrompre le transport d'eau et aller jusqu'à entraîner l'implosion des vaisseaux (Westoby et Wright, 2006). Les plantes ont développé des stratégies pour lutter contre la cavitation. Les différents auteurs ayant étudié le sujet ont mis à jour un

compromis général entre l'efficacité et la sécurité dans le transport hydraulique de l'eau (Cruiziat *et al.*, 2001 ; Sperry *et al.*, 2002). Ce compromis est appelé le "Safety-efficiency trade-off". Le principe est que la plante peut soit privilégier l'efficacité du transport par un allongement et un élargissement des vaisseaux, soit privilégier la sécurité par une augmentation de la densité de vaisseaux, de l'épaisseur de leurs parois ou une réduction de leurs diamètres (Hacke et Sperry, 2001 ; Reich *et al.*, 2003). Le diamètre des vaisseaux fait partie des traits que nous pensons être de bons prédicteurs de la tolérance à la sécheresse. Une défaillance du transport d'eau dans les tiges peut également perturber la transpiration et entraîner le flétrissement des feuilles. Le flétrissement des feuilles semble être un trait intéressant pour estimer la tolérance à la sécheresse.

Communication de la racine à la feuille. La gestion de l'eau dans la plante est capitale pour sa survie. Nous avons vu plus haut que les pertes d'eau dues à la transpiration au niveau des feuilles devaient être compensées par l'absorption d'eau au niveau des racines. Ceci implique que les différentes parties de la plante "communiquent" entre elles et s'échangent des éléments nutritifs, des hormones et des composés secondaires.

Les relations entre les phytohormones auxines et cytokinines sont importantes pour la régulation de la dominance apicale (action inhibitrice qu'exerce la région apicale d'une plante sur l'initiation ou le développement d'axes latéraux). L'auxine, synthétisée au niveau des bourgeons apicaux, inhibe le développement des bourgeons latéraux latents. Parallèlement, la cytokinine, synthétisée par les racines, favorise le développement des bourgeons latéraux et la croissance cellulaire en général. Les ajustements entre ces deux hormones sont une des composantes de la dominance apicale et de la ramification chez les plantes (Malladi et Burns, 2007).

Il existe une coordination fonctionnelle entre les racines et les feuilles. Les ressources acquises par les racines (eau et nutriments) sont transférées à la pousse (Westoby et Wright, 2006). Les racines transfèrent aussi les acides aminés qu'elles synthétisent vers les feuilles pour permettre la biosynthèse des protéines. Les protéines et les produits de la photosynthèse sont ensuite stockés dans les racines.

Il existe d'autres signaux chimiques émis par différentes parties de la plante et capables de modifier sa physiologie. Lorsque les racines sont soumises à un stress hydrique, elles produisent

une phytohormone : l'acide abscisique (ABA). Cette hormone est transportée par les vaisseaux de xylème de la racine vers les feuilles et est étroitement corrélée à la fermeture des stomates dans de nombreux systèmes végétaux (Malladi et Burns, 2007 ; Tardieu *et al.*, 1996). Parallèlement à l'action de l'ABA, il a été mis en évidence l'existence d'un signal électrique émis par la racine qui a été corrélé avec le contrôle stomatique (Gil *et al.*, 2008). De même, le manque d'azote dans les feuilles génère un signal qui modifie la physiologie de la racine, conduisant à l'activation de l'absorption du nitrate (Malladi et Burns, 2007).

Traits morphologiques et écophysologiques reliés au stress hydrique

Lors d'un stress hydrique, la croissance foliaire est une des premières fonctions touchées, ce qui a pour conséquence une diminution de la biomasse et de la productivité (Boyer, 1970, Boyer et Westgate, 2004). Dans cette étude, la croissance foliaire sera estimée par les traits de surface foliaire et de surface spécifique foliaire. Le stress hydrique modifie le métabolisme du carbone et de l'azote (Galmés *et al.*, 2007a ; Zhang *et al.*, 2008) avec une diminution des capacités photosynthétiques (Galmés *et al.*, 2013). La mesure de la photosynthèse constitue un des traits nous permettant d'estimer la tolérance au stress hydrique. Le rapport des parties aériennes sur les parties souterraines diminue (Chaves *et al.*, 2002) ainsi que le nombre de feuilles et la surface spécifique foliaire (Douma *et al.*, 2012 ; Knight *et al.*, 2006 ; Mitchell *et al.*, 2008a ; Wright et Westoby, 1999). Ces mesures d'allocation de ressources aux différentes parties de la plante semblent être des traits intéressants pour prédire la tolérance. En l'absence d'apport par l'irrigation ou par les pluies, l'épuisement de l'eau disponible pour la plante peut être retardé grâce à la fermeture des stomates qui limite les pertes par transpiration (Mitchell *et al.*, 2008b ; Sack *et al.*, 2003). À cette réponse rapide peuvent s'ajouter des adaptations plus lentes de la plante qui vont également limiter sa transpiration. Chez certaines espèces, on a observé des réorientations des feuilles (en général verticalement) (Valladares et Pearcy, 1997) ou même la pousse de poils sur leurs surfaces pour minimiser la radiation lumineuse reçue et limiter la transpiration (Kenzo *et al.*, 2008 ; Ripley *et al.*, 1999). Le ralentissement du développement foliaire limite en soi la surface d'échange alors que la baisse de densité stomatique ou l'épaississement, voire la modification de la cuticule qui imperméabilise les surfaces (Shepherd

et Griffiths, 2006) altèrent ses propriétés d'échanges. Ainsi, les espèces adaptées au stress hydrique ont tendance à avoir des feuilles épaisses, avec des cuticules épaisses et de petites cellules à parois épaisses (Reich *et al.*, 2003).

Face à la quantité de traits affectés par le stress hydrique, il est parfois difficile de savoir lesquels sont effectivement pertinents pour la prise en compte de la tolérance. Bien que nous ayons une idée de ce que représente la tolérance à la sécheresse, nous n'avons aucun moyen direct de la mesurer et sommes donc contraints de l'estimer par l'utilisation de prédicteurs (Tyree *et al.*, 2003). Cette limitation est un obstacle conceptuel majeur qui doit être dénoué si nous voulons un jour comprendre les mécanismes de tolérance à la sécheresse.

Hierarchisation des traits

Le choix des traits utilisés pour estimer la tolérance des espèces à la sécheresse est donc capital. Les traits choisis doivent être liés à la niche hydrologique des espèces. La pertinence d'un trait donné sera fortement liée à la proximité du trait avec sa/ses fonction(s) associée(s). La question de la proximité d'un trait avec sa fonction est un point capital pour le futur de l'écologie fonctionnelle. Plusieurs auteurs se sont intéressés aux liens qui existent entre différents traits fonctionnels et notamment à l'hypothèse que les traits fonctionnent de manière hiérarchisée.

Une des hiérarchisations les plus courantes est la distinction de trait « hard » et « soft » (Hodgson *et al.*, 1999 ; Violle *et al.*, 2007 ; Weiher *et al.*, 1999). Les traits « hard » sont ceux, habituellement physiologiques, qui capturent une fonction précise mais sont difficiles ou coûteux à mesurer. Par exemple, le trait fonctionnel physiologique de photosynthèse nette mesure directement la fonction photosynthétique de la plante mais nécessite des mesures de longues durées pour être fiable. Les traits « soft », en revanche, sont des substituts ou des proxys pour de telles fonctions et sont moins difficiles ou coûteux à obtenir. Les caractères « soft » sont habituellement morphologiques ou anatomiques. Ainsi, la surface spécifique foliaire est liée à la fonction photosynthétique mais ne la mesure pas directement. Une autre distinction entre traits « hard » et « soft » repose sur la vitesse de réponse des traits. Les traits « soft » montrent des temps de réponse plutôt lents face à des changements de conditions d'existence. La réponse d'un trait morphologique face à un changement de conditions du milieu ne sera visible que

lorsque la plante aura produit de nouvelles feuilles dont les propriétés seront liées aux nouvelles conditions. Ces temps de réponse relativement lents représentent une contrainte forte pour les plantes. Inversement, les traits physiologiques montrent des temps de réponse assez courts. Certaines fonctions de la plante, notamment l'ouverture et la fermeture stomatique ou la gestion de la température de la feuille, ont des temps de réponse de l'ordre de quelques minutes à une heure (Lambers, 2008 ; Reynolds-Henne *et al.*, 2010).

D'autres auteurs se sont intéressés à d'autres hiérarchisations des traits au sein des individus. Silvertown *et al.* (2015) posent l'hypothèse que les traits mesurés au niveau de l'individu, de ses organes et de ses cellules sont hiérarchisés. Cette hiérarchisation est liée aux valeurs des traits mais aussi à leurs gammes de variation. Silvertown *et al.* (2015) avancent l'idée que les valeurs et les gammes de variation des traits mesurées au niveau individuel contraignent les valeurs et les gammes de variation des traits mesurés au niveau des organes, eux-mêmes contraignant les traits cellulaires. Ces auteurs estiment également que les contraintes hiérarchiques s'appliquent aussi à différents compromis au sein de la plante. Silvertown *et al.* (2015) regroupe les traits en trois types de compromis :

- Un compromis au niveau des traits racinaires entre la tolérance au stress oxygénatif du sol et la capacité à absorber l'eau et les nutriments
- Un compromis au niveau des traits morphologiques et anatomiques de l'architecture hydraulique entre la maximisation des flux hydriques et la réduction des risques d'embolies pendant les périodes de stress hydrique
- Un compromis au niveau des traits physiologiques régissant l'échange de gaz au niveau de la feuille entre l'acquisition de CO₂ et la perte en H₂O

Ces trois compromis ne sont pas indépendants, comme les traits impliqués dans chacun d'eux. Il s'agit d'une question ouverte de savoir si ce deuxième compromis est aussi important pour les espèces herbacées, qui sont les espèces étudiées ici, que pour les arbres et les graminées.

Une autre hiérarchisation de groupes de traits a été proposée par Chapin III *et al.* (1993). Les traits les plus contraints, au sommet de la hiérarchie, sont morphologiques et anatomiques. Pour ce qui est des relations plantes-eau, ces traits sont l'anatomie du xylème, la taille et la forme de la racine et les aspects de l'anatomie des feuilles tels que la taille / la densité stomatique et les

traits de vénéation. Ces traits sont peu plastiques et ont des temps de réponse assez longs face à des variations rapides des conditions, puisqu'ils demandent le développement de nouveaux organes ou tissus. En référence aux trois compromis de Silvertown *et al.* (2015), ces traits seraient liés à l'architecture hydraulique. Ensuite dans la hiérarchie de Chapin III *et al.* (1993), ce sont les traits physiologiques qui sont contraints dans une gamme particulière de variation par les traits morphologiques et anatomiques. Ces traits physiologiques sont plus plastiques et ont des temps de réponse plus rapides. En référence aux trois compromis de Silvertown *et al.* (2015), ces traits seraient reliés aux traits impliqués dans les échanges gazeux au niveau de la feuille.

Compte tenu des groupements de traits décrits ci-dessus et du fait que nous avons surveillé la performance de plantes (survie) lors d'un seul événement de sécheresse, nous choisissons de nous concentrer sur le deuxième niveau hiérarchique de Chapin III *et al.* (1993) (c'est-à-dire les traits physiologiques plutôt que les traits morphologiques / anatomiques) et le deuxième et troisième compromis de Silvertown *et al.* (2015), qui correspond aux contraintes biophysiques régissant l'échange de gaz au niveau de la feuille. Nous choisissons ces niveaux d'étude non pas parce que nous croyons que les traits morphologiques ou anatomiques ne sont pas importants, mais parce que nous nous attendons (Chapin III *et al.*, 1993) à ce que les caractéristiques physiologiques liées à la tolérance à la sécheresse et l'évitement (Lelièvre *et al.*, 2011 ; Rosenthal *et al.*, 2010) soient les déterminants les plus proximaux lors d'un seul événement de sécheresse.

Objectifs

Au cours de ce doctorat, mon objectif général est d'identifier les traits fonctionnels morphologiques, anatomiques et physiologiques de tolérance à la sécheresse qui peuvent prédire la distribution des espèces le long d'un gradient hydrologique. Plus spécifiquement, nous cherchons à savoir :

1. Quels sont les traits physiologiques qui reflètent le mieux la tolérance à la sécheresse ?
2. Quelles sont les relations entre les traits morpho-anatomiques et les traits physiologiques de tolérance ?
3. Quels sont les traits morpho-anatomiques en conditions optimales permettant de prédire la tolérance des espèces herbacées à la sécheresse ?
4. Quelles formes ont les relations qui existent entre les traits morpho-anatomiques de tolérance en condition optimale et la présence des espèces en cas de sécheresse ?
5. Peut-on prédire les présences des espèces en cas de sécheresse à partir de leurs traits morpho-anatomiques ?

Ces objectifs sont résumés graphiquement dans la fig. 1.6. L'hypothèse que nous testons est que la présence des espèces le long du gradient de disponibilité en eau du sol peut être prédite par leurs traits physiologiques eux-mêmes prédits par leurs traits morpho-anatomiques. L'objectif 1 est de montrer les relations entre l'hydrologie du sol des espèces et les traits physiologiques de tolérance à la sécheresse. L'objectif 2 est de montrer qu'il existe des relations entre les traits physiologiques et morpho-anatomiques. L'objectif 3 est de montrer les liens directs entre la présence des espèces et les traits morpho-anatomiques. L'objectif 4 est de montrer l'ensemble des liens directs et indirects entre la présence des espèces et les traits morpho-anatomiques. L'objectif 5 est de comparer les prédictions du modèle avec des données d'observations en conditions naturelles.

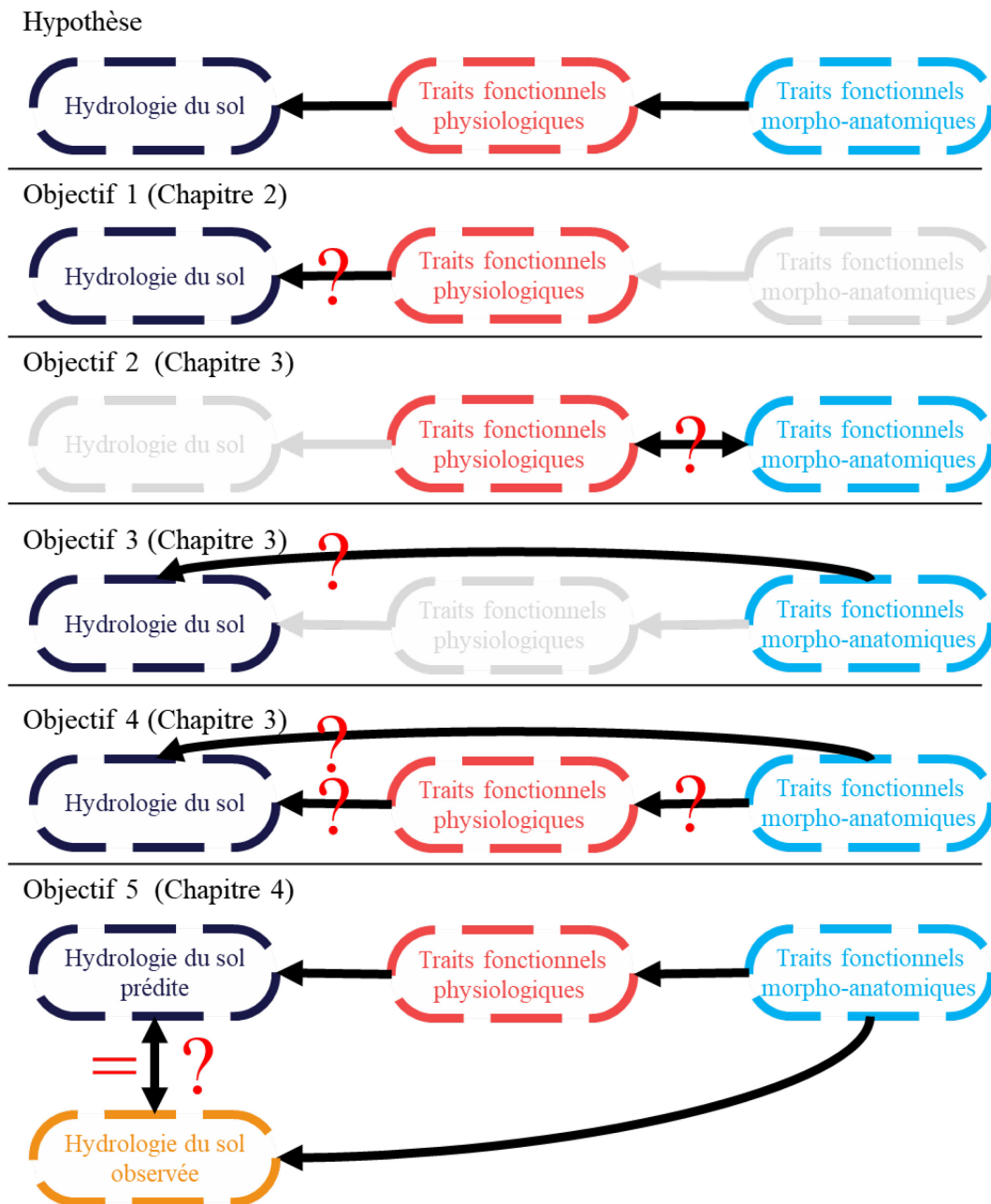


Figure 1.6 : Représentation graphique des hypothèses et objectifs de l'étude. L'objectif 1 est abordé dans le chapitre 2. Les objectifs 2 à 4 sont étudiés dans le chapitre 3. L'objectif 5 est examiné dans le chapitre 4.

Méthodes

Première expérience : en conditions contrôlées

Cette première expérience a pour but de répondre aux quatre premières questions posées dans ce doctorat. Nous allons chercher à déterminer les traits physiologiques les plus pertinents pour prédire la présence des espèces le long d'un gradient d'hydrologie (Objectif 1, Fig. 1.6). Nous chercherons ensuite les liens existants entre traits physiologiques et morpho-anatomiques (Objectif 2, Fig. 1.6) ainsi que la combinaison de traits nécessaire à la construction d'un modèle causal prédictif (Objectif 3 et 4, Fig. 1.6).

Site d'étude et choix des espèces. L'étude se déroulera en conditions contrôlées en chambre de croissance. Les conditions de croissance sont de 24°C (jours) (+/- 2°C) / 20°C (nuit) (+/- 2°C) avec un cycle 12 h/12 h, 45% d'humidité relative de l'air (+/- 5%), le rayonnement photosynthétiquement actif (ou PAR pour "photosynthetically active radiation") est en moyenne de 160 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (LI-250A Light Meter, Li-Cor) \pm 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ avec une ampoule « sodium haute pression » de 1000 W et une ampoule « halogénures métalliques » de 1000 W pendant 12 h par jour, ce qui donne un rendement quantique quotidien de 6,912 moles $\text{m}^{-2} \text{j}^{-1}$. Les plantes poussent dans un sol composé à 90 % de sable et 10 % de terre noire. Ce mélange a été choisi car il constitue un bon compromis entre les deux traitements appliqués. Le traitement témoin (contrôle) est un arrosage quotidien qui maintient le sol à sa capacité de rétention. Le traitement des stress est simplement un arrêt complet de l'arrosage après une date donnée. Nous avons donc besoin d'un sol qui permette un dessèchement relativement rapide lors de l'arrêt de l'arrosage, mais qui retienne aussi suffisamment l'eau pour ne pas se dessécher au cours d'une seule journée. Ceci permet d'éviter que les plantes en traitement témoins ne subissent un stress hydrique entre deux arrosages et permet des mesures quotidiennes tout au long du dessèchement du sol sur les individus en traitement stressant. Un engrais NPK (7/12/12) est ajouté au mélange de sols à raison de 6 g d'engrais par kg de sol pour éviter que les plantes ne subissent un stress nutritif lorsque le sol se dessèche.

Les caractéristiques hydrauliques du sol sont connues. Nous avons déterminé empiriquement les relations entre la teneur en eau volumétrique (VWC, m³ d'eau par m³ de sol) et la teneur relative en eau (RWC, g d'eau par g de sol) et entre RWC et le potentiel d'eau du sol (Ψ , MPa) pour notre substrat de plantation. La combinaison de ces relations nous a permis d'estimer le potentiel hydrique du sol (la mesure la plus physiologiquement pertinente, mais nécessitant de nouveaux échantillons de sol à chaque mesure) à partir des mesures de VWC (Fig. BB1, ANNEXES B), qui sont plus rapide et plus faciles à obtenir que le potentiel d'eau du sol sans retirer du sol des expériences. Cette étape est nécessaire car nous prenons les mesures quotidiennes de VWC tout au long des expériences.

L'expérience porte sur 25 espèces herbacées originaires d'Europe de l'Ouest, du Brésil et d'Amérique du Nord et de l'est du Canada. Ces espèces ont été choisies pour :

- Leur répartition le long d'un gradient d'hydrologie, de très humide à très sec
- Pour représenter les différentes stratégies phénologiques (annuelles, bisannuelles et pérennes)
- Et pour leur distribution sur le triangle de stratégies CSR de Grime (2002) (Table 1.1).

Nous avons choisi d'exclure les espèces herbacées graminoides et les poacées de l'expérience à cause de l'absence de tige chez ces espèces. Nous avons également pris garde à ne pas sélectionner d'espèces pouvant avoir des rhizomes ou des structures de multiplication végétative souterraines. Nous avons choisi ces espèces à partir d'un ensemble initial de plus de 80 espèces disponibles, provenant à la fois des fournisseurs commerciaux et de populations locales.

Table 1.1 : Liste des 25 espèces sélectionnées pour l'expérience en conditions contrôlées. Les stratégies suivent la classification de Grime (2002). L'hydrologie du sol est basée sur notre propre classification décrite dans les paragraphes suivants.

Espèce	Hydrologie du sol	Cycle de vie	Ordre	Famille	Stratégie
<i>Achillea millefolium</i>	Sec	Vivace	Asterales	Asteraceae	CSR
<i>Asclepias syriaca</i>	Sec	Vivace	Gentianales	Apocynaceae	-
<i>Campanula americana</i>	Inter.	Annuelle / Bisannuelle	Asterales	Campanulaceae	-
<i>Centaurea cyanus</i>	Inter.	Annuelle / Bisannuelle	Asterales	Asteraceae	-
<i>Cerastium tomentosum</i>	Sec	Vivace	Asterales	Caryophyllaceae	-
<i>Chenopodium polyspermum</i>	Humide	Annuelle	Caryophyllales	Amaranthaceae	CR
<i>Cistus salviifolius</i>	Sec	Vivace	Violales	Cistaceae	C / CSR
<i>Daucus carota</i>	Inter.	Bisannuelle	Apiales	Apiaceae	SR / CSR
<i>Epilobium ciliatum</i> subsp. <i>glandulosum</i>	Humide	Vivace	Myrtales	Onagraceae	R / CSR
<i>Erigeron canadensis</i>	Sec	Annuelle	Asterales	Asteraceae	-
<i>Eupatorium perfoliatum</i>	Humide	Vivace	Asterales	Asteraceae	-
<i>Hypericum perforatum</i>	Humide	Vivace	Malpighiales	Hypericaceae	CR / CSR
<i>Jacquemontia gracillima</i>	Inter.	Vivace	Solanales	Convolvulaceae	-
<i>Lythrum salicaria</i>	Humide	Vivace	Myrtales	Lythraceae	-
<i>Medicago lupulina</i>	Sec	Annuelle / Bisannuelle	Fabales	Fabaceae	R / CSR
<i>Medicago sativa</i>	Inter.	Vivace	Fabales	Fabaceae	C / CSR
<i>Melilotus albus</i>	Sec	Bisannuelle	Fabales	Fabaceae	CR
<i>Myagrum perfoliatum</i>	Inter.	Annuelle	Brassicales	Brassicaceae	-
<i>Nigella damascena</i>	Inter.	Annuelle	Ranunculales	Ranunculaceae	-
<i>Plantago lanceolata</i>	Sec	Vivace	Lamiales	Plantaginaceae	CSR
<i>Rumex acetosella</i>	Sec	Vivace	Caryophyllales	Polygonaceae	SR / CSR
<i>Scorzoneroïdes autumnalis</i>	Sec	Vivace	Asterales	Asteraceae	R / CSR
<i>Silene vulgaris</i>	Sec	Vivace	Asterales	Caryophyllaceae	CSR
<i>Stellaria media</i>	Inter.	Annuelle	Asterales	Caryophyllaceae	R
<i>Trifolium pratense</i>	Inter.	Vivace	Fabales	Fabaceae	CSR

Attribution des espèces aux différents groupes d'hydrologie du sol. Dans un monde idéal, nous connaîtrions l'abondance relative de chaque espèce *in situ* selon un gradient quantitatif de disponibilité en eau du sol et, le long de ce gradient, là où chaque espèce atteint son abondance maximale. Cependant, comme décrit dans l'introduction, des mesures quantitatives de disponibilité en eau du sol ne sont que très rarement disponibles. Pour contourner ce problème, nous avons construit un classement ordinal d'affinité d'habitat par rapport à la disponibilité en eau du sol pour :

- Les espèces typiques des sols secs
- Les espèces typiques des sols intermédiaires
- Les espèces typiques des sols humides (mais non continuellement inondés).

Une variable ordinaire est une variable catégorielle pour laquelle les valeurs possibles sont ordonnées (ici, le niveau d'humidité du sol) mais non quantitatives et sans unité. Pour attribuer une espèce à un rang ordinal donné, nous avons combiné plusieurs sources (les détails sur les sources sont indiqués dans la Table B.1 (ANNEXES B)). Lorsqu'elles sont disponibles (13 espèces), nous avons obtenu un indice d'aridité moyen (c.-à-d. les précipitations annuelles divisées par évapotranspiration annuelle) associé avec une espèce à partir de la base de données TRY (Kattge *et al.*, 2001). Nous avons également obtenu, lorsqu'elles sont disponibles (16 espèces), l'indice d'eau du sol d'Ellenberg (Ellenberg, 1988 ; Hill *et al.*, 1999).

Heinz Ellenberg (1988), en se basant sur la flore allemande, a défini une série d'échelles ordinales (des facteurs ordonnés) pour sept variables environnementales majeures (le niveau d'irradiation lumineuse, l'humidité du sol, le pH, la disponibilité en nutriments, la salinité du sol, la température annuelle moyenne et la continentalité). Il attribue ensuite un « score indicateur », pour chaque variable environnementale, à chaque espèce, en fonction de la position où elle est plus souvent observée le long de chaque gradient. Ces indicateurs peuvent être considérés comme des descriptions approximatives de la niche hutchinsonienne réalisée de chaque espèce (Hutchinson 1957). Les échelles sont des facteurs ordonnés et vont de 1 (niveau le plus bas) à 9 (niveau le plus élevé) à l'exception de l'humidité qui va jusqu'à 12 (voir ANNEXES D, supplementary material, pour les détails des classes de niveau d'irradiation lumineuse, d'humidité du sol et de disponibilité en nutriments).

D'autres descriptions générales d'habitat par rapport à la disponibilité de l'eau du sol ont été obtenues à partir de la base de données en ligne du Département de l'agriculture des États-Unis (<http://plants.usda.gov/java/>), des bases de données en ligne eFlora (<http://www.efloras.org/index.aspx>) et TelaBotanica (Julve, 1998) et aussi des flores locales (Marie-Victorin *et al.*, 2002).

Dispositif expérimental. Pour des raisons de temps de manipulation et d'espace disponible dans la chambre de croissance, l'expérience est réalisée en trois séries. Les deux premières séries serviront à mesurer les traits physiologiques de tolérance. La troisième série sera réalisée pour faire les mesures des traits morpho-anatomiques. La première série porte sur 17 espèces, la deuxième sur 8 espèces. Toutes les espèces seront soumises à un traitement témoin (contrôle) et à un traitement de stress hydrique (5 individus par traitement et par espèce). La troisième série porte sur les 25 espèces choisies en traitement témoin uniquement (5 individus par espèce). Le traitement de stress est simplement un arrêt de l'arrosage alors que pour le traitement témoin, l'arrosage est maintenu identique.

La position des espèces dans le dispositif et le traitement appliqué sont déterminés aléatoirement pour pallier l'hétérogénéité de la lumière, de la ventilation et à la présence des murs. Les graines sont semées directement dans les pots, sur le sol humidifié, à raison d'une espèce par pot. Tous les pots sont maintenus à capacité aux champs par arrosage quotidien pot par pot. Plusieurs éclaircissements ont été réalisés pour conserver un seul individu par pot. Pour chaque espèce, les individus sont choisis de façon à limiter les différences de taille et de phénologie.

Pour les deux premières séries d'expériences, le traitement de stress est appliqué lorsque les individus sont jugés suffisamment développés (± 1 mois après germination). Les individus en traitement témoin sont arrosés quotidiennement de façon à ce que les pots restent humides. Les individus en traitements stressés ne sont plus arrosés jusqu'au terme de l'expérience. La teneur en eau volumétrique du sol est mesurée quotidiennement pour chaque pot (stressé et contrôle). Pour les deux premières séries, les mesures des traits estimateurs sont réalisées quotidiennement sur tous les individus (stressés et témoins) à partir du jour de démarrage du traitement. Les mesures sont réalisées jusqu'à ce que les individus en traitement stressé aient atteint un stade de

flétrissement très avancé. La durée de l'expérience pour chaque espèce est notée et définit le temps d'expérience lors de la troisième série.

La troisième série ne comprend que des plantes en traitement témoin de chaque espèce. Cette série servira à mesurer l'ensemble des traits prédictifs de tolérance. Ces mesures sont réalisées à la fin de l'expérience. La durée de l'expérience pour chaque espèce a été identique dans les trois séries afin de limiter les effets de l'âge des plantes.

Mesure des traits physiologiques de tolérance. Les traits physiologiques de la tolérance au stress sont utilisés pour répondre à l'objectif 1 (Fig. 1.6). Ceux-ci sont la conductance stomatique, la photosynthèse nette et un indice de flétrissement. Les mesures d'indice de flétrissement et de conductance stomatique sont quotidiennes et réalisées sur tous les individus (stressés et contrôles). Chaque jour, pour chaque pot, la teneur en eau volumétrique du sol est mesurée à l'aide d'un capteur d'humidité HydroSense II (CD660, Campbell Scientific).

L'indice de flétrissement visuel n'est pas un trait physiologique à proprement parler. Cependant, nous avons choisi cette mesure parce qu'elle représente un moyen rapide d'estimer le niveau des stress subit par la plante. Tyree *et al.* (2002) ont montré que le flétrissement visuel constitue un estimateur fidèle de l'état hydrique de la plante. Dans cette étude, les stades de flétrissement sont mesurés visuellement en utilisant l'indice défini par Tyree *et al.* (2003) auquel nous avons ajouté des modifications dues à la présence d'espèces en rosette dans l'étude.

L'échelle de notation est définie par rapport aux plantes témoins de la même espèce. Le stade 0 (contrôle) est défini comme une feuille typique du groupe témoin de l'espèce dans un sol à la capacité aux champs. Le stade 1 (légèrement flétrie) est défini comme une feuille proche du stade 0 (contrôle) mais légèrement inclinée vers le sol et/ou avec une légère perte de rigidité de la nervure principale, par rapport aux témoins. Le stade 2 (flétrie) est défini comme une feuille sans signe de chlorose, mais avec un changement de l'angle des feuilles de $\pm 45^\circ$ vers le sol et/ou avec des limbes qui ont commencé à se recourber vers l'intérieur parallèlement à la nervure principale et/ou avec une nécrose très limitée (gris-vert à gris-brun) et/ou avec une perte de rigidité de la nervure principale, par rapport aux témoins. Le stade 3 (fortement flétrie) est défini comme une feuille encore verte, avec un changement d'angles des feuilles de $\pm 90^\circ$ et/ou avec un enroulement horizontal de la feuille et/ou avec des zones nécrotiques plus ou moins étendues

(gris-vert à gris-brun), principalement à proximité des marges des feuilles et/ou avec des pointes de feuilles enroulées et/ou avec une perte complète de la rigidité et de la turgescence des nervures, par rapport aux témoins. Le stade 4 (presque mort) est défini comme des feuilles montrant des parties nécrotiques et/ou avec des enroulements importants et/ou avec des angles de 90°, par rapport aux témoins, mais des feuilles jeunes encore vertes près de la nervure centrale, par rapport aux témoins. Chaque jour, nous avons noté tous les individus sur cette échelle de 0 à 4. Nous considérons qu'un individu a changé de stade lorsque la majorité de ses feuilles et la feuille utilisée pour les mesures physiologiques ont changé de stade. Pour chaque individu en traitement stressé, l'expérience est arrêtée quand il atteint le stade 4. Les mesures sur les individus Témoin de chaque espèce (contrôle) sont poursuivies jusqu'à ce que le dernier individu en traitement stressé ait atteint le stade 4. Nous avons également enregistré, pour chaque individu, le nombre de jours requis pour atteindre le stade 4.

La conductance stomatique (g_s) ($\text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) est mesurée à l'aide d'un poromètre (SC-1, Decagon Devices) sur tous les individus, quel que soit le traitement. Les mesures sont réalisées au début de l'expérience, avant l'arrêt de l'arrosage, puis tous les jours après l'arrêt de l'arrosage, à mesure que le sol se dessèche, et jusqu'au moment où les feuilles des individus stressés ont atteint le stade 4 de flétrissement (voir plus haut). Ces mesures permettent de dresser des profils de diminution de la conductance à mesure que le sol se dessèche. Ces profils permettront d'obtenir la conductance maximale, minimale ainsi qu'à chaque stade de flétrissement entre le début et la fin de l'expérience pour chaque espèce. Nous considérerons aussi la pente de la diminution de conductance et les points d'inflexion des profils.

La photosynthèse nette (A) ($\text{mmol}_{\text{CO}_2} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) est mesurée à l'aide d'un CID (CI-340, CID Bioscience, Inc.) sur tous les individus, quel que soit le traitement. Les mesures sont réalisées au début de l'expérience, avant le démarrage du traitement de stress, puis une autre fois après le démarrage du traitement, lorsque les feuilles des individus stressés ont atteint le stade 2 de flétrissement. Les mesures de photosynthèse permettront d'obtenir la photosynthèse maximale et au stade 2 de flétrissement ainsi que le taux d'efficacité d'utilisation de l'eau maximale et au stade 2 de flétrissement (« water use efficiency », WUE) pour chaque espèce.

Mesure des traits morpho-anatomiques des espèces. Les traits morpho-anatomiques sont utilisés pour répondre à l'objectif 2 (Fig. 1.6). Ceux-ci sont mesurés, une fois, sur des plantes en traitement témoin de chaque espèce lors de la troisième série d'expériences. Ces individus de chaque espèce ont poussé pendant un temps équivalent à leurs homologues stressés lors des deux premières séries d'expériences. La mesure des traits est réalisée en tenant compte des protocoles de mesures standardisées fournies par Cornelissen *et al.* (2003), Garnier *et al.* (2001) Pérez-Harguindeguy *et al.* (2013) et Poorter *et al.* (2012). Au cours de cette expérience, nous avons mesuré 26 traits morpho-anatomiques au niveau de la plante entière, des feuilles, tiges et racines. Les 26 traits sont les suivants :

- Sur la plante entière : la hauteur végétative, la masse sèche totale, le taux de croissance relatif maximal, la surface totale de feuilles, le nombre de feuilles et les allocations racinaire/caulinaire et racinaire/foliaire.
- Sur les feuilles : la surface moyenne d'une feuille, la surface spécifique foliaire (SLA), la teneur en matière sèche des feuilles (LDMC), la teneur en azote (LNC) et carbone foliaire, le ratio carbone/azote foliaire, la densité de nervures, le potentiel hydrique de la feuille, la longueur et largeur moyenne d'un stomate, la surface moyenne d'un stomate ($stom_{area}$), la densité stomatique et la densité stomatique spécifique.
- Sur la tige : la teneur en matière sèche des tiges, la densité spécifique de la tige et le potentiel hydrique de la tige.
- Sur les racines : la teneur en matière sèche des racines, la longueur racinaire et la longueur spécifique racinaire (SRL).

Parmi les 26 traits morpho-anatomiques mesurés, seulement cinq traits ont finalement été inclus dans les analyses. Les cinq traits inclus dans l'analyse sont la surface spécifique foliaire (SLA), la teneur en matière sèche foliaire (LDMC), la teneur en azote foliaire (LNC), la surface stomatique ($stom_{area}$) et la longueur spécifique racinaire (SRL). Les valeurs moyennes des 21 traits restants pour chaque espèce sont reportées en ANNEXES A. Ceux-ci n'ont pas été retenus à cause de leurs faibles relations avec les traits physiologiques.

La teneur en matière sèche des feuilles (LDMC, $g \cdot g^{-1}$) est mesurée comme le rapport entre la masse sèche sur la masse fraîche de toutes les feuilles matures de l'individu entier. Toutes les

masses sèches sont obtenues de la même façon. Les échantillons sont placés dans un four à 60°C pendant 3 à 4 jours puis pesés sur une balance de précision. La superficie foliaire spécifique (SLA, m² kg⁻¹) est une mesure du rapport entre la surface foliaire sur la masse sèche de toutes les feuilles matures de l'individu entier. La surface des feuilles a été mesurée à l'aide d'un scanner. La teneur en azote des feuilles (LNC, mg g⁻¹) est mesurée comme le rapport entre la masse sèche de l'azote des feuilles et la masse sèche de la feuille. La masse d'azote des feuilles a été analysée par combustion à sec (Vario Macro, Elementar analysensystem GmbH, Haan, Allemagne). La surface stomatique (stom_{area}, μm²) est calculée en approximant le stomate à une ellipse : surface = $(\pi / 2)$ (longueur stomatique) (largeur stomatique). Des empreintes des feuilles sont obtenues en plaçant un vernis transparent sur la face inférieure des feuilles, puis en prenant des images numériques à partir d'un microscope à l'aide d'un objectif à 20X et 40X (Microscope: Axio Observer Z1 Objectif: Zeiss 20x / 0.8 Plan-Apochromat, Zeiss 40x / 0.95 Plan-Apochromat: Appareil photo: Zeiss AxioCam 506 mono, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Allemagne). La longueur et la largeur stomatique (μm) sont mesurées à l'aide du logiciel d'imagerie Fiji (Schindelin *et al.*, 2012). La longueur et la largeur sont la longueur et la largeur maximales des cellules de garde qui composent le stomate. Les mesures sont prises sur cinq stomates par image, dix images par feuille et deux feuilles de chaque individu par espèce. Les images sont prises le long des deux côtés de la nervure principale au milieu de la feuille. Nous utilisons la valeur moyenne de toutes les mesures par individu par espèce. La longueur spécifique racinaire (SRL, m g⁻¹) est mesurée comme le rapport entre la longueur de racine de la moitié du système racine et la masse sèche de la même moitié du système racinaire. Après le nettoyage du système racine, la longueur de la racine a été mesurée à l'aide d'un scanner et du logiciel WinRhyzo (Régent Instruments Inc., Québec, Canada).

Analyses statistiques. Les analyses statistiques suivantes permettent de répondre aux objectifs 3 et 4 (Fig. 16.). Toutes les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel R (R Core Team 2015). Les traits physiologiques et morpho-anatomiques feront l'objet d'analyses statistiques descriptives classiques. Les relations entre les traits seront étudiées par des analyses de corrélations, des analyses en composantes principales (ACP), des analyses des variances (ANOVA), des régressions linéaires et linéaires multiples, sur les moyennes des traits par espèce

et par traitement. Cette étape va nous permettre de dresser des diagrammes conceptuels des relations entre les traits physiologiques et les groupes d'hydrologie des sols, entre les traits physiologiques eux-mêmes, entre les traits morpho-anatomiques et physiologiques et entre les traits morpho-anatomiques eux-mêmes. Nous pourrons ensuite tester les différents diagrammes créés grâce aux méthodes d'analyses de piste.

Les analyses de pistes sont un ensemble de procédures statistiques permettant de formaliser des systèmes de relations causales entre plusieurs variables. Ces analyses vont nous permettre de faire apparaître des relations causales entre les traits physiologiques et de sélectionner le modèle de relations causales le plus robuste et qui respecte les significations biologiques des traits. La première utilité des analyses de pistes, dans cette étude, est de faire apparaître les relations causales existant entre les traits physiologiques et les traits groupes d'habitats. Cette analyse devrait nous dévoiler quels traits physiologiques sont les plus pertinents pour prédire la présence d'une espèce sur un type de sol donné. Dans un deuxième temps, nous étudierons les relations entre les traits physiologiques et morpho-anatomiques dans le but de mettre en évidence des relations causales entre les deux groupes de traits. Nous nous intéresserons également aux relations causales possibles entre les traits morpho-anatomiques et les groupes d'hydrologie des sols. À l'issue de ces analyses, nous serons en mesure de construire un modèle causal permettant de prédire les présences des espèces sur le gradient d'hydrologie en se basant sur leurs traits physiologiques et morpho-anatomiques.

Deuxième expérience : en conditions naturelles

La deuxième expérience a pour but de tester le modèle développé dans la première expérience et ainsi répondre à la dernière question posée dans ce doctorat (Objectif 5, Fig. 1.6).

Peut-on prédire les abondances et les distributions des espèces en cas de sécheresse à partir de leurs traits morpho-anatomiques ? Cette deuxième expérience va tester la fiabilité du modèle *in situ*. Le passage en conditions naturelles va permettre de révéler l'importance des contraintes biotiques (les interactions entre espèces) et abiotiques autres que l'eau (nutriment, perturbations, pH) sur la présence des espèces le long d'un gradient d'hydrologie. Les prévisions du modèle pourraient être faussées par l'ajout de ces contraintes dans le système.

Site d'étude et choix des espèces. Les sites d'études pour l'expérience en conditions naturelles se situent dans la région de Sherbrooke, au Québec (Canada). Nous avons sélectionné 13 sites susceptibles de représenter un gradient de conditions hydrologiques, allant de sols humides à des sols secs. Ces sites sont tous situés dans des milieux ouverts et en présence d'une population de plantes herbacées et de graminées. Ces sites diffèrent cependant par leurs types de sols (sableux, argileux...) et leur usage (bords de rivière, de chemin, carrière...). Sur chaque site, les sols sont caractérisés en utilisant des mesures de texture et d'hydrologie (teneur en eau du sol, pourcentage de sable, limon, roche...). Ces mesures permettent de classer les sites sur un gradient hydrologique en utilisant des analyses de groupement.

Mesure des traits morpho-anatomiques des espèces. Les traits morpho-anatomiques des espèces et leurs abondances en conditions naturelles sont utilisés pour répondre à l'objectif 5 (Fig. 1.6). Les espèces prises en compte dans l'étude sont les trois espèces dicotylédones herbacées dominantes pour chaque site (nous excluons les arbres, arbustes et graminées). Nous estimerons l'abondance des espèces dans les sites par la méthode du point transect. Des traits morpho-anatomiques seront mesurés sur toutes les espèces choisies dans chacun des sites. Ces traits sont ceux identifiés dans la première expérience et qui permettent de prédire la présence d'une espèce sur un gradient hydrologique. Ces traits sont mesurés en tenant compte des protocoles de mesures standardisées fournies par Cornelissen *et al.* (2003), Garnier *et al.* (2001) Pérez-Harguindeguy *et al.* (2013) et Poorter *et al.* (2012) et de façon similaire à la première expérience.

Analyses statistiques. Toutes les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel R (R Core Team 2015). À partir des abondances des espèces mesurées sur les sites et de la classification des sites sur le gradient hydrologique, nous pouvons déterminer les présences des espèces sur chaque type de sol. À partir du modèle causal prédictif construit grâce à l'expérience précédente, nous pouvons, en utilisant les traits des espèces mesurées *in situ*, prédire la position de ces espèces le long du gradient hydrologique. Ainsi, en comparant les présences observées *in situ* avec les présences prédites par le modèle, nous pourrions tester la fiabilité des prédictions. Les présences observées et prédites seront analysées à l'aide d'indices de similarité/dissimilarité.

Contributions et originalités du sujet

La réalisation de ce doctorat comporte plusieurs originalités. La première repose sur les types de plantes étudiés. La majorité des études sur le stress hydrique et la sécheresse portent sur des espèces d'arbres, des graminées ou des plantes herbacées ayant une utilité pour l'homme (Bartlett *et al.*, 2012b ; Blackmann *et al.*, 2010 ; Brodribb et Holbrook, 2003 ; Medrano *et al.*, 2002 ; Mitchell *et al.*, 2008b ; Reich *et al.*, 2003 ; Sack et Holbrook, 2006 ; Tardieu et Simonneau, 1998 ; Tyree *et al.*, 2003). L'utilisation d'espèces herbacées (hors graminées) dans des études de stress hydrique est relativement peu courante (Galmés *et al.*, 2007a, 2007b ; Marino *et al.*, 2010 ; Olano *et al.*, 2013, Volaire, 2008). Cette étude permettra d'étudier les mécanismes de tolérance et de réponse des espèces dicotylédones herbacées à une sécheresse prolongée. Cette étude permettra également de confirmer ou d'infirmer l'existence de mécanismes de réponse commune entre les plantes herbacées et les arbres et graminées. La deuxième originalité majeure de ce doctorat vient de l'approche utilisée. Dans cette étude, nous considérons deux types de traits fonctionnels. Certains traits sont acquis sur des plantes en conditions stressantes (traits physiologiques dits « hard »), tandis que d'autres sont mesurés sur des individus en conditions optimales de croissance (traits morpho-anatomiques dits « soft »). Ces deux types de traits vont être mis en relation entre eux et avec les distributions d'espèces issues de la littérature. L'étude des liens et de la force des liens entre les traits physiologiques et morpho-anatomiques est un point capital pour le développement de l'écologie fonctionnelle.

L'aspect prédictif du sujet est la troisième originalité de ce doctorat. Le but de cette étude est d'obtenir une prédiction sur des distributions et des abondances d'espèces. Pour ce faire, nous utilisons une méthode statistique puissante appelée "l'analyse de pistes". Cette approche permet d'étudier des liens de causalité entre variables et de construire des modèles explicites et prédictifs. Cette méthode d'analyse est relativement récente et montre des résultats très encourageants.

Quatrièmement, cette étude va porter sur des expériences réalisées en milieu contrôlé et en milieu naturel. Cette approche va nous permettre d'explorer les relations entre les traits fonctionnels en conditions contrôlées et en conditions naturelles. Ces différences vont permettre de s'intéresser aux effets d'un facteur abiotique (l'eau), au travers de la première expérience en conditions contrôlées, et aux effets conjugués des facteurs biotiques et abiotiques (dont l'eau) grâce à l'expérience en conditions naturelles. Nous pourrons ainsi tester nous-mêmes la fiabilité de notre modèle prédictif.

Chapitre 2

-

PREDICTING HABITAT AFFINITIES OF HERBACEOUS DICOTS TO SOIL WETNESS BASED ON PHYSIOLOGICAL TRAITS OF DROUGHT TOLERANCE

Description de l'article et contribution

L'assemblage des espèces (leurs présences/absences) dans une communauté naturelle est la conséquence de plusieurs mécanismes de filtrage réalisés par l'environnement. Parmi ces filtres, le filtre abiotique sélectionne les espèces capables de tolérer les conditions environnementales locales. La variation de la disponibilité de l'eau dans le sol est l'un des principaux gradients environnementaux selon lesquels les espèces végétales sont différemment réparties. L'objectif de cet article est de déterminer les traits physiologiques les plus pertinents pour prédire la présence des espèces le long d'un gradient d'hydrologie. Plus précisément, nous voulons savoir :

- Quels sont les traits physiologiques qui prédisent le mieux les différents niveaux de tolérance de la sécheresse dans les dicotylédones herbacées ?
- Dans quelle mesure les préférences d'habitat des espèces sont-elles prédites par leurs réponses physiologiques à la sécheresse ?
- Quelles sont les relations directes et indirectes entre les traits physiologiques et comment interagissent-elles pour déterminer les préférences d'habitat de l'espèce ?

Nos résultats suggèrent qu'une combinaison de cinq traits physiologiques liés à la tolérance à la sécheresse permet de prédire les préférences d'habitat des espèces. Cet article est la première étape vers la construction d'un modèle prédictif des préférences d'habitat des espèces herbacées le long d'un gradient d'hydrologie des sols.

Pour cet article, j'ai élaboré le dispositif expérimental avec l'aide de Bill Shipley et Benoit Lapointe. J'ai réalisé la prise de données avec l'aide de Anthony Roy. J'ai choisi et réalisé les analyses statistiques avec l'aide de Bill Shipley et Cédric Frenette-Dussault. J'ai rédigé le texte

principal conjointement avec Bill Shipley. Marc Vellend, Bill Parsons, Denis Vile, Florence Volaire, Sophie Gachet, Cédric Frenette-Dussault et Françoise Cardou ont fourni des commentaires sur les versions précédentes de l'article. Cet article a été soumis au journal scientifique « *Annals of Botany* » le 9 septembre 2016, a été accepté le 23 novembre 2016 et publié électroniquement le 4 Février 2017.

Belluau, M., and Shipley, B. (2017). Predicting habitat affinities of herbaceous dicots to soil wetness based on physiological traits of drought tolerance. *Ann. Bot.* *119*, 1073–1084.

Cet article a également permis de tester la méthode d'analyse par « Cumulative Link Model » (CLM) et la rédaction d'un article par Bill Shipley, moi-même et 15 autres auteurs. Cet article a été soumis au journal scientifique « *Journal of Vegetation Science* » le 26 mai 2016 et a été accepté pour publication le 17 May, 2017.

Shipley, B., Belluau, M., Kühn, I., Soudzilovskaia, N.A., Bahn, M., Penuelas, J., Kattge, J., Sack, L., Cavender, J., Ozinga, W.A., Blonder, B., van Bodegom, P.M., Manning, P., Hickler, T., Sosinski, E., De Patta Pillar, V., and Onipchenko, V. (2017). Predicting habitat affinities of plant species using commonly measured functional traits. *J. Veg. Sci.* (*accepté*).

Predicting habitat affinities of herbaceous dicots to soil wetness based on physiological traits of drought tolerance

Belluau M. and Shipley B.

Abstract

Background and Aims. Soil water availability is an important mechanism filtering plant species but the functional basis of this filtering in herbaceous dicots is poorly studied. The authors address three questions: Which physiological traits best predict different levels of drought tolerance or avoidance in herbaceous dicots? To what degree can species' habitat preferences along the gradient of soil moisture availability be predicted by their physiological responses to drought? What are the direct and indirect relationships between the physiological traits and how do they interact to determine the species' habitat preferences?

Methods. Twenty-five species of herbaceous dicots whose field distributions span a gradient of soil moisture from continually moist to dry were chosen. Under controlled conditions, watering was stopped in a treatment group, the plants were monitored until death of the above-ground tissues and compared with a control group watered at field capacity. Fourteen traits related to plant water economy were measured, including stomatal conductance, net photosynthesis and the visual wilting of leaves. Traits were then analyzed using a cumulative link model and path analysis.

Key Results. Five physiological traits (stomatal conductance and net photosynthesis measured at soil field capacity, water use efficiency, stomatal conductance and soil water potential measured when leaves begin to wilt) related to the ability to acquire resources (when water is not limiting) or conserve water (when it is limiting) best predicted different levels of drought tolerance or avoidance in herbaceous dicots.

Conclusions. Species's habitat preferences can be fairly predicted by their physiological responses to drought ($R^2=0.48$). Strong direct and indirect relationships between the five identified traits (plus net photosynthesis at wilting and the time until death) led to synergistic and antagonistic relationship in a path analysis model. To allow better prediction of species

distributions along a wetness gradient, the next step would be to link these physiological traits to more accessible functional traits.

Introduction

It is obvious, when looking at the full range of variation (deserts to aquatic habitats), that different plant species are preferentially found in habitats having different amounts of available soil water. However, as the recent review by Silvertown *et al.* (2015) makes clear, this is also true for more restricted ranges of soil water availability, even the subtle variations in soil water that can occur within a single local community (Silvertown *et al.*, 1999). Variation in soil water availability is therefore one of the major environmental gradients along which plant species are differentially distributed, and different species occupy different hydrological (realized) niches (Araya *et al.*, 2011). However, soil water availability is an environmental variable that is highly variable in both space and time and is determined by precipitation patterns, local topography, soil structure and spatial and temporal variation in the depth of the water table (Silvertown *et al.*, 2015). An actual quantification of realized hydrological niches for many species spanning the hydrological gradient would therefore require detailed and repeated measurements of these physical properties over large spatial scales. We lack true measures of the location of species realized hydrological niches for all but a very small amount of plant species. However, it is still possible to produce a coarse ordinal categorization of habitats with respect to soil water availability (and thus the realized hydrological niches of species that reach their distributional optima within such habitats) without such detailed physical measurements. This is the approach used in this study.

A basic assumption of trait-based ecology is that morphological, physiological or phenological attributes measured at the level of cells, tissues, organs or single individuals determine whole-plant attributes related to individual performance (growth, reproduction, survival) in a given environment, which, in turn, determine the demographic performance of species in that environment (Violle *et al.*, 2007). This, in turn, translates into different distributions along environmental gradients (i.e. realized niches) through the process of trait filtering during community assembly (Keddy, 1992; Shipley, 2010). In the context of gradients in soil water

availability, these realized hydrological niches would be determined by trade-offs in functional traits that are involved in the water economy of a plant and those are implicated in determining plant performance along this environmental gradient. It follows from this assumption that, given the relevant functional traits, one should be able to predict both whole-plant performance and species' relative abundances along environmental gradients. Several empirical demonstrations of the latter are now available (Shipley *et al.*, 2006, 2011; Sonnier *et al.*, 2010), including along a local gradient of soil water availability (Baastrup-Spohr *et al.*, 2015). Given this, what are the functional traits controlling the field distributions of plant species along a gradient of soil water content? An answer to this question would undoubtedly involve many different physiological, morphological and phenological traits, but these traits can be grouped according to Silvertown *et al.* (2015) and Chapin III *et al.* (1993). Silvertown *et al.* (2015) groups these traits into three types of trade-offs:

- root traits related to a trade-off between tolerance of soil oxygen stress and the ability to take up water and nutrients
- morphological/anatomical constraints of hydraulic architecture related to the trade-off between maximizing water flux and minimizing embolisms during periods of water stress
- and physiological traits governing leaf gas exchange related to a trade-off between CO₂ acquisition and H₂O losses.

These three trade-offs are not independent, nor are the traits implicated in each, but most work in this area has concentrated on the second trade-off, especially in a comparative context along field gradients of soil water availability. This is presumably because most studies linking traits to field distributions of soil water have concentrated on woody species having long-lived stems, which must successfully conduct columns of water against steep gradients in water potential without causing embolisms. It is an open question whether this second trade-off is as important for herbaceous species, which are the species studied here. Another hierarchical grouping of traits was proposed by Chapin III *et al.* (1993). The most constrained traits, at the top of the hierarchy, are morphological and anatomical ones. With respect to plant–water relations, these are traits such as those relating to xylem anatomy, root size and form, and aspects of leaf anatomy such as stomatal size/density and venation traits. These are less plastic and have slow

response times in the face of rapid environmental changes because such changes require the growth of new organs or tissues. With reference to Silvertown *et al.*'s (2015) three trade-offs, these traits would primarily relate to traits implicated in hydraulic architecture. Next in Chapin *et al.*'s (1993) hierarchy are physiological traits that are constrained within a particular range of variation by the morphological and anatomical traits. Physiological traits are more plastic and can respond more quickly to a decrease in soil water availability. With reference to Silvertown *et al.*'s (2015) three trade-offs, these traits would primarily relate to traits implicated in leaf gas exchange. Because much more work in comparative functional ecology along gradients of soil water availability has been done on woody species, we chose to concentrate on wild herbaceous dicots. We identified 25 species with contrasting ecology for which their typical habitat affinities could be confidently assigned to one of three categories of soil water availability. We then grew individuals of each species under controlled conditions in both a control and a treatment group by subjecting them to an experimental drought until all above-ground tissues had died. Given the trait groupings described above and the fact that we monitored plant performance (survival) during a single drought event, we choose to concentrate in this study on Chapin *et al.*'s (1993) second hierarchical level (i.e. physiological traits rather than morphological/anatomical traits) and Silvertown *et al.*'s (2015) third trade-off, which corresponds to biophysical constraints governing leaf gas exchange. We did this, not because we believe that morphological/anatomical traits related to hydraulic architecture of stems, roots or leaves are not important, but because we expected (Chapin III *et al.*, 1993) that physiological traits related to drought tolerance and avoidance (Rosenthal *et al.*, 2010; Lelièvre *et al.*, 2011) would be more proximal determinants during a single drought event. Using this approach, we then asked three questions:

- Which physiological traits best predict different levels of drought tolerance or avoidance in our collection of herbaceous dicots?
- To what degree can species' habitat preferences along the gradient of soil moisture availability be predicted by their physiological responses to drought?
- What are the direct and indirect relationships between the physiological traits and how do they interact to determine the species' habitat preferences?

Materials and methods

Study site and experimental design

Study species. We used 25 species of dicots from 18 different families (Table 2.1). All species were herbs, except for *Cistus salviifolius*, a small shrub that does not produce lignified tissues during its first year and so is a functional herb during this period. These species were selected to :

- represent all three hydrological stages along a gradient of affinities for water from dry to wet soils,
- represent every phenological strategy (annual, biannual and perennial)
- and to cover the range of functional traits and adaptive strategies that are described and quantified in Grime *et al.* (2007).

We selected these species from an initial set of over 80 available species obtained from both commercial suppliers and local populations.

Assigning habitat affinities. Ideally, one would know how the relative abundance of each species varies in the field along a quantitative gradient of soil water availability and where along this gradient each species reaches its maximum abundance. However, as described in the Introduction, such detailed information is available for very few species. Instead, we constructed an ordinal ranking of habitat affinity with respect to soil water status: (1) species typical of dry soils (hereafter ‘dry’), (2) species typical of intermediate soils (hereafter ‘intermediate’) and (3) species typical of wet (but not continuously inundated) soils (hereafter ‘wet’). An ordinal variable is a categorical variable for which the possible values are ordered (here, the level of soil wetness) but are unitless and not quantitative. To assign a species to a given ordinal rank, we combined several sources (details about the sources are reported in ANNEXES B Table B.1. When available (13 species), we obtained an average aridity index (i.e. annual precipitation divided by annual evapotranspiration) associated with a species from the TRY database (Kattge *et al.*, 2001). We also obtained, when available (16 species), Ellenberg’s index of soil water status (Ellenberg, 1988).

Table 2.1 : Species list with soil hydrological classification, life cycle, orders and families.

Taxonomic nomenclature follows the International Plant Names Index (2016) <http://www.ipni.org> (accessed 14 November 2016). The soil hydrology classification of the species is based on several sources reported in ANNEXES B Table B.1 along with taxonomic authorities.

Species name	Soil hydrology	Life cycle	Order	Family
<i>Achillea millefolium</i>	Dry	Perennial	Asterales	Asteraceae
<i>Asclepias syriaca</i>	Dry	Perennial	Gentianales	Apocynaceae
<i>Campanula americana</i>	Intermediate	Annual / Biannual	Asterales	Campanulaceae
<i>Centaurea cyanus</i>	Intermediate	Annual / Biannual	Asterales	Asteraceae
<i>Cerastium tomentosum</i>	Dry	Perennial	Asterales	Caryophyllaceae
<i>Chenopodium polyspermum</i>	Wet	Annual	Caryophyllales	Amaranthaceae
<i>Cistus salviifolius</i>	Dry	Perennial	Violales	Cistaceae
<i>Daucus carota</i>	Intermediate	Biannual	Apiales	Apiaceae
<i>Epilobium ciliatum</i> subsp. <i>glandulosum</i>	Wet	Perennial	Myrtales	Onagraceae
<i>Erigeron canadensis</i>	Dry	Annual	Asterales	Asteraceae
<i>Eupatorium perfoliatum</i>	Wet	Perennial	Asterales	Asteraceae
<i>Hypericum perforatum</i>	Wet	Perennial	Malpighiales	Hypericaceae
<i>Jacquemontia gracillima</i>	Intermediate	Perennial	Solanales	Convolvulaceae
<i>Lythrum salicaria</i>	Wet	Perennial	Myrtales	Lythraceae
<i>Medicago lupulina</i>	Dry	Annual / Biannual	Fabales	Fabaceae
<i>Medicago sativa</i>	Intermediate	Perennial	Fabales	Fabaceae
<i>Melilotus albus</i>	Dry	Biannual	Fabales	Fabaceae
<i>Myagrum perfoliatum</i>	Intermediate	Annual	Brassicales	Brassicaceae
<i>Nigella damascena</i>	Intermediate	Annual	Ranunculales	Ranunculaceae
<i>Plantago lanceolata</i>	Dry	Perennial	Lamiales	Plantaginaceae
<i>Rumex acetosella</i>	Dry	Perennial	Caryophyllales	Polygonaceae
<i>Scorzonerooides autumnalis</i>	Dry	Perennial	Asterales	Asteraceae
<i>Silene vulgaris</i>	Dry	Perennial	Asterales	Caryophyllaceae
<i>Stellaria media</i>	Intermediate	Annual	Asterales	Caryophyllaceae
<i>Trifolium pratense</i>	Intermediate	Perennial	Fabales	Fabaceae

Further general habitat descriptions with respect to typical soil water availability were obtained from the United States Department of Agriculture online database (<http://plants.usda.gov/java/>), the eFlora (<http://www.efloras.org/index.aspx>) and TelaBotanica online databases (Julve, 1998) and also from local floras (Marie-Victorin *et al.*, 2002).

Our data contained 11 dry, nine intermediate and five wet species. We chose to exclude the extremes of the hydrological gradient (deserts and aquatic habitats) because the species typical of these habitats can have traits that are not generalizable to species occupying the rest of the gradient.

Experimental design. Plants were grown under controlled conditions. Photosynthetically active photon flux was $160 \pm 20 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ photosynthetically active radiation (PAR) using a 1000-W high-pressure sodium bulb and a 1000-W metal halide bulb for 12 h per day, giving a daily quantum yield of $6.912 \text{ mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$. These values are lower than typically encountered in the field but are standard in experiments conducted in growth chambers and are sufficient to ensure normal growth rates (Shipley, 2006). Daytime temperature was $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, and 15 was decreased to $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ at night. Relative humidity was $45 \pm 5 \%$. The planting substrate was 90 % sand and 10 % peat loam, with an additional 6 g of NPK fertilizer (7–12–12) per kg of soil. We empirically determined the relationships between volumetric water content (VWC, m^3 water per m^3 soil) and relative water content (RWC, g water per g soil) and between RWC and soil water potential (Ψ , MPa) for our planting substrate. Combining these relationships allowed us to estimate soil water potential (the most physiologically relevant measure but requiring new soil samples at each measure) from measures of VWC (ANNEXES BA Fig. BA.1), which are faster and easier to obtain than soil water potential without removing soil. This step is necessary because we took daily measures of VWC. Once this relationship was constructed, we used the `smooth.spline` and `predict.smooth.spline` functions in R (Chambers and Hastie, 1992) to determine the soil water potential values from the soil VWC values at different focus points during soil drying (ANNEXES B, Appendix BA). Volumetric water content was estimated from soil dielectric permittivity measurements (HydroSense II probe, Campbell Scientific, Edmonton, AB, Canada). The probe was placed in the centre of the pot to avoid edge effects. Soil water potential was determined by dew-point psychrometry (WP4C, Decagon Devices,

Pullman, WA, USA). Each species was represented by ten individual plants, planted in separate pots (10 cm x 10 cm x 22 cm deep, 2 L per pot). This pot volume allowed us to measure the whole soil column used by the plant with the HydroSense probe. Individuals of each species were selected to be most similar in terms of age, height and number of leaves at the beginning of the measurements. The position of each pot was fully randomized. All plants were grown in soil that was maintained at field water capacity until they had reached a size sufficient to begin measurements. At this stage, five control plants per species were maintained at field capacity, while the remaining five plants per species formed the treatment group in which watering was stopped. Measurement of soil VWC, for both control and treatment plants, began on the day that watering was stopped and were then taken daily in each pot until the end of the experiment.

Measurements

Trait measurements. All measured traits were related to plant water economy and are summarized in Table 2.2. We focused on gas exchange and related traits at critical events during the drought process rather than on biomass production, since plants were followed until death of above-ground tissues. The temporal changes in stomatal conductance were obtained from daily measurements of stomatal conductance and soil VWC and were calculated from a piecewise regression (see below). Net leaf photosynthesis and traits related to visual changes in leaf behaviour during wilting were measured at critical events during the drought process (see below).

Visual wilting point. We developed an index of leaf wilting with five stages based on Tyree *et al.* (2002). The rating scale was defined in comparison with the control plants of the same species. Stage 0 (control) was defined as a leaf typical of those in the control group growing at soil field capacity. Stage 1 (slightly wilted) was defined as a leaf as in stage 0 except that it is angled slightly towards the ground compared with controls and/or with a slight loss of vein rigidity compared with controls. Stage 2 (wilted) was defined as a leaf with no sign of chlorosis but a change in the leaf angle near 45° towards the ground and/or with leaf blades that have begun to curl inwards parallel to the midrib and/or with very limited necrosis (grey–green to

grey–brown) compared with controls and/or loss of vein rigidity compared with controls. Stage 3 (severely wilted) was defined as a green leaf, with most leaf angles near 90° from horizontal and/or extensive curling of leaves and/or more extensive necrotic zones (grey–green to grey–brown), mostly near leaf margins or leaf tips, and/or complete loss of vein rigidity and turgor, compared with controls. Stage 4 (nearly dead) was defined as most leaves necrotic and/or with more extensive curling and/or leaf angles mostly near 90 from the horizontal compared with controls, but some young leaves still green near the midrib, compared with controls. Each day, we rated all individuals on this scale from 0 to 4. We considered that an individual had changed stage when the majority of its leaves and the leaf used for measurements had changed stage. For each treatment individual, the experiment stopped when it reached stage 4. Measurements on control individuals of each species were continued until the last treatment individual had reached stage 4. We also recorded, for each individual, the numbers of days that were required to reach stage 4.

Stomatal conductance. We made daily measurements of leaf stomatal conductance (g_s , $\text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) with a porometer (SC-1, Decagon Devices, Pullman, WA, USA) on the abaxial side only of the same leaf of each individual until it was shaded by others or had died (in the treatment group). Because of the variability in number and size of stomates and their behaviour between the upper and lower sides of leaves and in order to compare groups of species, we considered that abaxial conductance provided an adequate measurement of transpiration measurable across species. If the leaf was damaged or shaded, we selected another fully expanded leaf under full light from the upper part of the plant and representative of the wilting stage of the individual. We measured abaxial stomatal conductance and soil water content daily in each pot (treatment and control) until the end of the experiment.

Table 2.2 : List and description of the traits used in the analysis.

Trait	Symbol	Unit	Description
Gas exchange traits from piecewise regression			
Maximum stomatal conductance	g_s^{\max}	$\text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Stomatal conductance at field capacity, calculated from the piecewise regression
Stomatal conductance at inflection point	g_s^{inf}	$\text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Stomatal conductance at inflection point, calculated from the piecewise regression
Minimum stomatal conductance	g_s^{\min}	$\text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Stomatal conductance at the end of the experiment (stage 4 (and final) wilting point), calculated from the piecewise regression
Stomatal conductance at stage 2 wilting point	g_s^{wilt}	$\text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Stomatal conductance at the stage 2 wilting point, based on the average volumetric water content at stage 2 wilting point (water volume/soil volume, $100 \times \text{m}^3 \cdot \text{m}^{-3}$), calculated from the piecewise regression
Soil moisture content at inflection point	ψ_{inf}	MPa	Soil water potential at the inflection point, calculated from the equation relating volumetric water content and water potential, based on the volumetric water content (water volume/soil volume, $100 \times \text{m}^3 \cdot \text{m}^{-3}$) calculated from the piecewise regression
Slope before inflection point	-	$\text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1} / \text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Slopes between the point of maximum stomatal conductance and stomatal conductance at inflection point, calculated from the piecewise regression
Slope after inflection point	-	$\text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1} / \text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Slopes between the point of stomatal conductance at inflection point and minimum stomatal conductance, calculated from the piecewise regression
Photosynthetic and wilting traits			
Soil water potential at stage 2 wilting point	ψ_{wilt}	MPa	Soil water potential at stage 2 of visual wilting point, calculated from the equation relating volumetric water content and water potential
Time until death	-	Days	Number of days that are required to reach the stage 4 (and final) wilting point
Maximum net photosynthesis	A_{\max}	$\mu\text{mol}_{\text{CO}_2} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Net photosynthesis at field capacity, the first day of experiment
Net photosynthesis at stage 2 wilting point	A_{wilt}	$\mu\text{mol}_{\text{CO}_2} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Net photosynthesis measured when the individual reach the stage 2 wilting point
Maximum water use efficiency	WUE_{\max}	$\mu\text{mol}_{\text{CO}_2} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1} / \text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Water use efficiency at field capacity, the first day of experiment, based on Maximum net photosynthesis
Water use efficiency at stage 2 wilting point	WUE_{wilt}	$\mu\text{mol}_{\text{CO}_2} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1} / \text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Water use efficiency calculated when the individual reach the stage 2 wilting point, based on Net photosynthesis at stage 2 wilting point

Net photosynthesis. Two measurements of leaf net photosynthesis (A , $\text{mmol}_{\text{CO}_2} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) per individual were taken with a portable CO_2 – H_2O gas analyzer (CI-340, CID Bio-Science, Camas, WA, USA), which was set to an irradiance level of $700 \text{ mmol}_{\text{photon}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (PAR), 25°C , CO_2 concentrations of 380 ± 5 ppm. Each value was obtained as the mean of four sequential measurements of 10 min each per leaf. The leaves used for measurement were the same as those used for conductance measurements. We also calculated intrinsic water use efficiency (WUE, $\text{mmol}_{\text{CO}_2} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1} / \text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), which is the net photosynthetic rate divided by stomatal conductance (Table 2.2). The first measurement was made on the first day that the stress treatment commenced when the soil was still at field capacity, and the second was made when the individual reached the second wilting stage.

Data analysis

Reaction norms of stomatal conductance during drought. For all species, we plotted stomatal conductance of stressed individuals as a function of soil VWC. A general pattern was found in which stomatal conductance decreased linearly with decreasing soil water content until a critical level of soil moisture availability was reached (i.e. a threshold or inflection), after which the rate of decrease in stomatal conductance was more pronounced (Fig. 2.1). Therefore, we used segmented linear regression (ANNEXES A, Appendix AB) (Toms and Lesperance, 2003), which allowed us to calculate seven parameters (Table 2.2): (1) maximum conductance at the point at which soil moisture field capacity was attained (g_s^{max} , $\text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$); (2) soil water potential at the inflection point (Ψ_{inf} , MPa); (iii) stomatal conductance at the inflection point (g_s^{inf} , $\text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$); (4) stomatal conductance at stage 2 of the visual wilting index (g_s^{wilt} , $\text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$); (5) minimum stomatal conductance at final stage 4 of the visual wilting index (g_s^{min} , $\text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$); and the slopes (6) between the point of maximum conductance and inflection point conductance ($\text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1} / \text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and (7) between inflection point conductance and minimum conductance ($\text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1} / \text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). We have included the piecewise regression details and R code in ANNEXES B, Appendix BB.

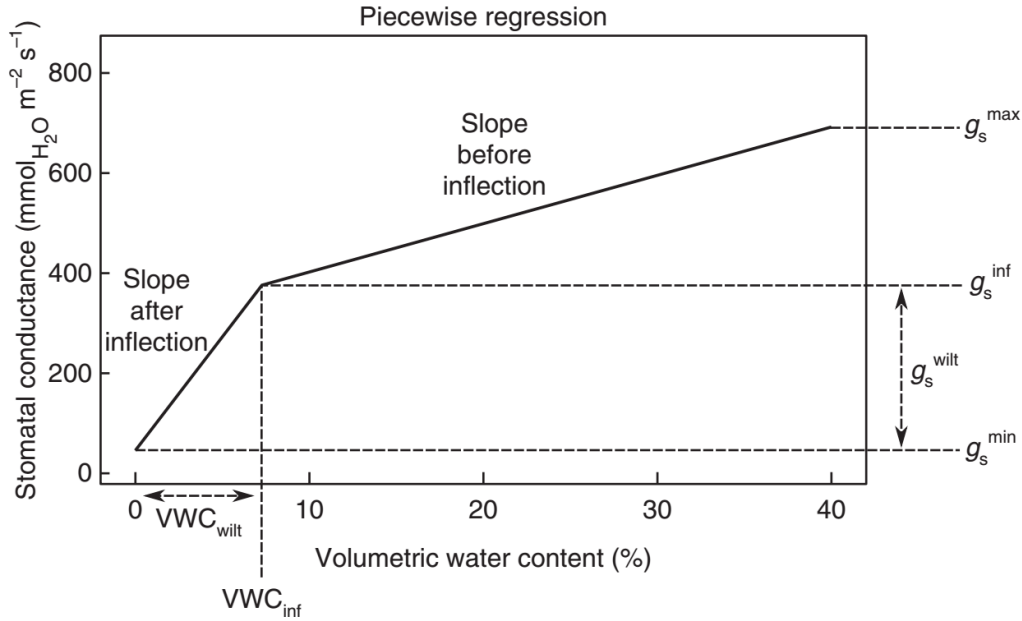


Figure 2.1 : Schematic representation of stomatal conductance behaviour during drought, based on piecewise regressions. g_s^{\max} is maximum conductance at field capacity, g_s^{inf} is stomatal conductance at the inflection point, g_s^{wilt} is stomatal conductance at stage 2 wilting point, g_s^{\min} is minimum stomatal conductance, VWC_{inf} is volumetric water content at the inflection point, and VWC_{wilt} is soil volumetric water content at the stage 2 wilting point. g_s^{wilt} and VWC_{wilt} are, for all species except *Stellaria media*, located at lower values than g_s^{inf} and VWC_{inf} . The lower value of VWC_{wilt} is 0.42 %, the higher is 8.41 %. We have included the piecewise regression details and R code in ANNEXES B, Appendix BB.

Trait selection using a cumulative link model. Since the dependent variable (i.e. a species habitat affinity along the gradient of soil moisture) was in the form of an ordered category with three states (dry, intermediate or wet), while the independent variables were the trait values of each species, the proper statistical model is a cumulative link model (Christensen, 2015), which is an extension of logistic regression but made to analyze ordinal dependent observations (McCullagh, 1980). To obtain the most parsimonious trait combination that can predict the habitat affinities, we used a backward stepwise selection procedure starting with the saturated model (i.e. all traits included). At each step, we removed the trait having the highest non-

significant P value and then recalculated the model until all traits were statistically significant (i.e. null P values were <0.05). We extracted predicted values from the model for each species. These values were then used to calculate the probability of each species being in one of the three groups. We use McFadden's R^2 (McFadden, 1974), based on the ratio of the log likelihood of the model to the log likelihood of a model without the traits (i.e. an intercept-only model) to assess the predictive ability of the resulting model. This R^2 is interpreted in the same way as a classic model R^2 and reduces to the classic R^2 (i.e. proportion of the variance explained by the model) in the case of a linear model with a normally distributed dependent variable.

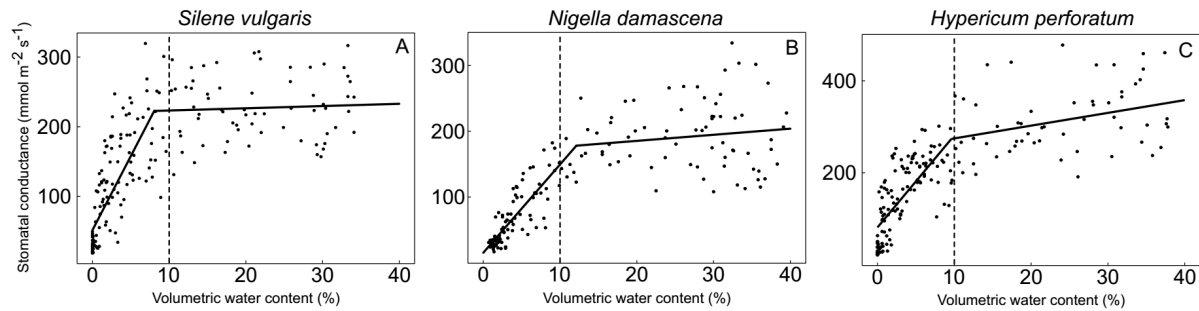


Figure. 2.2 : Dynamic responses of stomatal conductance ($\text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) versus soil volumetric water content (m^3 expressed as %). The scatterplots show all observations for all individuals belonging to the species (A) *Silene vulgaris*, (B) *Nigella damascena* and (C) *Hypericum perforatum*, which were classified as typical of dry, intermediate and wet habitats, respectively. Species scores estimated from cumulative link model analysis (see the cumulative link model analysis section for calculation of scores) are -11.97 for *S. vulgaris*, -4.55 for *N. damascena* and -0.90 for *H. perforatum*. Solid lines are piecewise regressions that have been fitted through these points. Dotted lines, fixed at 10 % of volumetric water content, are added to help read the inflection value. Univariate differences in traits between species of different habitat types.

Path analysis. The cumulative link model is best suited to testing the predictive ability of the measured traits but cannot test hypotheses concerning direct and indirect effects between the variables. We therefore used path analysis (Shipley, 2015) to develop and test hypotheses

concerning the causal relationships between the traits and the field distributions. Our initial hypothesized causal structure, shown in ANNEXES B Fig. B.2, reflects a combination of a priori definitional and ecological links and was subsequently modified to obtain a final model that successfully accounted for the patterns of conditional dependencies in the data. The modifications were made to improve the fit between the data and the model conditional on such modifications not contradicting known biology. We used the *sem* function in the lavaan package of R (Rosseel, 2012). We present the path coefficients based on standardized values with units of standard deviations of the mean in order to compare the relative importance of each variable. We used the maximum likelihood estimator (MLM) with standard errors and a means-adjusted (or Satorra–Bentler) χ^2 test (Satorra and Bentler, 2000) statistic, both of which are robust to non-normality. We conducted all statistical analyses within the R statistical environment (version 3.1.2, R Core Development Team, 2015-12-04). Unless otherwise indicated, tests of differences between groups were done using Wilcoxon Mann–Whitney (WMW) tests because of non-normality.

Results

All species had the same general pattern between stomatal conductance and soil water, although the specific parameter values of this general pattern differed between species. Fig. 2.2 provides an example of the piecewise regression for one representative species within each group: *Silene vulgaris* for the dry group, *Nigella damascena* for the intermediate group and *Hypericum perforatum* for the wet group. The figure presents soil water availability expressed as VWC since this is the variable that was directly measured on a daily basis. However, since different soils have different relationships between VWC and the amount of soil water that is available to the plant, soil water potential is a more useful measure of soil water availability when comparing between studies and soils. We therefore used our empirical relationships, described in the Materials and methods section, to convert to soil water potential for subsequent statistical analysis [cumulative link model (CLM) and path analysis].

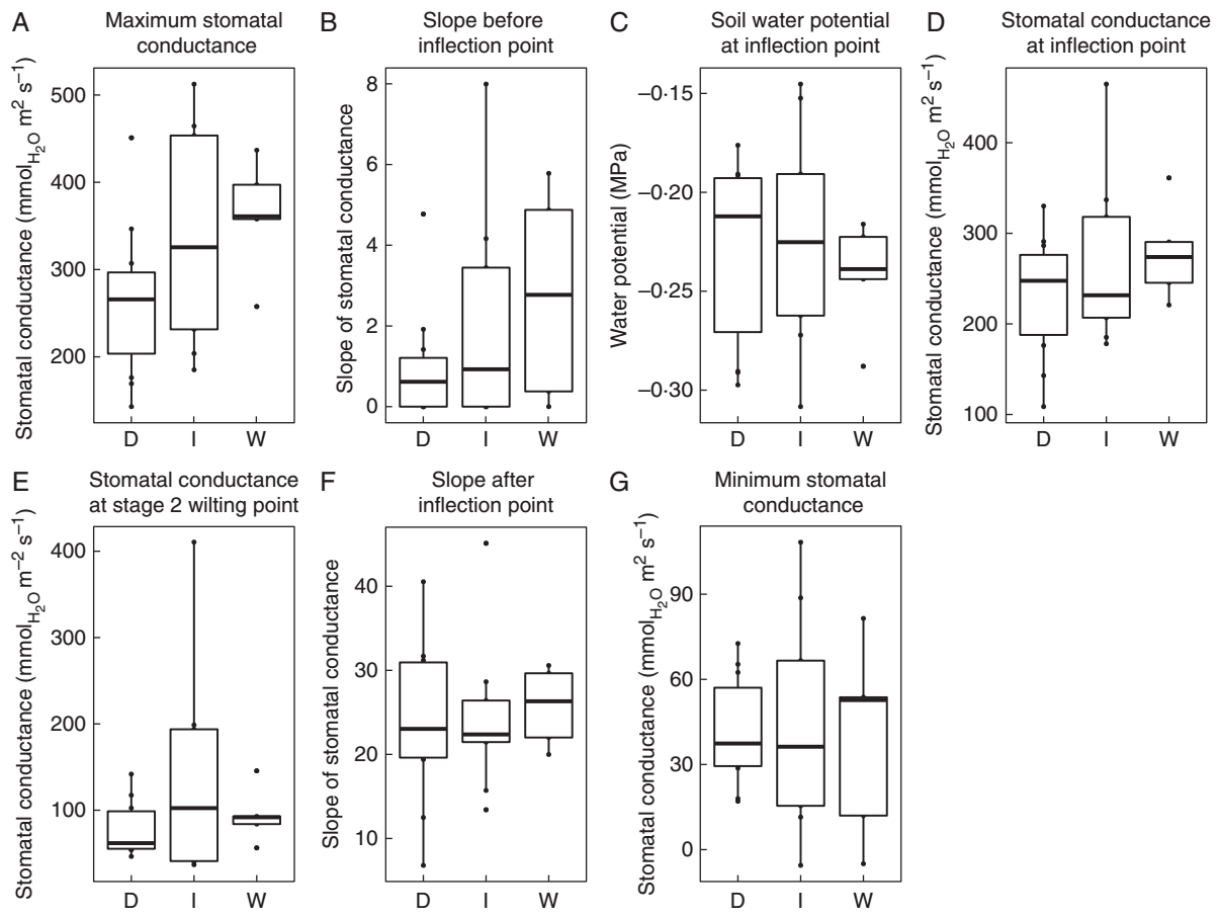


Figure 2.3 : Dynamic responses of stomatal conductance ($\text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) according to habitat wetness. Box plots summarize the parameters of the piecewise regressions that were fitted separately to each species and classified according to habitat wetness. Note that soil moisture availability at the inflection point is expressed as a soil matrix potential, rather than as soil water content. D, dry species; I, intermediate species; W, wet species. Non-parametric (Kruskal–Wallis) one-way ANOVAs did not detect any significant differences between the three species groups for any of the seven parameters.

Univariate differences in traits between species of different habitat types.

When considering each variable separately, very few significant differences were detected between the three groups of species based on their habitat preferences. Fig. 2.3 presents boxplots of the seven parameters that describe the response of stomatal conductance during the drought. Non-parametric (Kruskal–Wallis) one-way ANOVAs did not detect any significant differences between the three species groups for any of these seven parameters. Fig. 2.4 presents boxplots related to net photosynthetic rate and WUE, each measured at soil field capacity and when the leaves first showed pronounced wilting (stage 2). Although there was a marginally significant difference between groups in maximum net photosynthetic rate ($P=0.046$), this difference was not associated with an increasing gradient of habitat wetness. Fig. 2.5 summarizes the differences between species groups with respect to soil water availability at wilting and time until death. Volumetric water content at wilting differed marginally between groups ($P=0.055$), with species typical of dry habitats wilting at lower VWCs. The pattern was clearer when considering soil water potential at wilting ($P=0.049$), in which the median dry species began wilting at 10 MPa, while the other two groups began wilting at higher soil water availability (less than 5 MPa). There was also a marginally significant ($P=0.05$) difference between species groups with respect to time until death, but this difference did not follow the gradient of habitat wetness.

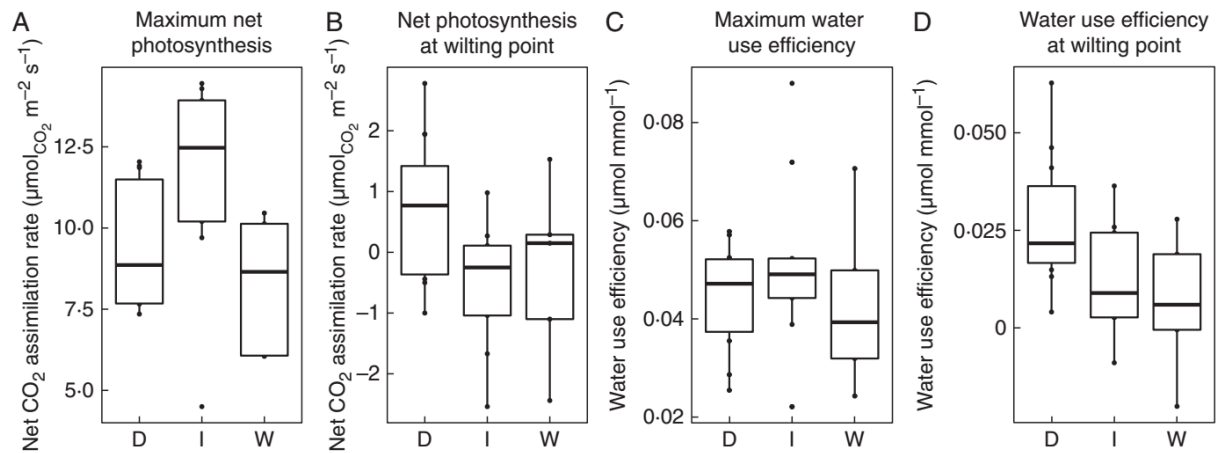


Figure 2.4 : Responses of net CO_2 assimilation rate ($\text{mmol}_{\text{CO}_2} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) and water use efficiency ($\text{mmol}_{\text{CO}_2} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}/\text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) according to habitat wetness. Box plots summarize the parameters of net CO_2 assimilation rate and water use efficiency at the beginning of the experiment and at stage 2 wilting point that were fitted separately to each species and classified according to habitat wetness. Note that negative values of photosynthesis and water use efficiency means that respiration of leaves is higher than transpiration. D, dry species; I, intermediate species; W, wet species. Although there was a marginally significance difference between groups in maximum net photosynthetic rate ($P= 0046$), this difference was not associated with an increasing gradient of habitat wetness.

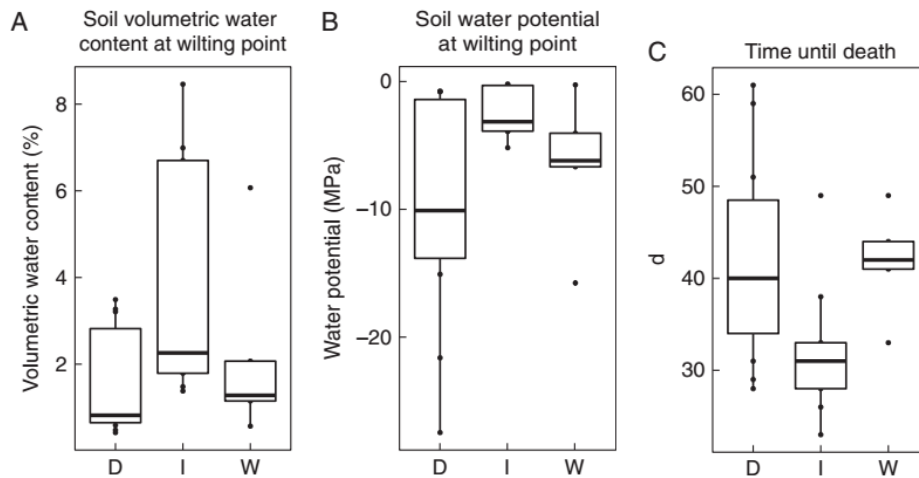


Figure 2.5 : Responses of stage 2 leaf wilting points according to habitat wetness. Box plots summarize the parameters of wilting stages that were fitted separately to each species and classified according to habitat wetness. Note that soil water availability at the stage 2 wilting point is expressed as both soil volumetric water content and soil matrix potential. Time until death from drought is the number of days to reach the last wilting stage. D, dry species; I, intermediate species; W, wet species. Volumetric water content at wilting differed marginally between groups ($P=0.055$). The pattern was clearer when considering soil water potential at wilting ($P=0.049$). There was also a marginally significant ($P=0.05$) difference between species groups with respect to the time until death but this difference did not follow the gradient of habitat wetness.

Predicting habitat affinities from combinations of traits.

Table 2.3 summarizes the results of the backward stepwise cumulative link regression, which resulted in five significant variables that, together, predict the habitat type of each species (dry, intermediate and wet species). Together, this suite of traits (WUE_{wilt} , g_s^{max} , Ψ_{wilt} , A_{max} , g_s^{min}) provided reasonably good predictions of habitat affinities (McFadden's $R^2 = 0.48$). From this table, we can define a continuous latent score [eqn (1)] and obtain the predicted probability that a species with particular values of these traits would be found typically in dry, intermediate or wet habitats [eqn (2a, b, c)]. The score represents the predicted position of the species along a latent continuous gradient of increasing soil wetness (Fig. 2.6) with the b values being fitted constants associated with each trait. A species was predicted to belong to the habitat type having the highest probability (dashed lines in Fig. 2.6). The open circles show species belonging to an incorrect group according to the model. ANNEXES B, Tables B.2 and B.3 give these trait values for each species, along with their score values. Equation (1) gives the predicted score of each species based on the five traits (WUE_{wilt} , g_s^{max} , Ψ_{wilt} , A_{max} , g_s^{min}), with the b values given in Table 2.3. The subsequent probabilities, that a species will be classified as being found in a dry, intermediate or wet habitat, are given in eqn (2a–c), where T_d is the threshold value between dry and intermediate habitats and T_w is the threshold value between intermediate and wet habitats. The T_d and T_w threshold values are estimated by the model.

Table 2.3 : Cumulative link model analysis explaining groups of habitat wetness. We used a backward stepwise cumulative link regression, which resulted in five variables that together predict the habitat type of each species (dry, intermediate and wet species). These five traits provided reasonably good predictions of habitat affinities (McFadden's $R^2 = 0.48$). From this table, we can define a continuous latent score for each species [eqn (1)]. The score represents the predicted position of the species along latent continuous gradient of increasing soil wetness, with β representing fitted constants associated with each trait. T_d and T_w are threshold values of latent score between the groups dry and intermediate and between intermediate and wet estimated by the model and used to calculate the probability of each species being in one group or another [eqn (2a-c)].

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
Water use efficiency at wilting point (β_1)	-155.366	55.110	-2.819	0.004
Maximum conductance (β_2)	0.023	0.008	2.696	0.007
Soil water potential at wilting point (β_3)	0.505	0.219	2.304	0.021
Conductance at wilting point (β_4)	-0.018	0.009	-2.039	0.041
Maximum net photosynthesis (β_5)	-0.449	0.241	-1.862	0.062
Threshold dry intermediate (T_d)	-5.247	3.087	-1.700	
Threshold intermediate wet (T_w)	-1.603	2.707	-0.592	

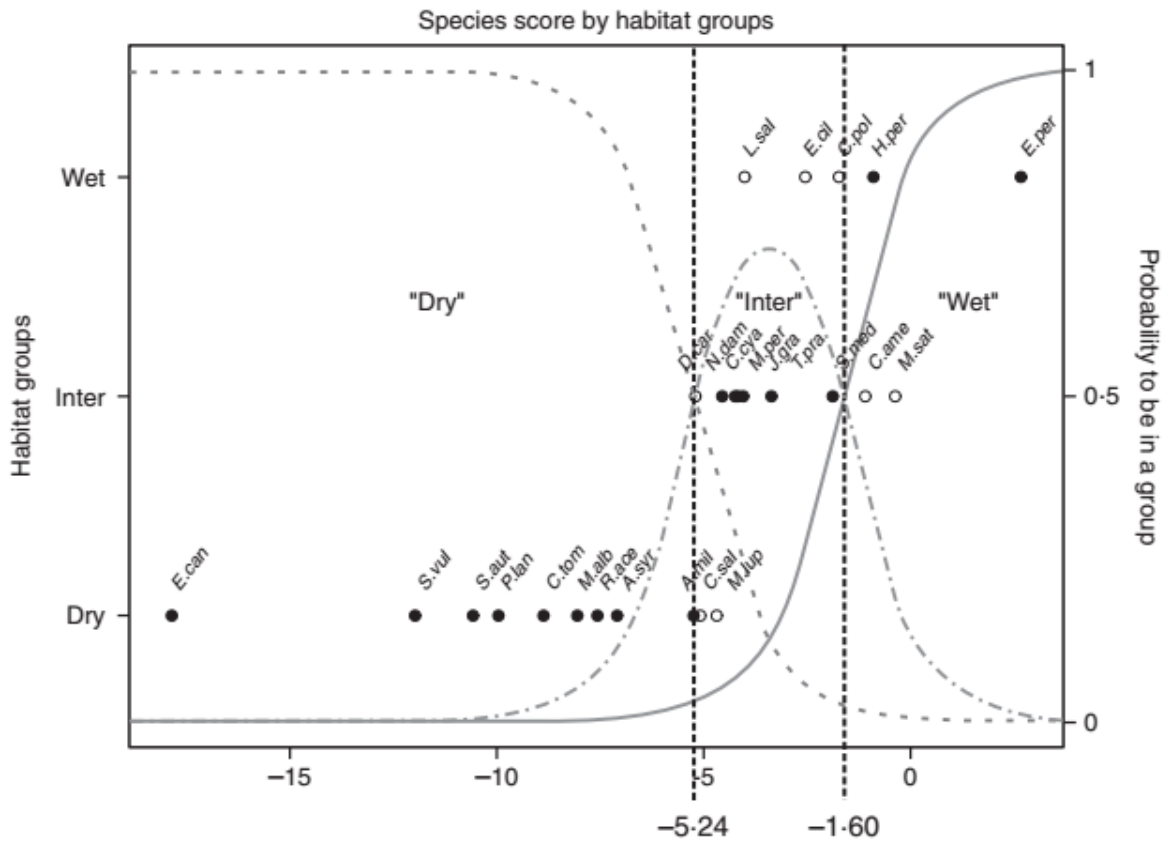


Figure 2.6 : Species scores and the predicted probability of being classified in each habitat group (dry, intermediate, wet). The left y axis shows the a priori classification of the species. The x axis shows the score of a species obtained from the cumulative link model analysis. The right y axis and the different grey lines (solid, dotted and dashed) are the probabilities of a species being in a group according to its score and trait values. Vertical dashed lines are the thresholds between successive groups. Black circles show the species predicted in the correct group. Open circles show the species belonging to an incorrect group according to the model. For instance, *Medicago lupulina* (*M.lup*) is classified a priori as dry (left y axis). However, based on its traits, the *M.lup* score falls in the predicted intermediate group (x axis), leading to a higher probability of being in the intermediate group than in the dry group (right y axis).

$$score = (\beta_1 \cdot WUE_{wilt}) + (\beta_2 \cdot g_s^{max}) + (\beta_3 \cdot \Psi_{wilt}) + (\beta_4 \cdot A_{max}) + (\beta_5 \cdot g_s^{wilt}) \quad (1)$$

$$p(\text{dry}) = \frac{e^{-T_d - score}}{1 + e^{-T_d - score}}$$

$$p(\text{medium}) = 1 - p(\text{dry}) - p(\text{wet})$$

$$p(\text{wet}) = 1 - \frac{e^{-T_w - score}}{1 + e^{-T_w - score}}$$

(2a,b,c)

Considering the score calculation, the probability that a species typically occurs in a dry habitat increase as its maximum conductance (at field capacity) decreases, its WUE at the stage 2 wilting point increases, soil water potential at stage 2 wilting point decreases, its maximum net photosynthesis in well-watered soil increases, and its stomatal conductance at stage 2 wilting increases. The path model shown in Fig. 2.7 successfully accounts for the actual pattern of covariation between traits while providing more information on indirect linkages between them. There is no significant misfit between the empirical data and the causal structure specified by the model (Satorra–Bentler robust $\chi^2=13.828$, 17 d.f., $P= 0.679$). We have maintained three marginally nonsignificant paths because these have clear biological justifications and because, given only 25 species, this model has low statistical power. The path model accounts for 58.6 % of the variation in the ordered habitat wetness variable.

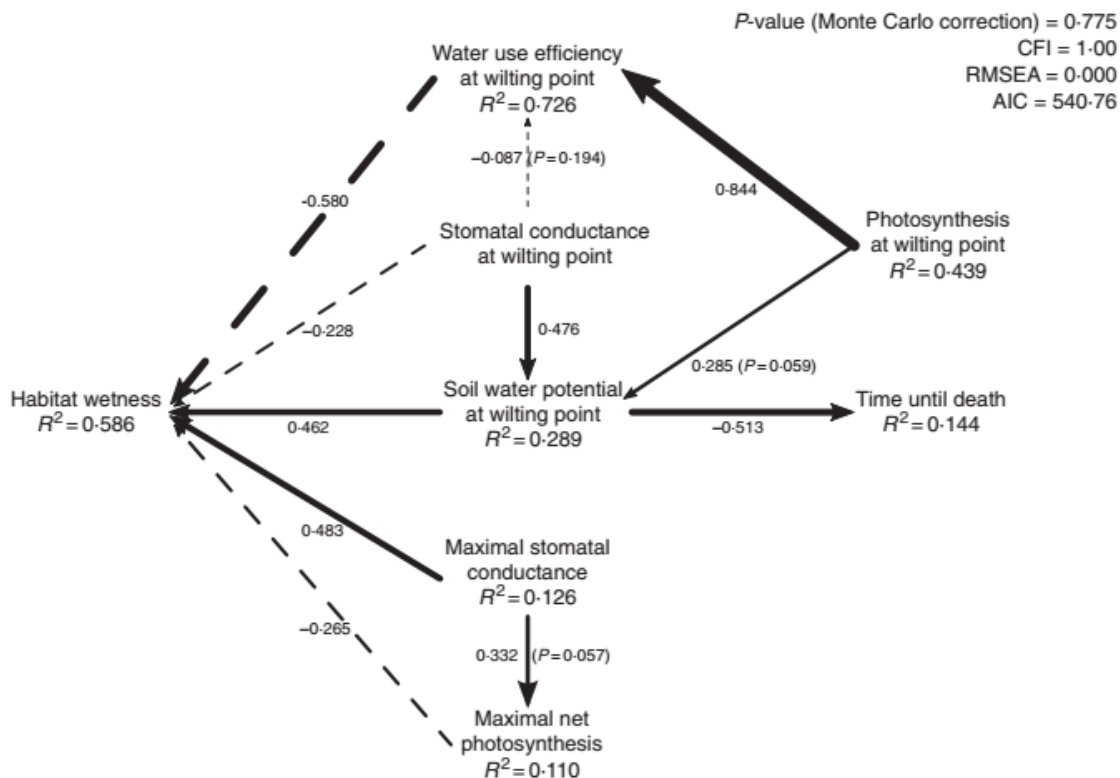


Figure 2.7 : Path analysis of selected traits. All path coefficients differ significantly from zero, except for maximum stomatal conductance and photosynthesis at wilting, which are marginal ($P = 0.057$ and 0.059) and conductance at wilting, which is non-significant ($P = 0.194$). There is no significant misfit between the empirical data and the causal structure specified by the model (Satorra–Bentler robust $\chi^2 = -13.828$, 17 d.f., $P = 0.679$, with Monte Carlo correction $P = 0.774$); comparative fit index (CFI)= 1.00, root mean square error of approximation (RMSEA)= 0.00, Akaike information criterion (AIC)= 540.76). The R^2 values are the percentage of variation explained by the causal variables. Values on the lines are the path coefficients between the causal variable and the caused variable. Solid lines are positive causal relationships and dashed lines are negative ones. Line thickness is proportional to the strength of path coefficients.

Discussion

Dynamic response of gas exchange to drying soils

There were few variables, considered separately, that could differentiate between species typical of dry, intermediate or wet soils. In fact, since we conducted 14 separate univariate tests and found only three variables that were even marginally significant at the 5 % level, it is not clear whether any single variable can discriminate between these three groups of species. However, when we considered combinations of variables we were able to discriminate between these three groups fairly well. Adaptations to soil water availability presumably involve syndromes of traits acting together. We interpret our results as representing, with certain exceptions, an acquisition/conservation trade-off continuum with respect to soil water. Consider first a species whose gas exchange physiology is adapted to maximizing the acquisition of resources when these are plentiful more than conserving them when they are limiting. With respect to soil water, such a species would have high stomatal conductance for water when it is in plentiful supply (i.e. a soil at field capacity) since this allows a high photosynthetic rate when water is not limiting, even though it has a relatively low WUE under such conditions. Such a species would be very sensitive to any limitation in soil water and so its stomatal conductance and photosynthetic rate would decrease sharply as the soil dries. Because it has low efficiency for water use, its leaf should begin wilting at a relatively high value of soil water availability, with a rather high stomatal conductance at wilting. Plant physiologists refer to this suite of traits as anisohydric behaviour (Lambers *et al.*, 2008; McDowell *et al.*, 2008). Sade *et al.* (2012) state that this behaviour is a risky strategy, especially under dry conditions, as dehydration might endanger the plant. Such a species should be rather restricted to wet soils. This suite of traits mostly agrees with those possessed by the species classified as typically occurring in the wet environment.

At the other extreme, a species whose gas exchange physiology is adapted to conserving acquired water rather than maximizing its acquisition would display the opposite suite of physiological traits: low stomatal conductance to water, low photosynthetic rate and relatively high WUE even when growing in a soil at field capacity. However, such a species would be less

sensitive as the soil dries and so would decrease its stomatal conductance and photosynthetic rate much less and maintain higher efficiency for water use. Finally, the leaves of such a species would only begin wilting at a relatively low value of soil water and with a rather small stomatal conductance at wilting. Plant physiologists refer to this suite of traits as isohydric behaviour (Tardieu and Simonneau, 1998; Lambers *et al.*, 2008). Such a species should be restricted to dry soils, not because its leaf physiology is poorly adapted to a wet soil per se, but rather because it is competitively excluded from wetter soils. This suite of traits mostly corresponds to those possessed by our species classified as typical of dry soils. This corresponds to ‘shared’ physiological niches but "distinct" ecological niches (Ellenberg, 1988; Keddy, 2001). This also mirrors Grime’s (2002) continuum between stress tolerators and competitors. If we had extended our gradient to soils that are inundated for longer periods of time, then species typical of such environments would have to deal with indirect effects of soil water, like low oxygen levels, and this would require a separate suite of traits.

As stated, there are some exceptions to the above interpretation. For instance, we expected wet and dry species to show large differences in photosynthetic capacity but our wet species did not have a significantly higher photosynthetic rate than our dry species (Fig. 2.4A). This is also reflected in the levels of WUE of our wet and dry species (Fig. 2.4C). Similarly, we expected wet species to die more rapidly than dry species, but they survived about the same number of days (Fig. 2.5C), although the time until death in the artificial conditions of this experiment was likely to have been determined more by plant size relative to the soil volume in the pot.

Our intermediate species were also intermediate between the two strategies (wet versus dry) and showed a higher variability of response for almost all traits. We can suggest two possible explanations for this greater variability. First, intermediate species could include more generalists, i.e. species capable of maintaining viable populations in a wider range of environmental gradients, and not only related to water availability. A second, and not mutually exclusive, possibility is that our intermediate species included species that were improperly classified. In creating our classification of typical field distributions using both published literature and expert knowledge, we found a number of contradictory descriptions of such field preferences for soil water status. Most of these involved the wet and intermediate species.

Linking traits to habitat affinities.

The CLM identified five traits (Table 2.3) that together predict species distributions along a soil water availability gradient and accounted for 48 % of the model deviance. Even though the CLM misclassified eight species with respect to the ordinal groups (open circles in Fig. 2.6), these misclassified species were placed in the adjacent group and their latent scores placed most of them on the boundary between the correct group and the adjacent group. This shows that, in most cases, the model could predict the habitat affinities of the species based on their traits. However, the CLM does not allow us to determine the direct and indirect links between the traits. For this reason, we constructed and tested a path model (Fig. 2.7) that included the five same traits as found in the CLM plus two additional ones that were excluded from the CLM but which seem biologically important.

First, we included net photosynthetic rate at stage 2 wilting (A_{wilt}). We did this in order to understand why when the plant was under clear water stress (i.e. stage 2 wilting) WUE_{wilt} but not A_{wilt} was included in the CLM, but when the plant had maximal water availability A_{max} but not WUE_{max} was included in the CLM. This seems paradoxical since, by definition WUE is the ratio of A and g_s . Under well-watered conditions, the two direct causes of habitat affinities in the path model are A_{max} and g_s^{max} . A high A_{max} in a well-watered soil (rapid resource capture) requires a high g_s^{max} , presumably because both require greater stomatal opening, in order to allow gas exchange. However, it is a high g_s^{max} that is primarily driving the association with wet habitats in the path model since the direct path coefficient from A_{max} to habitat wetness (i.e. the effect of higher A_{max} on preference for a wet habitat when comparing species having the same value of g_s^{max}) is negative. Although WUE_{max} is not explicitly included in Fig. 2.7, it is jointly determined (by definition) by A_{max} and g_s^{max} . Since the two direct causes of WUE_{max} (i.e. A_{max} and g_s^{max}) are also direct determinants of habitat wetness, WUE_{max} is only spuriously correlated to habitat wetness, and this is why it was dropped in the CLM. When water is not limiting it is the ability to maximize resource capture, not minimize WUE, that is the selective force, and so those species with the highest A_{max} and g_s^{max} are associated with wet habitats. However, when the plant is clearly water-stressed, the path model shows that it is WUE_{wilt} and g_s^{wilt} , not A_{wilt} , that are directly driving the habitat affinities of the species. A_{wilt} is only an indirect cause of

habitat affinities in the path model; species under water stress that can maintain a positive A_{wilt} allow, in conjunction with a lower g_s^{wilt} , a larger WUE_{wilt} , and such species are now associated with dry habitats. When water is severely limiting, it is the ability to minimize water loss while maintaining a positive carbon balance that is the selective force, and so those species with highest WUE_{wilt} and not A_{wilt} are associated with dry habitats.

Second, we included in the path model a variable indicating the time from the termination of watering until the species died (time until death), since this is an obvious indicator of drought survival. We did this because it seemed paradoxical that species that survived longer before dying were not significantly correlated with a preference for dryer soils (Fig. 2.5). Again, the path model proposes an explanation. There are three different paths linking habitat wetness and survival time during drought. The most obvious path (habitat wetness \leftarrow soil water potential at wilting \rightarrow survival time) induces the expected negative effect ($0.462 \times -0.515 = -0.237$) and shows that, when all other variables are held constant, species that begin wilting in wetter soils are both typically found in wetter habitats and also die more quickly after a drought begins. However, there are two other countervailing paths that reduce this negative effect [habitat wetness $\leftarrow g_s^{\text{wilt}} \rightarrow \Psi_{\text{wilt}} \rightarrow$ survival time ($-0.228 \times 0.476 \times -0.513 = -0.404$) and habitat wetness $\leftarrow \text{WUE}_{\text{wilt}} \leftarrow A_{\text{wilt}} \rightarrow \Psi_{\text{wilt}} \rightarrow$ survival time ($-0.580 \times 0.844 \times 0.285 \times 0.513 = -0.030$)] that together reduce the total correlation between habitat wetness and survival time from -0.237 to only -0.109 . Given the limited statistical power in our experiment, this low overall correlation would not be significant.

Together, the CLM and the path model reveal a trade-off between rapid resource capture (acquisition) and traits that allow survival during drought (conservation). This trade-off then determines the habitat affinity of the species. The lower the values of the traits associated with resources capture when water is plentiful, the greater the probability that a species having these traits will be typical of dry soils. However, the higher the WUE and the lower the amount of soil water available before the plant finally begins to clearly wilt (stage 2 wilting), driven jointly by g_s^{wilt} and A_{wilt} , the higher the probability that a species having these trait values will be typical of dry soils. The higher WUE at this stage is a consequence of having a higher (positive) net photosynthetic rate and having a lower stomatal conductance when the leaf reaches stage 2 wilting. Although not measured, this conservative trait profile is presumably related to other

conservative strategies, such as osmoprotection of leaves (Shepherd and Griffiths, 2006), or to preferential root growth. It is important to remember that the path model has low statistical power (only 25 species) and was developed in an exploratory manner and so must be verified with independent data. Regarding physiological traits, Sterck *et al.* (2014) showed that the water compensation point (i.e. the soil water availability level at which a plant can no longer maintain a positive carbon balance), which is a proxy for drought tolerance, was the best predictor of the species distributions of 22 species of trees along water and light resource gradients within and across tropical forests. This result on trees is consistent with our finding on herbaceous dicots and previous studies on agronomically important plants like maize and sunflower that show the same reaction patterns (Tardieu and Simonneau, 1998; Vile *et al.*, 2012). Given the hierarchical relationship between physiological and morphological traits (Chapin III *et al.*, 1993; Silvertown *et al.*, 2015), our study of the physiological response to drought stress in these herbaceous dicots is only the first step towards the goal of trait-based community ecology of predicting community composition from traits (Shipley *et al.*, 2016). Our chosen traits, while providing direct links to plant performance during drought, require experimental manipulation of soil water availability in order to measure them, and so are not appropriate for large-scale trait screening. The next step will be to link these physiological traits to more accessible morphological and anatomical functional traits that can be measured in the field before water stress occurs.

References

- Araya YN, Silvertown J, Gowing DJ, McConway KJ, Peter Linder H, Midgley G. 2011.** A fundamental, eco-hydrological basis for niche segregation in plant communities. *New Phytologist* **189**: 253–258.
- Baastrup-Spohr L, Sand-Jensen K, Nicolajsen SV, Bruun HH. 2015.** From soaking wet to bone dry: predicting plant community composition along a steep hydrological gradient. *Journal of Vegetation Science* **26**: 619–630.
- Chapin III FS, Autumn K, Pugnaire FI. 1993.** Evolution of Suites of Traits in Response to Environmental Stress. *The American Naturalist* **142**: S78–S92.
- Chambers JM, Hastie TJ 1992.** *Statistical Models in S*. Wadsworth & Brooks/Cole Advanced Books & Software, Pacific Grove, California.
- Christensen RHB. 2015.** Ordinal : Regression Models for Ordinal Data. *R Package version 2015-06-28*.
- Ellenberg H. 1988.** Vegetation Ecology of Central Europe Fourth Edition In: *Ellenberg, H. Vegetation Ecology of Central Europe, Fourth Edition..* Cambridge University Press: New Rochelle, New York, USA; Cambridge, England, UK.
- Grime JP. 2002.** *Plant Strategies, Vegetation Processes, and Ecosystem Properties*. Wiley: Chichester.
- Grime JP, Hodgson JG, Hunt R. 2007.** *Comparative plant ecology: a functional approach to common British species. 2nd edition*. Castlepoint Press, Brough, UK.
- Julve P. 1998.** *Baseveg. Répertoire synonymique des groupements végétaux de France*. May 2014. <http://philippe.julve.pagesperso-orange.fr/catminat.htm> (last accessed 18 January 2016)
- Kattge J, Díaz S, Lavorel S, et al. 2011.** TRY - a global database of plant traits. *Global Change Biology* **17**: 2905–2935.
- Keddy PA. 1992.** A pragmatic approach to functional ecology. *Functional Ecology* **6**: 621–626.
- Keddy PA. 2001.** *Competition in Plant Communities*. www.drpaulkeddy.com, 18 January 2016. Adapted from: Oxford Bibliographies Online: Ecology. Ed. David Gibson. New York: Oxford University Press.

- Lambers H. 2008.** *Plant Physiological Ecology* (Springer, Ed.). New York: Springer New York.
- Lelièvre F, Seddaiu G, Ledda L, Porqueddu C, Volaire F. 2011.** Water use efficiency and drought survival in Mediterranean perennial forage grasses. *Field Crops Research* **121**: 333–342.
- Marie-Victorin F, Rouleau E, Brouillet L. 2002.** *Flore laurentienne 3ème édition* (G Morin, Ed.). Boucherville, Québec.
- McCullagh P. 1980.** Regression Models for Ordinal Data. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* **42**: 109–142.
- McDowell N, Pockman WT, Allen CD, et al. 2008.** Mechanisms of plant survival and mortality during drought: Why do some plants survive while others succumb to drought? *New Phytologist* **178**: 719–739.
- McFadden D. 1974.** Condition logit analysis of qualitative choice behavior In: *Frontiers in Econometrics*.105–142.
- R Core team. 2015.** R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing , Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>. **55**: 275–286.
- Rosenthal DM, Stiller V, Sperry JS, Donovan LA. 2010.** Contrasting drought tolerance strategies in two desert annuals of hybrid origin. *Journal of Experimental Botany* **61**: 2769–2778.
- Rosseel Y. 2012.** lavaan: an R package for structural equation modeling. *Journal of Statistical Software* **48**: 1–36.
- Sade N, Gebremedhin A, Moshelion M. 2012.** Risk-taking plants. *Plant Signaling & Behavior* **7**: 767–770.
- Satorra A, Bentler P. 2000.** A scaled difference chi-square test statistic for moment structure analysis. *Psychometrika* **66**: 507–514.
- Shepherd T, Griffiths DW. 2006.** The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytologist* **171**: 469–499.

- Shipley B. 2006.** Net assimilation rate, specific leaf area and leaf mass ratio: Which is most closely correlated with relative growth rate? A meta-analysis. *Functional Ecology* **20**: 565–574.
- Shipley B. 2010.** *From Plant Traits to Vegetation Structure Plant*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Shipley B. 2015.** *Cause and Correlation in Biology: A User's Guide to Path Analysis, Structural Equations and Causal Inference*. Cambridge University press, Cambridge, UK.
- Shipley B, De Bello F, Cornelissen JHC, Lalibert?? E, Laughlin DC, Reich PB. 2016.** Reinforcing loose foundation stones in trait-based plant ecology. *Oecologia* **180**: 923–931.
- Shipley B, Laughlin DC, Sonnier G, Otfinowski R. 2011.** A strong test of a maximum entropy model of trait-based community assembly. *Ecology*.
- Shipley B, Vile D, Garnier E. 2006.** From Plant Traits to Plant Communities: A Statistical Mechanistic Approach to Biodiversity. *Science* **314**: 812–814.
- Silvertown J, Araya Y, Gowing D. 2015.** Hydrological niches in terrestrial plant communities: A review. *Journal of Ecology* **103**: 93–108.
- Silvertown J, Dodd ME, Gowing DJG, Mountford JO. 1999.** Hydrologically defined niches reveal a basis for species richness in plant communities. *Nature* **400**: 61–63.
- Sonnier G, Shipley B, Navas ML. 2010.** Quantifying relationships between traits and explicitly measured gradients of stress and disturbance in early successional plant communities. *Journal of Vegetation Science* **21**: 1014–1024.
- Sterck F, Markesteijn L, Toledo M, Schieving F, Poorter L. 2014.** Sapling performance along resource gradients drives tree species distributions within and across tropical forests. *Ecology* **95**: 2514–2525.
- Tardieu F, Simonneau T. 1998.** Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. *Journal of Experimental Botany* **49**: 419–432.
- Toms JD, Lesperance ML. 2003.** Piecewise regression: A tool for identifying ecological thresholds. *Ecology* **84**: 2034–2041.

- Tyree MT, Vargas G, Engelbrecht BMJ, Kursar TA. 2002.** Drought until death do us part: A case study of the desiccation-tolerance of a tropical moist forest seedling-tree, *Licania platypus* (Hemsl.) Fritsch. *Journal of Experimental Botany* **53**: 2239–2247.
- Vile D, Pervent M, Belluau M, et al. 2012.** Arabidopsis growth under prolonged high temperature and water deficit: Independent or interactive effects? *Plant, Cell and Environment* **35**: 702–718.
- Violle C, Navas M-L, Vile D, et al. 2007.** Let the Concept of Trait Be Functional! *Oikos* **116**: 882–892.

Chapitre 3

-

LINKING HARD AND SOFT TRAITS: PHYSIOLOGY, MORPHOLOGY AND ANATOMY INTERACT TO DETERMINE HABITAT AFFINITIES TO SOIL WATER AVAILABILITY IN HERBACEOUS DICOTS.

Description de l'article et contribution

Les préférences d'habitat des espèces le long de gradients environnementaux devraient être déterminées par une combinaison de traits physiologiques (« hard ») et morpho-anatomiques (« soft »). Suivant les résultats du chapitre précédent, le but de cet article est d'explorer les relations entre traits physiologiques et morpho-anatomiques et de construire un modèle causal permettant de prédire les préférences d'habitat des espèces. En utilisant des espèces distribuées sur un gradient de disponibilité d'eau dans le sol, nous abordons trois questions:

- Dans quelle mesure pouvons-nous prédire les affinités d'habitat des espèces à partir de leurs traits « hard », « soft » ou d'une combinaison des deux?
- Dans quelle mesure pouvons-nous prédire les réponses physiologiques des espèces à la sécheresse (traits « hard ») à l'aide de leurs traits « soft »?
- Peut-on modéliser une séquence de liens causaux, tels que, traits « soft » → traits « hard » → distribution des espèces ?

Nos résultats suggèrent que les traits physiologiques de tolérance à la sécheresse sont prédits par les traits morpho-anatomiques en conditions optimales. Nous avons montré que les traits morpho-anatomiques seuls ne sont pas de bons prédicteurs de l'hydrologie des espèces et que la séquence traits « soft » → traits « hard » → distribution des espèces donne les meilleures prédictions. Cet article est la deuxième étape de la construction d'un modèle prédictif des préférences d'habitat des espèces herbacées le long d'un gradient d'hydrologie des sols.

Dans cet article, j'ai élaboré le dispositif expérimental avec l'aide de Bill Shipley et Benoit Lapointe. J'ai réalisé la prise de données avec l'aide de Diana Soriano, Yuanzhi Li, Alexandra Arès Bruneau, Stéphanie Blanchette, Sydney Gilmour et Nikola Tutic. Les analyses d'images ont été réalisées par Daniel Garneau pour les feuilles, Sydney Gilmour pour les stomates et Nikola Tutic pour les racines. J'ai choisi et réalisé les analyses statistiques avec l'aide de Bill Shipley et Cédric Frenette-Dussault. J'ai rédigé le texte principal conjointement avec Bill Shipley. Marc Vellend, Bill Parsons, Cédric Frenette-Dussault et Françoise Cardou ont fourni des commentaires sur les versions précédentes de l'article. Cet article va être soumis au journal scientifique « PLOS One » dans sa forme actuelle.

Linking hard and soft traits: Physiology, morphology and anatomy interact to determine habitat affinities to soil water availability in herbaceous dicots.

Belluau M. and Shipley B.

Abstract

Background and Aims. Species' habitat affinities along environmental gradients should be determined by a combination of physiological (hard) and morpho-anatomical (soft) traits. Using a gradient of soil water availability, we address three questions: How well can we predict habitat affinities from hard traits, from soft traits, and from a combination of the two? How well can we predict species' physiological responses to drought (hard traits) from their soft traits? Can we model a causal sequence as soft traits → hard traits → species distributions?

Methods. We chose 25 species of herbaceous dicots whose affinities for soil moisture have already been linked to 5 physiological traits (stomatal conductance and net photosynthesis measured at soil field capacity, water use efficiency, stomatal conductance and soil water potential measured when leaves begin to wilt). Under controlled conditions in soils at field capacity, we measured five soft traits (leaf dry matter content, specific leaf area, leaf nitrogen content, stomatal area, specific root length).

Key Results. Soft traits alone were poor predictors ($R^2=0.129$) while hard traits explained 48% of species habitat affinities. Moreover, hard traits were significantly related to combinations of soft traits. From a priori biological knowledge and hypothesized ecological links we built a path model showing a sequential pattern soft traits → hard traits → species distributions and accounting for 59.6% ($P = 0.782$) of habitat wetness.

Conclusions. Both direct and indirect causal relationships existed between soft traits, hard traits and species' habitat preferences. The poor predictive abilities of soft traits alone were due to the existence of antagonistic and synergistic direct and indirect effects of soft traits on habitat

preferences mediated by the hard traits. To obtain a more realistic model applicable to a population level, it has to be tested in an experiment including species competition for water supply.

Introduction

Variation in soil water availability is one of the major environmental gradients along which plant species are differentially distributed (Araya *et al.*, 2011) and is the environmental gradient of interest in this study. Presumably, the realized hydrological niches of such differentially distributed species are determined by both biotic interactions within the community and by trade-offs among functional traits involved in the water economy of a plant. It so then one should be able to predict both whole-plant performance and species relative abundances along environmental gradients given the relevant functional traits, but which traits should be used? Choosing the right traits is a key challenge in trait-based ecology and one that has not yet been completely met (Cornelissen *et al.*, 2003 ; Shipley *et al.*, 2016).

Functional traits can be grouped in ensembles possessing hierarchical relationships between them (Chapin III *et al.*, 1993; Silvertown *et al.*, 2015). The group at the top of the hierarchy is formed by morpho-anatomical traits. These traits are less plastic and have slow response times to fluctuating environments compared to traits that are placed lower in the hierarchy, i.e., physiological traits. Physiological traits are constrained to a particular range of variation by the morphological and anatomical ones, but are more plastic and respond more quickly to changes in water status. Silvertown *et al.* (2015) developed a similar idea with trade-offs in water economy at different organizational levels. At a morpho-anatomical level, the trade-off is related to the safety or efficiency of water transport. At a physiological level, the trade-off is related to leaf gas change.

Another way to look at trait hierarchies is through the “hard” versus “soft” trait distinction (Hodgson *et al.*, 1999; Violle *et al.*, 2007; Weiher *et al.*, 1999). “Hard” traits are those, usually physiological, which capture a precise function but are either difficult or expensive to measure. “Soft” traits, in contrast, are surrogates or proxies for such functions and are less difficult or expensive to obtain. “Soft” traits are usually morphological or anatomical. Given the previously

described hierarchy one would expect that the causal relationships should follow the order: soft \rightarrow hard \rightarrow performance. Since environmentally-dependent plant performance (growth, survival, reproduction) is a key component determining habitat affinities and population distributions, the predictions of habitat affinities should be more robust when using the indirect path (soft \rightarrow hard \rightarrow habitat) than when using the direct path (soft \rightarrow habitat).

We tested this prediction by building on the study of Belluau and Shipley (2017). They used 25 herbaceous species differing in their field distribution along a gradient of soil water availability and took a series of physiological traits related to leaf gas exchange and leaf wilting during an experimental period of drought. They identified five physiological “hard” traits that collectively predicted the known soil moisture affinities of each species: (i) water use efficiency at the first clear wilting stage (WUE_{wilt}); (ii) maximal stomatal conductance at soil field capacity (g_s^{max}); (iii) soil water potential at the first clear wilting stage (Ψ_{wilt}); (iv) maximum net photosynthesis (A_{max} , i.e., at soil field capacity); and (v) stomatal conductance at the first clear wilting stage (g_s^{wilt}). These traits are time-consuming to measure and require experimental manipulations of soil water availability. Normally, one would want to predict ecological responses using easily measurable traits in the field and under normal (i.e. non-drought) conditions. In this study, we introduce a series of static morpho-anatomical (“soft”) traits measured on plants of the same species but growing under non-drought conditions. Using this series of soft and hard traits, we asked three questions :

- 1) How well can we predict habitat affinities only from hard traits, only from soft traits, or from a combination of the two? Do we lose predictive ability of habitat affinities (a demographic consequence) by going directly from soft (morphological) traits to species distributions?
- 2) How well can we predict species' physiological responses to drought (hard traits) from their morphological traits (soft traits)?
- 3) Can we model the causal sequence as soft traits \rightarrow hard traits \rightarrow species distributions as shown in the multivariate hypothesis summarized in Fig. 3.1?

Material and Methods

Experimental design

Study species and habitat affinities. We used 25 species of dicots from 18 different families (Table 3.1). All species were herbs, except for *Cistus salvifolius*, a small shrub which does not produce lignified tissues during its first year and so is a functional herb during this period. These species were selected (i) to represent all three hydrological stages along a gradient of affinities for water from dry to wet soils while excluding the extremes (deserts and aquatic habitats) of the hydrological gradient, (ii) to represent every phenological strategy of herbs (annual, biannual and perennial) and (iii) to cover the range of functional traits and adaptive strategies that are described and quantified by Grime *et al.* (2007). We selected species based on an ordinal ranking of habitat affinity giving 11 species typical of dry soils (hereafter "dry"), 9 species typical of intermediate soils (hereafter "intermediate") and 5 species typical of wet soils (hereafter "wet"); see Belluau and Shipley (2017) for details on how habitat affinities were assigned. An ordinal variable is a categorical variable for which the possible values are ordered (here, the level of soil wetness) but are unitless and not quantitative. To assign a species to a given ordinal rank, we combined several sources (details about the sources are reported in Belluau and Shipley (2017, [ANNEXES B, Table B.1])).

Table 3.1 : Species list containing soil hydrological classification, life cycle, orders and families. Taxonomic nomenclature follows The International Plant Names Index (2016) <http://www.ipni.org> [accessed 14/11/2016]. The soil hydrology classification of the species is based on several sources reported in Belluau and Shipley (2017, [ANNEXES B, Table B.1]) along with taxonomic authorities.

Species name	Soil hydrology	Life cycle	Order	Family
<i>Achillea millefolium</i>	Dry	Perennial	Asterales	Asteraceae
<i>Asclepias syriaca</i>	Dry	Perennial	Gentianales	Apocynaceae
<i>Campanula americana</i>	Intermediate	Annual / Biannual	Asterales	Campanulaceae
<i>Centaurea cyanus</i>	Intermediate	Annual / Biannual	Asterales	Asteraceae
<i>Cerastium tomentosum</i>	Dry	Perennial	Asterales	Caryophyllaceae
<i>Chenopodium polyspermum</i>	Wet	Annual	Caryophyllales	Amaranthaceae
<i>Cistus salviifolius</i>	Dry	Perennial	Violales	Cistaceae
<i>Daucus carota</i>	Intermediate	Biannual	Apiales	Apiaceae
<i>Epilobium ciliatum</i> subsp. <i>glandulosum</i>	Wet	Perennial	Myrtales	Onagraceae
<i>Erigeron canadensis</i>	Dry	Annual	Asterales	Asteraceae
<i>Eupatorium perfoliatum</i>	Wet	Perennial	Asterales	Asteraceae
<i>Hypericum perforatum</i>	Wet	Perennial	Malpighiales	Hypericaceae
<i>Jacquemontia gracillima</i>	Intermediate	Perennial	Solanales	Convolvulaceae
<i>Lythrum salicaria</i>	Wet	Perennial	Myrtales	Lythraceae
<i>Medicago lupulina</i>	Dry	Annual / Biannual	Fabales	Fabaceae
<i>Medicago sativa</i>	Intermediate	Perennial	Fabales	Fabaceae
<i>Melilotus albus</i>	Dry	Biannual	Fabales	Fabaceae
<i>Myagrum perfoliatum</i>	Intermediate	Annual	Brassicales	Brassicaceae
<i>Nigella damascena</i>	Intermediate	Annual	Ranunculales	Ranunculaceae
<i>Plantago lanceolata</i>	Dry	Perennial	Lamiales	Plantaginaceae
<i>Rumex acetosella</i>	Dry	Perennial	Caryophyllales	Polygonaceae
<i>Scorzonerooides autumnalis</i>	Dry	Perennial	Asterales	Asteraceae
<i>Silene vulgaris</i>	Dry	Perennial	Asterales	Caryophyllaceae
<i>Stellaria media</i>	Intermediate	Annual	Asterales	Caryophyllaceae
<i>Trifolium pratense</i>	Intermediate	Perennial	Fabales	Fabaceae

Experimental design. Plants were grown under controlled conditions. Photosynthetically active photon flux was $160 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \pm 20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR using a 1000W high-pressure sodium and a 1000W metal-halide bulb for 12 hours per day, giving a Daily Quantum Yield of $6.912 \text{ mol m}^{-2} \text{ day}^{-1}$. These values are lower than typically encountered in the field but are standard in experiments conducted in growth chambers and are sufficient to insure normal growth rates (Shiple, 2006). Daytime temperature was $24 \text{ }^\circ\text{C} (\pm 2 \text{ }^\circ\text{C})$, and was decreased to $20 \text{ }^\circ\text{C} (\pm 2 \text{ }^\circ\text{C})$ at night. Relative humidity of the air was $45 \% (\pm 5 \%)$. The planting substrate was 90 % sand and 10 % peat loam, with an additional 6 g of NPK fertilizer (7-12-12) per kg of soil. These growing conditions are the same as Belluau and Shipley (2017). Each species was represented by 5 individual plants, planted in separate pots ($10 \times 10 \times 22 \text{ deep cm}^3$, approximately 2L per pot). Seeds were germinated directly in the pots. Individuals per species were selected to be most similar in terms of age, height and number of leaves at the beginning of the measurements. The position of each pot was fully randomized. All plants were grown in soil that was constantly maintained at field water capacity during the experiment by adding sufficient water every two days. Volumetric water content was estimated from soil dielectric permittivity measurements (HydroSense II probe, Campbell Scientific, Edmonton, AB, Canada). The probe was placed in the centre of the pot to avoid edge effects. Measurements begin when the plants reached a size and an age comparable with the plants used in Belluau and Shipley (2017).

Measurements

Morphological and anatomical traits. We measured traits on leaves and roots of each species. All traits in this study were measured using the protocols found in Cornelissen *et al.* (2003), Pérez-Harguindeguy *et al.* (2013) and PrometheusWiki web site (Sack *et al.*, 2010; http://prometheuswiki.publish.csiro.au/tiki-custom_home.php) and are reported in Table 3.2. For all traits, we used the average value of five individuals per species. For all leaf traits, we excluded the petioles because petioles don't belong to the same function as the leaf blade (i.e. support and orientation for petioles and light acquisition for leaf blades). Leaves were chosen to be representative of the average mature leaf into one individual and we avoided newly formed leaves or ones showing any sign of senescence.

Table 3.2 : List and description of the soft and hard traits used in the analysis. (A) The five soft traits are the morphological traits predicting hard traits, identified in the path analysis (Fig.3). (B) The six hard traits are the physiological traits identified as predictors of the habitat affinity to soil wetness, identified in Belluau & Shipley (in press). Mean traits values for all 25 species are reported in Table C.1 [ANNEXES C].

Traits	Symbol	Unit	Description
<i>(A) Soft traits used in the present path analysis</i>			
<i>Leaf dry matter content</i>	LDMC	g g ⁻¹	Leaf dry matter content at field capacity, calculated from all mature leaves fresh weight divided by all mature leaves dry weight.
<i>Specific leaf area</i>	SLA	m ² kg ⁻¹	Specific leaf area at field capacity, calculated as the ratio between the leaf area of all mature leaves divided by the dry mass of all matures leaves.
<i>Leaf nitrogen content</i>	LNC	mg g ⁻¹	Leaf nitrogen content is calculated as the dry mass of nitrogen on the dry mass of the entire sample.
<i>Stomatal area</i>	Stom _{area}	μm ²	Average stomatal area, calculated from the average length and width of guard cells.
<i>Specific root length</i>	SRL	m g ⁻¹	Specific root length at field capacity, calculated as the ratio between the root length of half of the root system to the dry mass of the same half of the root system.
<i>(B) Hard traits from Belluau & Shipley (in press)</i>			
<i>Maximum stomatal conductance</i>	g _s ^{max}	mmol _{H2O} m ⁻² s ⁻¹	Stomatal conductance at field capacity, calculated from the piecewise regression.
<i>Stomatal conductance at stage 2 wilting point</i>	g _s ^{wilt}	mmol _{H2O} m ⁻² s ⁻¹	Stomatal conductance at the stage 2 wilting point, based on the average volumetric water content at stage 2 wilting point (water volume/soil volume, 100 x m ³ .m ⁻³), calculated from the piecewise regression.
<i>Soil water potential at stage 2 wilting point</i>	Ψ _{wilt}	MPA	Soil water potential at stage 2 of visual wilting point, calculated from the equation relating volumetric water content and water potential.
<i>Maximum net photosynthesis</i>	A _{max}	μmol _{co2} m ⁻² s ⁻¹	Net photosynthesis at field capacity, the first day of experiment.
<i>Net photosynthesis at stage 2 wilting point</i>	A _{wilt}	μmol _{co2} m ⁻² s ⁻¹	Net photosynthesis measured when the individual reaches the stage 2 wilting point.
<i>Water use efficiency at stage 2 wilting point</i>	WUE _{wilt}	μmol _{CO2} m ⁻² s ⁻¹ / mmol _{H2O} m ⁻² s ⁻¹	Water use efficiency calculated when the individual reaches the stage 2 wilting point, based on Net photosynthesis at stage 2 wilting point.

Leaf dry matter content (LDMC, g g^{-1}) is measured as the ratio between the dry mass on the fresh mass of all mature leaves of the entire individual. Specific leaf area (SLA, $\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$) is measured as the ratio between the leaf area on the dry mass of all mature leaves of the entire individual. Leaf area was measured using a scanner. Leaf nitrogen content (LNC, mg g^{-1}) is measured as the ratio between the dry mass of leaf nitrogen to the dry mass of the leaf. Leaf nitrogen mass was analyzed by dry combustion (Vario Macro, Elementar analysensystem GmbH, Haan, Germany). Stomatal area ($\text{Stom}_{\text{area}}$, μm^2) was calculated by approximating the stomate as an ellipse: $\text{area} = (\pi/2) (\text{stomatal length}) (\text{stomatal width})$. Leaf imprints were obtained by placing clear nail polish on the underside of a leaf and then taking digital images from a microscope using an objective lens at 20X and 40X, representing a field of vision of approximately 0.307 and 0.080 cm^2 respectively (Microscope : Axio Observer Z1; Lens : Zeiss 20x/0.8 Plan-Apochromat, Zeiss 40x/0.95 Plan-Apochromat : Camera : Zeiss Axiocam 506 mono ; Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany). Stomatal length and width (μm) were measured using the imaging software Fiji (Schindelin *et al.*, 2012). The length and width measured are the guard cells maximum length and width. Measures were taken on five stomates per image, ten images per leaf and one leaf from each two individuals per species for a total of 100 stomates per species. The pictures are taken along both sides of the mid-rib in the middle of the leaf. We used the average value of all measurements per individual per species. Specific root length (SRL, m g^{-1}) was measured as the ratio between the root length of half of the root system to the dry mass of the same half of the root system. After cleaning of the root system, the root length was measured using a scanner and the WinRhyzo software (Régent Instruments Inc., Québec, Canada).

Data analysis

Predictive ability using a cumulative link model analysis. Since the dependent variable (i.e. a species habitat affinity along the gradient of soil moisture) was in the form of an ordered category with three states (dry, intermediate or wet), while the independent variables were the trait values of each species, the proper statistical model is a cumulative link model (*clm* function in the *ordinal* package of R (Christensen, 2015), which is an extension of logistic regression but

made to analyze ordinal dependent observations having more than two states (McCullagh, 1980). We use McFadden's R^2 (McFadden, 1974), based on the ratio of the log-likelihood of the model to the log-likelihood of a model without the traits (i.e. an intercept-only model) to assess the predictive ability of the resulting model. This R^2 is interpreted in the same way as a classic model R^2 and reduces to the classic R^2 (i.e. proportion of the variance explained by the model) in the case of a linear model with a normally-distributed dependent variable.

Stepwise backward model selection by AIC. In order to explore the relationships between hard and soft traits, we conducted a stepwise backward model selection by the Akaike information criterion using the stepAIC function in the R package *MASS* (Venables and Ripley, 2002). This analysis was performed by regressing the five soft traits on each of the hard traits in a stepwise backward fashion. Models were selected based the lowest value of AIC.

Path analysis. We used path analysis (Shipley, 2015) to develop and test hypotheses concerning the causal relationships between the morphological traits, the physiological traits and the field distributions. Our initial hypothesized causal structure (Fig. 3.1) reflects a combination of *a priori* definitional and ecological links (Table C.2 [ANNEXES C]) and was subsequently modified to obtain a final model that successfully accounted for the patterns of conditional dependencies in the data. The modifications were made to improve the fit between the data and the model, conditional on such modifications not contradicting known biology. We used the *sem* function in the *lavaan* package of R (Rosseel, 2012). We present the path coefficients based on standardized values with units of standard deviations of the mean in order to compare the relative importance of each variable. We used the maximum likelihood estimator (“MLM”) with standard errors and a means-adjusted (or “Satorra-Bentler”) Chi-square test statistic (Satorra and Bentler, 2000), both of which are robust to non-normality. In order to control for the rather small sample size, we corrected the asymptotic null probabilities using Monte Carlo correction method (Shipley 2015, p. 178). We conducted all statistical analyses within the R statistical environment (R core Team 2015 ; Version 3.1.2, R Core Development Team, 2015-12-04).

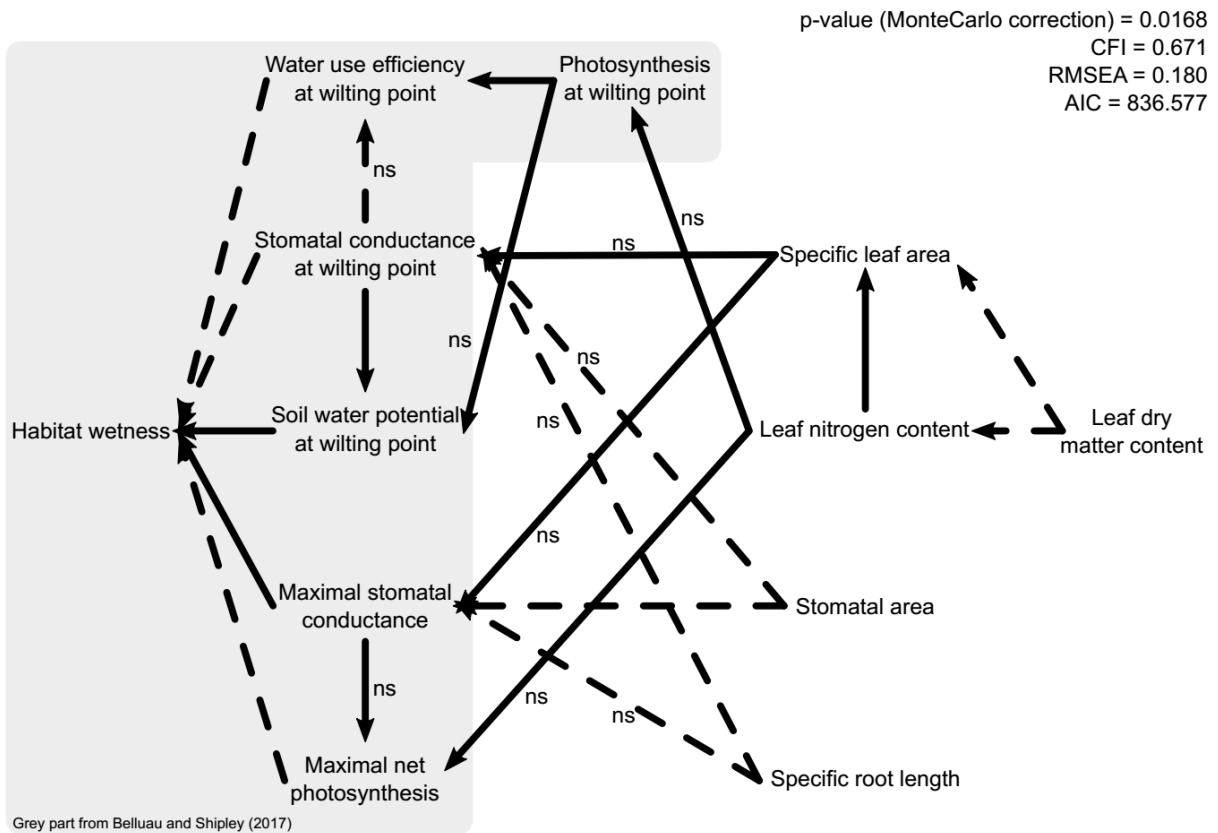


Figure. 3.1 : Initial (hypothetical) path model of the physiological and morphological traits. The relationships shown are based on *a priori* ecological links found in the literature (Table C.2 [ANNEXES C]). The grey part is the path model from Belluau and Shipley (2017). Solid lines are positive causal relationships while dashed lines are negative. The path coefficients are not reported here except for non-significant links (ns). This initial (hypothetical) path model was statistically rejected (Satorra-Bentler robust Chi-square = 85.051 : 47 df : $p = 0.0168$; Comparative Fit Index (CFI) = 0.671 ; Root Mean Square Error of Approximation (RMSEA) = 0.180).

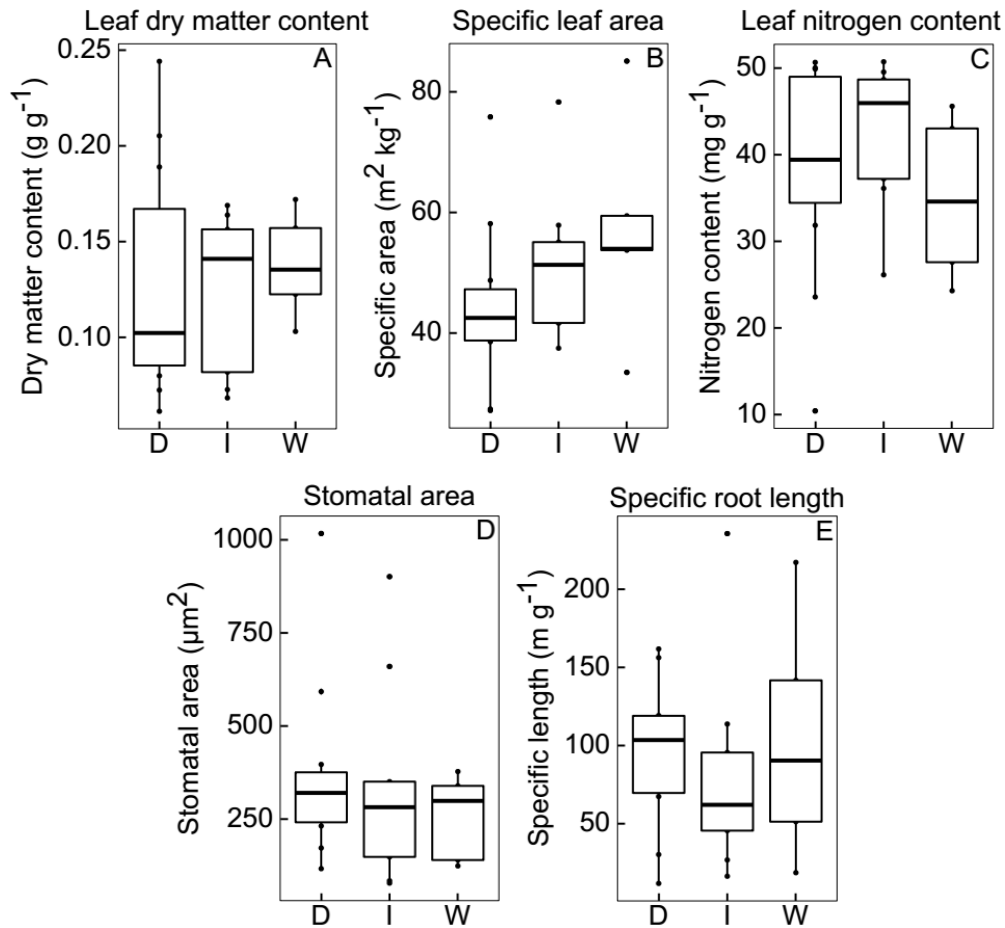


Figure 3.2 : Box plots showing the differences between species means of the soft trait values, measured at field capacity, grouping species according to affinity for habitat wetness; "D" (species typical of "dry" soils), "I" (species typical of "intermediate" soils), "W" (species typical of "wet" soils). Non-parametric (Kruskal-Wallis) 1-way ANOVAs did not detect any significant differences between the three species groups for any of these five traits.

Results

Predictive ability of hydrological groups using soft versus hard traits

When considering each of the five soft traits separately, very few significant differences were detected between the mean morphological traits of the three groups of species based on their habitat preferences. Fig. 3.2 presents boxplots of the five soft traits measured at field capacity according to groups of habitat wetness. Non-parametric (Kruskal-Wallis) 1-way ANOVAs did not detect any significant differences between the three species groups for any of the five traits. All traits values for all 25 species are reported in Table C.1 [ANNEXES C]. Even in a multivariate context, soft traits alone were poor predictors of species habitat affinities. When regressing the five soft (i.e. morphological) traits together on the habitat affinities using the CLM analysis, only one trait (SLA) was significant ($P=0.031$) (Table 3.3A) and these five soft traits together accounted for only 12.9% of the deviance in the habitat affinities of the species. This contrasts with the predictive ability of the hard traits (WUE_{wilt} , g_s^{max} , g_s^{wilt} , A_{max} and Ψ_{wilt}). When regressing these five physiological traits on the habitat affinities using a CLM analysis they were all statistically significant and together accounted for 48% of the deviance in the habitat affinities of the species (Table 3.3B).

Predictive ability of hard traits using soft traits. The soft traits had variable success in predicting the hard traits using backward stepwise regression (Table 3.4). Net photosynthetic rates and stomatal conductance at the start of the drought period and net photosynthetic rates at leaf wilting were significantly related to combinations of the soft traits while the other hard traits were not.

Table 3.3 : Cumulative link model analysis of the hard and soft traits as predictors of the habitat wetness preferences : (A) with the five soft traits identified in the present path analysis explaining 12.9 % of total deviance. (B) with the five hard traits from Belluau and Shipley (2017) explaining 48.1% of total deviance.

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)	
<i>(A) CLM with five soft traits used in the analysis</i>					
Specific leaf area	0.0814	0.038	2.157	0.031	*
Stomatal Area	-0.0033	0.002	-1.423	0.155	
Leaf nitrogen content	-0.0559	0.057	-0.983	0.325	
Leaf dry matter content	-2.5420	13.430	-0.189	0.850	
Specific root length	-0.0001	0.007	-0.012	0.990	
Threshold dry medium	0.013	4.232	0.003		
Threshold medium wet	2.018	4.247	0.482		
R^2 (McFadden's R^2)	0.129				
<i>(B) CLM with five hard traits from Belluau and Shipley (2017)</i>					
Water use efficiency at wilting point	-155.366	55.110	-2.819	0.005	**
Maximum conductance	0.023	0.009	2.696	0.007	**
Soil water potential at wilting point	0.506	0.220	2.304	0.021	*
Conductance at wilting point	-0.019	0.009	-2.039	0.041	*
Maximum Net Photosynthesis	-0.450	0.242	-1.862	0.063	.
Threshold dry medium	-5.248	3.087	-1.700		
Threshold medium wet	-1.603	2.707	-0.592		
R^2 (McFadden's R^2)	0.481				

Table 3.4 : Stepwise backward linear regression, based on AIC values, of each of five hard traits (A_{wilt} , g_s^{wilt} , Ψ_{wilt} , g_s^{max} , A_{max}) on a linear combination of five soft traits (leaf dry matter content (LDMC, $g\ g^{-1}$), specific leaf area (SLA, $m^2\ kg^{-1}$), leaf nitrogen content (LNC, $mg\ g^{-1}$), stomatal area ($stom_{area}$, μm) and specific root length (SRL, $m\ g^{-1}$)). Shown are those soft variables that are significant predictors ($p < 0.05$) and the selected model AIC value.

Hard traits	Selected model	AIC value (selected model)
A_{wilt}	$A_{wilt} \sim LDMC + SLA$	6.22
g_s^{wilt}	$g_s^{wilt} \sim \text{none}$	219.81
Ψ_{wilt}	$\Psi_{wilt} \sim \text{none}$	98.53
g_s^{max}	$g_s^{max} \sim LDMC + LNC$	230.39
A_{max}	$A_{max} \sim LDMC + SLA + LNC + stom_{area} + SRL$	42.08

Testing hypothesized causal relationships between hard traits, soft traits and habitat affinities. Our initial causal hypothesis linking soft traits, hard traits and habitat affinities (Fig. 3.1) was rejected (Satorra-Bentler robust Chi-square = 85.051: 47 df : $p = 0.0168$). We therefore modified this initial model to produce a second model (Fig. 3.3) that shows no significant misfit between the empirical data and the causal structure (Satorra-Bentler robust Chi-square = 40.795 : 42 df : $p = 0.782$). These modifications were guided by three principles: First, path coefficients in the initial model (Fig. 3.1) that were not statistically different from zero were set to zero (i.e. removed) unless they had clear biological justifications. We maintained four such marginally nonsignificant path coefficients (shown in Fig. 3.3). Second, we added new paths to our initial model if these were both biologically justifiable and were statistically significant (based the stepwise backward model selection above, Table 3.4). These added paths were (i) from LDMC to A_{wilt} , A_{max} and g_s^{max} , (ii) from SLA to A_{wilt} and A_{max} , (iii) from LNC to g_s^{wilt} and g_s^{max} , (iv) from stomatal area to Ψ_{wilt} , and A_{max} and (v) from SRL to A_{max} . Finally, since the modified model required a link between stomatal area and LDMC although there was no clear biological justification for a causal link between them, we allowed these two variables to freely covary. The resulting path model accounted for 59.6% of the variation in the habitat wetness variable.

Discussion

From Belluau and Shipley (2017), we already know that the five physiological (hard) traits can predict the habitat affinities of our species along a gradient of soil water availability and that a plausible multivariate causal hypothesis linking them is consistent with both the observed data a pre-existing knowledge. However, these traits are difficult and time-consuming to measure and some of them require that the plant already be wilting before measurements are taken. This limits their usefulness in large-scale trait-based ecology. We expected, given the hierarchy of traits described by Chapin III *et al.* (1993) and Silvertown (2015) that (i) soft (morpho-anatomical) traits would be more loosely linked to habitat affinities than the hard traits; that (ii) the soft traits would, none the less, link to the hard traits; and that (iii) we should be able to express the links as soft \rightarrow hard \rightarrow habitat.

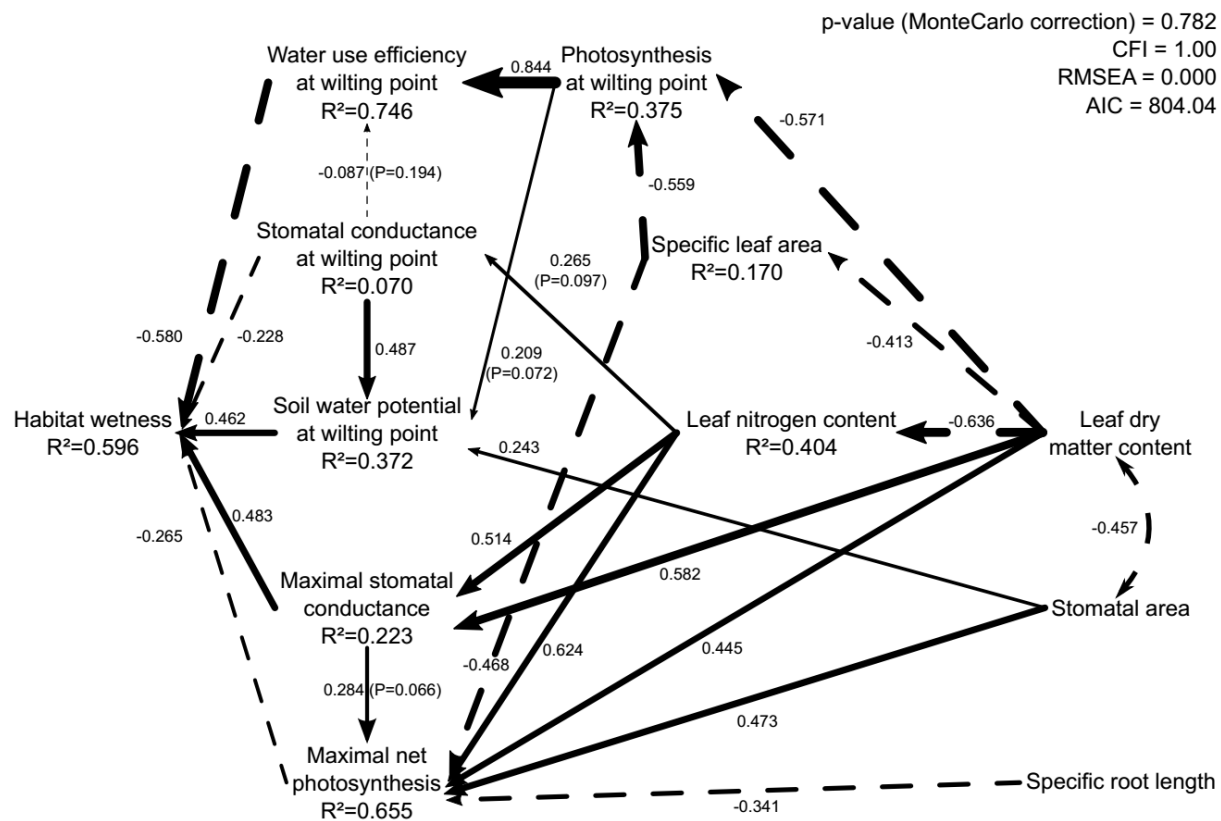


Figure 3.3 : Path analysis of the physiological and morphological traits. There is no significant misfit between the empirical data and the causal structure specified by the model (Satorra-Bentler robust Chi-square = 40.795 : 42 df : $p = 0.782$; Comparative Fit Index (CFI) = 1.00 ; Root Mean Square Error of Approximation (RMSEA) = 0.00), Akaike information criterion (AIC) = 804.037. All path coefficients are significantly different from zero, otherwise the paths' significativities are specified in the diagram. The R^2 are the percentage of variance explained by the causal variables. Values on the lines are the path coefficients between the causal variable and the caused variable. Solid lines are positive causal relationships and dashed lines are the negative ones. Thickness of the lines is proportional to the strength of path coefficients.

Soft traits alone don't predict habitat preferences

Our first expectation was confirmed. The soft traits were more loosely linked to habitat affinities than the hard traits. First, the trait values of the “dry”, “intermediate” and “wet” species were largely overlapping (Fig. 3.2) and no significant differences between these three groups were detected for any single soft trait. In fact, only SLA was significantly related to the different habitat affinities and explained only 13% of the variance explained (Table 3.3A). This contrasts with the CLM analysis done on hard traits (Belluau and Shipley, 2017) which explained 48.1% of the variance in the habitat affinities (Table 3.3B). Despite the weak correlation between the soft traits and the habitat affinities, this does not necessarily mean that no link exists. Those links could be indirect or very loose.

Can species' hard traits be predicted from their soft traits?

Our second expectation, that the physiological traits could be linked to the morpho-anatomical traits measured in the absence of stress, was only partly confirmed when looking only at the regression results. Some hard traits have relationships with soft traits while others don't. However, the final path model (Fig. 3.3, discussed further below) provided an explanation for this.

Regarding net photosynthetic rates and stomatal conductance at the start of the drought period and net photosynthetic rates at leaf wilting, the literature largely confirms the relationships identified in the stepwise analysis (Table 3.4 and Table C.2 [ANNEXES C]). Since soft traits are surrogates or proxies of functions in the plant, it is not surprising to find relationships between stomatal conductance and photosynthesis at field capacity, and common leaf traits, especially since they are measured in the same conditions. Those relationships are foundation stones of the functional ecology approach (Violle *et al.*, 2007). In the stepwise analysis, maximum stomatal conductance (g_s^{\max}) is related to LNC and LDMC (Schulze *et al.*, 1994; Juhrebandt *et al.*, 2004; Chaturvedi *et al.*, 2014; Kröber and Bruehlheide, 2014). In the same fashion, maximum net photosynthesis (A_{\max}) is well related to all soft traits (Reich *et al.*, 1998; Wright *et al.*, 2004; Alameda and Villar, 2012; Galmés *et al.*, 2013; Garnier *et al.*, 2016).

Considering A_{wilt} , we could expect that the relationships existing a field capacity are conserved in drought conditions (Wright *et al.*, 2004; Garnier *et al.*, 2016). This expectation is confirmed by the stepwise analysis and by the literature (Tyree, 2007). However, stomatal conductance at wilting (g_s^{wilt}) and soil water potential at wilting (Ψ_{wilt}) were not related to any soft traits even if we could have expected correlations between g_s^{wilt} and LNC and between Ψ_{wilt} and $\text{stom}_{\text{area}}$ considering the literature (Schulze *et al.*, 1994; Galmés *et al.*, 2013; Mitchell *et al.*, 2008; Kröber and Bruehlheide, 2014).

The path analysis allows us to explore the relationships between hard and soft traits detected by the stepwise analysis as well as the relationship between soft traits. Some non-significant relationships in the stepwise analysis can be biologically and statistically relevant in a path analysis.

Direct and indirect relationships between soft traits, hard traits and habitat preferences.

The patterns of correlation and partial correlation between the variables that were implied by our initial causal hypothesis (Fig. 3.1) were significantly different than those in the empirical data, forcing us to reject this initial multivariate causal hypothesis. Our modified model (Fig 3.3) showed no statistical evidence of lack of fit but, since it was developed based partly on the empirical data themselves and since it has relatively low statistical power (only 25 species), it should be viewed as simply a plausible hypothesis that is consistent with the available evidence but that requires independent testing. However, the available evidence goes well beyond our specific data since there exist multiple studies reporting correlations between variables included in our model and that guided our modifications. Such correlative relationships do not justify by themselves the existence of the causal relationships shown in our model but are consistent the biological hypotheses leading to the relationships included in our path model. All the details on the correlations supporting the model are available in Table C.2 [ANNEXES C].

The model shows strong direct and indirect relationships between soft and hard traits along with direct and indirect relationships between soft traits. Importantly, the model doesn't show any direct relationship between a soft trait and habitat wetness. Instead, all of the links between soft traits and habitat affinities are indirect and mediated by the hard traits. The links between

morphological traits are largely supported by key studies (Wright *et al.*, 2004; Garnier *et al.*, 2016).

Three of the five soft traits (SLA, LDMC and LNC) are commonly used in functional ecology and are included in Wright *et al.*'s (2004) leaf economic spectrum. The LDMC shows a negative causal link with LNC ($R^2=0.40$). We found a negative causal link between SLA and LDMC as expected from the literature (Wright *et al.*, 2004; Garnier *et al.*, 2016). The stomatal area and SRL are less connected to the other soft traits. Stomatal area is linked to only one other traits (LDMC), being negatively covariant, which is not consistent with Römermann *et al.* (2016) who reported a small but positive correlation ($R^2=0.03$). We know of no mechanistic reason why species whose leaves have greater tissue density (higher LDMC) would have smaller stomates, which is why we modelled this as a free covariance rather than a directed relationship.

SRL is not linked to any other soft traits. Note that these greater SRL values are not simply plastic responses that are caused by a drying soil because they are measured in soil maintained a field capacity. It is likely that species adapted to drier soils have a greater plasticity in SRL allowing them a greater proportional allocation to roots length than root biomass during drought in order to gain access to water in deeper soil layers during the dry season and therefore maintain photosynthetic rates (Wright *et al.*, 1992). This would be a case of drought avoidance rather than drought tolerance.

Antagonistic and synergistic direct and indirect effects of soft traits on habitat preferences

Although our soft traits do not have any direct causal links to habitat affinities, they are all linked to habitat affinities. The overall correlations are weak precisely because (i) they act only indirectly through the mediating effects of the physiological traits and (ii) they often have qualitatively different effects via different physiological variables. In other words, our morphological traits have both antagonistic and synergistic effects at the same time on the physiological traits. The model does not show any link between soft traits and the habitat affinities that is not mediated by one or more hard traits. When we added direct links between soft traits and the habitat affinities in the model, the links were always nonsignificant and the model was rejected.

The path analysis allows us to investigate the reason why soft traits are only very weakly correlated to the habitat affinities. Mathematically, the correlation between two variables is equal to the sum of the product of each path coefficient between these two variables along each directed path linking them (Shipley, 2015). This means that the correlation between soft traits and habitat will always be weaker than the correlation between hard traits and habitat whenever the link between soft traits and the habitat affinity is only indirect. Furthermore, whenever there is more than one directed path from a soft trait to the habitat, and when the signs (positive or negative) along these alternate paths are different, the overall correlation between a soft trait and the habitat will be further weakened even though these indirect causal paths exist and may even be individually strong (Fig. 3.3).

For instance, if we consider the overall relationship between habitat wetness and leaf dry matter content, several paths exist from one to the other in Fig. 3.3. One path goes from LDMC to habitat wetness via the maximum stomatal conductance. Regarding only the signs of the path, the link between LDMC and g_s^{\max} is positive and the link between g_s^{\max} and habitat wetness is positive. Multiplying the two gives an overall positive effect. Another path goes from LDMC to habitat wetness via leaf nitrogen content and g_s^{\max} . The link between LDMC and LNC is negative, the link between LNC and g_s^{\max} is positive and the link between g_s^{\max} and habitat wetness is positive. Multiplying them together gives a negative effect along this path. One additional path goes from LDMC to habitat wetness via SLA, photosynthesis at wilting and water use efficiency at wilting. Multiplying the path coefficients along this path (Fig 3.3) gives a positive effect. Regarding only these three indirect effects linking LDMC and habitat affinities (there are others in Fig 3.3), we can see that there are both antagonistic and synergistic effects linking LDMC and an affinity for habitat wetness and this attenuates the overall correlation between these two variables.

The model we have proposed is based on experiments imposing an artificial drought and is performed on plants grown in individual pots. In such experimental conditions, individuals do not compete for resources (water, light, nutrients) and so such results are applicable to potential niches rather than to realized niches (Araya *et al.*, 2011). To obtain a more realistic model that could be applied to a population level, the model has to be tested in an experiment including inter- and intra-specific competition for water supply. In the context of gradients in soil water

availability, these realized hydrological niches would be determined by trade-offs in functional traits that are involved in the water economy of a plant and that are implicated in determining plant performance along this environmental gradient.

The path analysis method used in this study allows us to better understand the complex relationships existing between soft traits, hard traits and habitat preferences. We think that the complexity of the relationships along with the antagonistic and synergistic effects between traits are the reason why the morphological soft traits are poor predictors of the habitat affinities despite the fact that the soft traits do affect affinities for soil moisture and so are functional. However, the functional significance and meaning of such soft traits are complicated by the intricate and indirect nexus of links between them and ecological distributions along environmental gradients. As stated before by Cornelissen *et al.* (2003) and Pérez-Harguindeguy *et al.* (2013), we need to better assess the significance of the soft traits in relation to hard traits and the significance of hard traits in relation to plant performance or fitness.

References

- Alameda, D., and Villar, R. (2012). Linking root traits to plant physiology and growth in *Fraxinus angustifolia* Vahl. seedlings under soil compaction conditions. *Environ. Exp. Bot.* 79, 49–57.
- Araya, Y.N., Silvertown, J., Gowing, D.J., McConway, K.J., Peter Linder, H., and Midgley, G. (2011). A fundamental, eco-hydrological basis for niche segregation in plant communities. *New Phytol.* 189, 253–258.
- Belluau, M., and Shipley, B. (2017). Predicting habitat affinities of herbaceous dicots to soil wetness based on physiological traits of drought tolerance. *Ann. Bot.* 119, 1073–1084.
- Chapin III, F.S., Autumn, K., and Pugnaire, F.I. (1993). Evolution of Suites of Traits in Response to Environmental Stress. *Am. Nat.* 142, S78–S92.
- Chaturvedi, R.K., Raghubanshi, A.S., and Singh, J.S. (2014). Relative effects of different leaf attributes on sapling growth in tropical dry forest. *J. Plant Ecol.* 7, 544–558.
- Christensen, R.H.B. (2015). Ordinal : Regression Models for Ordinal Data. R Package. Version 2015-06-28.
- Cornelissen, J.H.C., Lavorel, S., Garnier, E., Diaz, S., Buchmann, N., Gurvich, D.E., Reich, P.B., ter Steege, H., Morgan, H.D., van der Heidjen, M.G. a, et al. (2003). A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Aust. J. Bot.* 51, 335–380.
- Galmés, J., Ochogavía, J.M., Gago, J., Roldán, E.J., Cifre, J., Conesa, M.À., Ochogavía, J.M., Gago, J., Roldán, E.J., Cifre, J., et al. (2013). Leaf responses to drought stress in Mediterranean accessions of *Solanum lycopersicum*: anatomical adaptations in relation to gas exchange parameters. *Plant, Cell Environ.* 36, 920–935.
- Garnier, E., Navas, M.-L., and Grigulis, K. (2016). Plant functional diversity: organism traits, community structure, and ecosystem properties. (Oxford University press, Oxford, UK.).
- Grime, J.P., Hodgson, J.G., and Hunt, R. (2007). Comparative plant ecology: a functional approach to common British species. 2nd edition (Castlepoint Press, Brough, UK.).
- Hodgson, J.G., Wilson, P.J., Hunt, R., Grime, J.P., and Thompson, K. (1999). Allocating C-S-R plant functional types: A soft approach to a hard problem. *Oikos* 85, 282–294.

- Juhrbandt, J., Leuschner, C., and Hölscher, D. (2004). The relationship between maximal stomatal conductance and leaf traits in eight Southeast Asian early successional tree species. *For. Ecol. Manage.* 202, 245–256.
- Kröber, W., and Bruehlheide, H. (2014). Transpiration and stomatal control: A cross-species study of leaf traits in 39 evergreen and deciduous broadleaved subtropical tree species. *Trees - Struct. Funct.* 28, 901–914.
- McCullagh, P. (1980). Regression Models for Ordinal Data. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* 42, 109–142.
- McFadden, D. (1974). Condition logit analysis of qualitative choice behavior. In *Frontiers in Econometrics*, pp. 105–142.
- Mitchell, P.J., Veneklaas, E.J., Lambers, H., and Burgess, S.S.O. (2008). Using multiple trait associations to define hydraulic functional types in plant communities of south-western Australia. *Oecologia* 158, 385–397.
- Pérez-Harguindeguy, N., Díaz, S., Garnier, E., Lavorel, S., Poorter, H., Jaureguiberry, P., Bret-Harte, M.S., Cornwell, W.K., Craine, J.M., Gurvich, D.E., et al. (2013). New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. *Aust. J. Bot.* 61, 167–234.
- http://prometheuswiki.publish.csiro.au/tiki-custom_home.php
- R Core team (2015). R Core Team. *R A Lang. Environ. Stat. Comput. R Found. Stat. Comput.*, Vienna, Austria. URL <http://www.R-Project.org/>. 55, 275–286.
- Reich, P.B., Walter, M.B., Tjoelker, M.B., Vanderklein, D., and Buschena, C. (1998). Photosynthesis and respiration rates depend on leaf and root morphology and nitrogen concentration in nine boreal tree species differing in relative growth rate. *Funct. Ecol.* 12, 395–405.
- Römermann, C., Bucher, S.F., Hahn, M., and Bernhardt-Römermann, M. (2016). Plant functional traits - fixed facts or variable depending on the season? *Folia Geobot.* 51, 143–159.
- Rosseel, Y. (2012). lavaan: an R package for structural equation modeling. *J. Stat. Softw.* 48, 1–36.

- Sack, L., Cornwell, W.K., Santiago, L.S., Barbour, M.M., Choat, B., Evans, J.R., Munns, R., and Nicotra, A. (2010). A unique web resource for physiology, ecology and the environmental sciences: PrometheusWiki. *Funct. Plant Biol.* 37, 687–693.
- Satorra, A., and Bentler, P. (2000). A scaled difference chi-square test statistic for moment structure analysis. *Psychometrika* 66, 507–514.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682.
- Schulze, E.D., Kelliher, F.M., Korner, C., Lloyd, J., and Leuning, R. (1994). Relationships among maximal stomatal conductance, carbon assimilation rate, and plant nitrogen nutrition: A global ecology scaling exercise. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 25, 629–660.
- Shipley, B. (2006). Net assimilation rate, specific leaf area and leaf mass ratio: Which is most closely correlated with relative growth rate? A meta-analysis. *Funct. Ecol.* 20, 565–574.
- Shipley, B. (2015). *Cause and Correlation in Biology: A User's Guide to Path Analysis, Structural Equations and Causal Inference* (Cambridge University press, Cambridge, UK).
- Shipley, B., De Bello, F., Cornelissen, J.H.C., Laliberté, E., Laughlin, D.C., and Reich, P.B. (2016). Reinforcing loose foundation stones in trait-based plant ecology. *Oecologia* 180, 923–931.
- Silvertown, J., Araya, Y., and Gowing, D. (2015). Hydrological niches in terrestrial plant communities: A review. *J. Ecol.* 103, 93–108.
- Tyree, M.T. (2007). Chapter 6 : Water Relations and Hydraulic Architecture. In *Functional Plant Ecology*, Second Edition, F.I. Pugnaire, and F. Valladares, eds. (CRC Press, New York, USA.), pp. 175–211.
- Venables, W.N., and Ripley, B.D. (2002). *Modern Applied Statistics with S.* (Springer, New York, USA).
- Violle, C., Navas, M.-L., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I., and Garnier, E. (2007). Let the Concept of Trait Be Functional! *Oikos* 116, 882–892.

- Weiher, E., van der Werf, A., Thompson, K., Roderick, M., Garnier, E., and Eriksson, O. (1999). Challenging Theophrastus: A common core list of plant traits for functional ecology. *J. Veg. Sci.* 10, 609–620.
- Wright, I.J., Reich, P.B., Westoby, M., Ackerly, D.D., Baruch, Z., Bongers, F., Cavender-bares, J., Chapin, T., Cornelissen, J.H.C., Diemer, M., et al. (2004). The worldwide leaf economics spectrum. *Nature* 428, 821–827.
- Wright, S.J., Machado, J.L., Mulkey, S.S., and Smith, A.P. (1992). Drought acclimation among tropical forest shrubs (*Psychotria*, *Rubiaceae*). *Oecologia* 89, 457–463.

Chapitre 4

-

TESTING A PREDICTIVE MODEL OF HERBACEOUS SPECIES' OCCURRENCE ALONG A GRADIENT OF WATER AVAILABILITY : FROM EXPERIMENTATION TO NATURE.

Description de l'article et contribution

Dans les articles précédents (Chapitres 2 et 3), nous avons construit un modèle permettant de prédire la présence d'espèces herbacées le long d'un gradient d'hydrologie du sol. Ce modèle est basé sur des expériences en conditions contrôlées. L'objectif de cet article est de tester la fiabilité du modèle construit précédemment en le confrontant à des observations acquises en conditions naturelles. Plus précisément, nous cherchons à savoir si l'on peut prédire les abondances et les distributions des espèces à partir de leurs traits morpho-anatomiques.

Nos résultats montrent que le modèle construit dans l'article précédent ne donne pas de bonnes prédictions si l'on utilise des traits morpho-anatomiques mesurés en conditions naturelles. Ces résultats confirment, au moins partiellement, l'hypothèse que la distribution des espèces sur un gradient hydrologique peut être prédite à partir de leurs traits de tolérance à la sécheresse eux-mêmes prédits par leurs traits morpho-anatomiques.

Dans cet article, j'ai élaboré le dispositif expérimental avec l'aide de Bill Shipley. J'ai réalisé la prise de données avec l'aide de Diana Soriano, Yuanzhi Li, Alexandra Arès Bruneau et Stéphanie Blanchette. Les analyses d'images ont été réalisées par Daniel Garneau pour les feuilles, Chiara Chelo et Mathias Gagnon-Barbin pour les stomates. J'ai choisi et réalisé les analyses statistiques avec l'aide de Bill Shipley et François Rousseu. J'ai rédigé l'intégralité du texte principal. Bill Shipley, François Rousseu et Françoise Cardou ont fourni des commentaires sur les versions précédentes de l'article. Parce que cet article utilise les conclusions de l'article précédent (chapitre 3), il ne pourra être soumis qu'une fois l'article précédent accepté. Cet article va être soumis au journal scientifique « Journal of Vegetation Science » bien que certaines modifications pourraient être ajoutées.

Testing a predictive model of herbaceous species' occurrence along a gradient of water availability: from experimentation to nature.

Belluau M. and Shipley B.

Abstract

Background and Aims. Variation in soil water availability is one of the major environmental gradients along which plant species are differentially distributed, and different species occupy different hydrological (realized) niches (Araya *et al.*, 2011). An attempt to build a model predicting species' hydrological niche using their functional traits was done by Belluau and Shipley (*in prep.*). They focused on the water availability gradient and used performance and water economy physiological functional traits along this gradient to predict species habitat hydrological preferences *in situ*. The aim of this study is to test the reliability of the model developed by Belluau and Shipley (*in prep.*) and see if the model make good predictions of species' realized soil hydrological niche.

Methods. To answer this question, we did vegetation inventories and trait measurements on plants growing in natural communities. At each site, we measured a suite of physical variables related to hydrological properties, species abundances and morpho-anatomical functional traits in order to compare the observed presence of species *in situ* to the model predicted species presence on the soil hydrological gradient.

Key Results. We compared the observed and predicted presence of each species on each soil wetness group using the Sørensen index (Ind_{Sor}). The model shows good predictions for intermediate soil wetness prediction ($Ind_{Sor} = 0.63$). The model predictions were less conclusive for on dry soil wetness ($Ind_{Sor} = 0.5$) and were simply wrong for the wet soil wetness predictions ($Ind_{Sor} = 0.0$). Model predictions were poorer when based on the community-weighted trait values.

Conclusions. The model that we tested here didn't make good predictions at species level. Except for intermediate soil wetness, the model doesn't give good prediction for dry soil nor wet soil wetness. The model poor predictive power is due to intrinsic limitations. Those limitations, narrowing the differences between species and between sites, lead to a lower model predictive power.

Introduction

A basic assumption of trait-based ecology is that morphological, physiological or phenological traits determine whole-plant attributes related to individual performance (growth, reproduction, survival) in a given environment, which, in turn, determine the demographic performance of species in that environment (Violle *et al.*, 2007). Through the process of trait filtering during community assembly (Keddy, 1992; Shipley, 2010), the differential performance of each species in the species pool translates into different species distributions along environmental gradients. The very first level of environmental filtering is a non-directional evolutionary and biogeographic selection, i.e. geographical barriers (mountain, river, sea), the evolutionary histories of species, different migratory capacities, speciation or local extinctions. This filtering defines the regional species pool and these species then undergo abiotic and biotic filtering. The abiotic filter is a set of local abiotic environmental constraints, i.e. climate (rainfall, temperature), resources (water, nutrients), non-resource stresses, perturbations. Abiotic filtering selects species that can tolerate local environmental abiotic conditions. The third level of filtering is the biotic filter that corresponds to positive (i.e. facilitation and mutualisms) and negative intra- and interspecific interactions (i.e. competition) between plants but also between plant and animal, viruses and bacteria (i.e. herbivory and parasitism) (Lortie *et al.*, 2004).

These different levels of filtering can also be related to the definition of ecological niches. Hutchinson (1957) defines an ecological niche as a hypervolume where each dimension of space represents a resource (nutrients, light, water) or a condition of the environment (temperature, precipitation, acidity, etc.). When a species is not subject to any biotic interaction, the volume defined by its resource and environmental requirements is called its fundamental niche. When

different species interact, it alters the fundamental niche of a species and become the realized niche. The abiotic filter selects species and traits based on climate, resources, perturbations and stress, in the absence of a competitor, and is therefore related to the fundamental niche of a species. The biotic filter selects species and traits in the presence of competitors (positive and negative intra- and interspecific interactions), and is therefore related to the realized niche. It is generally accepted that the realized niche is smaller than the potential niche. However, the link between the two niches and the way those niches react to changes in environmental conditions or species richness is still under investigation (Li *et al.*, *in press.* ; Hofmann *et al.*, 2013).

Variation in soil water availability is one of the major environmental gradients along which plant species are differentially distributed, and different species occupy different hydrological (realized) niches (Araya *et al.*, 2011). In the context of gradients in soil water availability, the realized hydrological niches would be determined by trade-offs in functional traits that are involved in the water economy of a plant and are implicated in determining plant performance along this environmental gradient (Silvertown *et al.*, 2015). However, soil water availability is an environmental variable that is highly variable in both space and time and is determined by precipitation patterns, local topography, soil structure and spatial and temporal variation in the depth of the water table (Silvertown *et al.*, 2015). An actual quantification of realized hydrological niches for many species spanning the hydrological gradient would therefore require detailed and repeated measurements of these physical properties over large spatial scales. In practice, because of the difficulty of such quantification of realized hydrological niches, this is almost never done. A way to circumvent this issue is to predict species' hydrological niche using their functional traits. Belluau and Shipley (*in prep.*) attempted to build this predictive model by focusing on the water availability gradient and using performance and water economy physiological functional traits along this gradient to predict species habitat hydrological preferences *in situ*.

The model that we test here was built with a response variable which is an ordinal classification of soil hydrology (wet, intermediate, dry) based on the typical habitat soil wetness of a given species. This classification was constructed using a combination of local floras, international databases, and Ellenberg indices, among other sources (USDA ; TRY, Kattge *et al.*, 2011 ; Marie-Victorin *et al.*, 2002 ; Ellenberg, 1988). These data all refer to species' *in situ* information

which means the classification is related to the realized niche, not the fundamental niche. All information details are reported in Table B.1 (ANNEXES B). Conversely, the model's predictor variables (functional traits) were on plants grown alone and without competitors (intra- and interspecific competitors). Physiological variables (hard traits) were measured on plants grown alone in stressful (drought) conditions or at field capacity. These hard traits are related to the fundamental physiological response of plants to drought. The morpho-anatomical traits (soft traits) were measured on plants growing alone in well-watered conditions and are related to the fundamental morphological response of plants to "optimal" conditions. The model requires species level mean values of five morpho-anatomical traits (specific leaf area (SLA), leaf nitrogen content (LNC), leaf dry matter content (LDMC), stomatal area (stom_{area}) and specific root length (SRL)).

The aim of this study is to test the reliability of the model developed by Belluau and Shipley (*in prep.*) and see if the model make good predictions of species' realized soil hydrological niche. To answer this question, we did vegetation inventories and trait measurements on plants growing in natural communities. At each site, we measured a suite of physical variables related to hydrological properties, species abundances and morpho-anatomical functional traits in order to compare the observed presence of species *in situ* to the model predicted species presence on the soil hydrological gradient.

Material and Methods

Study sites and soil wetness descriptors.

All 13 sites are within 30 km around the city of Sherbrooke (Qc, Canada ; 45.4733-45.2006° N ; -71.7417 - -72.149° W). The area has a temperate cold climate without marked summer drought. Average yearly rainfall is 930 mm and is relatively equally distributed throughout the year. The summer average maximum temperature is +24°C (June to September). Elevation of the sites ranges from 244 to 302 m. The 13 sites were selected to span a soil hydrological gradient of water availability. All sites are open, dominated by herbaceous vegetation, and

experience varying levels of disturbance. The range of soil water availability between these sites is determined primarily by differences in the water-holding capacity of the soil, not differences in precipitation patterns.

Sites environmental descriptors. At each site, soils were characterized using textural, hydrological and chemical descriptors. Three soil cores (5 cm diameter x 15 cm deep) were taken using a Dutch auger on each site at the beginning, middle and end of a single (5m to 20m) transect and pooled together. Material was first sieved to separate the soil portion below 2 mm. We then obtained sites soil rockiness as the ratio of dry weight of particles above and below 2 mm. Soil texture below 2 mm was assessed using a tactile evaluation (Saucier *et al.*, 1994). These soil textures then converted to the proportions of sand, silt and clay percentage based on the soil textural triangle, as given by Saucier *et al.* (1994). Soil nitrogen and carbon content were obtained by dry combustion (Vario Macro, Elementar analysensystem GmbH, Haan, Germany). Organic matter content was measured as loss-on-ignition using a muffle furnace at 400 °C for 6 hours (Ney 2-1350 Series II, J.M. Ney Company, Bloomfield, CT, USA). For each field site, *in situ* soil volumetric water content was measured twice (May and July 2014) using soil dielectric permittivity measurements (HydroSense II probe, Campbell Scientific, Edmonton, AB, Canada). We took three readings per site at the beginning end and in the middle of the transect. Measurements for all sites were taken two days after the last rain. We used the average water content value per site, measured at the two sampling dates, to reduce intra-site spatial and temporal variability.

Study species and species abundances. The abundance of each species of herbaceous dicot was estimated using the point-transect method. Since the model we use is limited to herbaceous dicots, we focused only on these species in the species abundance calculation. At each site, one transect was deployed while minimize site soil heterogeneity. Transect length was either 5, 10, 15 or 20 metres depending on the density of herbaceous species. Every 10 cm along the transect, using a thin metallic pole, we recorded each contact between the pole and each individual of herbaceous dicots. At each site, we identified the three most abundant herbaceous dicot species.

Species trait measurements

Once the three most abundant herbaceous species were identified, three individuals per species were harvested on each site to measure functional traits. In total, we identified 19 dominant species of herbaceous dicots from 6 different families (Table 4.1). We measured traits on leaves of these 19 species supplied with non-limiting water. All traits in this study were measured using the protocols found in Cornelissen *et al.* (2003), Pérez-Harguindeguy *et al.* (2013) and PrometheusWiki web site (Sack *et al.*, 2010; http://prometheuswiki.publish.csiro.au/tiki-custom_home.php) and are reported in Table 4.2. For all leaf traits, we excluded the petioles because petioles don't serve the same function as the leaf blade (i.e. support and orientation for petioles and light acquisition for leaf blades). Leaves were chosen to be representative of the average mature leaf with full exposure to sunlight and no sign of herbivory or senescence. Leaf dry matter content (LDMC, g g^{-1}) was measured as the ratio between the dry mass on the fresh mass of all leaves. Specific leaf area (SLA, $\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$) was measured as the ratio between leaf area and dry mass of all leaves. Leaf area was measured using a scanner and analyzed using the imaging software Fiji (Schindelin *et al.*, 2012). Leaf nitrogen content (LNC, mg g^{-1}) was measured by dry combustion (Vario Macro, Elementar analysensystem GmbH, Haan, Germany). Stomatal area ($\text{Stom}_{\text{area}}$, μm^2) was calculated by approximating the stomate as an ellipse: $\text{area} = (\pi/2) (\text{stomatal length}) (\text{stomatal width})$. Leaf imprints were first obtained by placing clear nail polish on the underside of a leaf. The imprints were then digitalized using a microscope with an objective lens (Microscope : Axio Observer Z1; Lens : Zeiss 20x/0.8 Plan-Apochromat, Zeiss 40x/0.95 Plan-Apochromat : Camera : Zeiss AxioCam 506 mono ; Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany).

Table 4.1 : Species list with life cycle, orders and families. Taxonomic nomenclature follows the International Plant Names Index (2016), <http://www.ipni.org> (accessed 14 November 2016).

Species name	Life cycle	Order	Family
<i>Euthamia graminifolia</i> (L.) Nutt.	Perennial	Asterales	Asteraceae
<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>americana</i> (Porter) Staudt	Perennial	Rosales	Rosaceae
<i>Galium mollugo</i> L.	Annual	Gentianales	Rubiaceae
<i>Lotus corniculatus</i> L.	Perennial	Fabales	Fabaceae
<i>Lysimachia ciliata</i> L.	Perennial	Ericales	Primulaceae
<i>Medicago lupulina</i> L.	Annual / Bisannual	Fabales	Fabaceae
<i>Melilotus albus</i> Medik.	Annual / Bisannual	Fabales	Fabaceae
<i>Pilosella caespitosa</i> (Dumort.) P.D.Sell & C.West	Perennial	Asterales	Asteraceae
<i>Pilosella floribunda</i> (Wimm.T.Grab.) Arv.-Touv.	Perennial	Asterales	Asteraceae
<i>Pilosella officinarum</i> Vaill.	Perennial	Asterales	Asteraceae
<i>Plantago major</i> L.	Perennial	Lamiales	Plantaginaceae
<i>Potentilla simplex</i> Michx.	Perennial	Rosales	Rosaceae
<i>Scorzoneroideis autumnalis</i> (L.) Moench	Perennial	Asterales	Asteraceae
<i>Silene vulgaris</i> (Moench) Garecke	Perennial	Caryophyllales	Caryophyllaceae
<i>Solidago canadensis</i> L.	Perennial	Asterales	Asteraceae
<i>Solidago juncea</i> Aiton	Perennial	Asterales	Asteraceae
<i>Taraxacum campylodes</i> G.E.Haglund	Perennial	Asterales	Asteraceae
<i>Trifolium pratense</i> L.	Perennial	Fabales	Fabaceae
<i>Vicia cracca</i> L.	Perennial	Fabales	Fabaceae

The pictures were taken along both sides of the mid-rib in the middle of the leaf. Stomatal length and width (μm) were estimated using the imaging software Fiji (Schindelin *et al.*, 2012) by measuring the guard cells maximum length and width. Measures were taken for all stomates per image, two images per leaf and one leaf from two individuals per species (+/- 330 stomate measurements per species). We used the average value of all measurements per image per individual per species. For all traits, we used the average value of all individuals per species. For each trait, we also calculated the community weighted means (CWM) based on the relative abundances of the three dominant species of the site.

Table 4.2 : Mean values of SLA, LDMC, LNC and stomatal area for each of the 19 species and community weighted values of the 13 communities. (A) At species level. (B) At community level (using CWM at site level).

<i>(A) At species level</i>				
Species name	SLA	LDMC	LNC	stom _{area}
<i>Euthamia graminifolia</i>	13.3	0.34	19.6	405
<i>Fragaria vesca subsp. Americana</i>	15.0	0.36	16.5	102.
<i>Galium mollugo</i>	34.7	0.15	18.7	1084
<i>Lotus corniculatus</i>	22.6	0.18	27.7	228
<i>Lysimachia ciliata</i>	20.6	0.33	13.2	955
<i>Medicago lupulina</i>	38.4	0.26	28.5	111
<i>Melilotus albus</i>	17.3	0.21	34.7	219
<i>Pilosella caespitosa</i>	22.4	0.17	14.4	517
<i>Pilosella floribunda</i>	19.9	0.18	18.0	404
<i>Pilosella officinarum</i>	23.0	0.17	13.9	422
<i>Plantago major</i>	26.8	0.14	15.1	395
<i>Potentilla simplex</i>	19.0	0.33	17.0	239
<i>Scorzoneroides autumnalis</i>	26.1	0.11	25.9	507
<i>Silene vulgaris</i>	18.2	0.20	21.2	404
<i>Solidago canadensis</i>	15.1	0.33	20.8	346
<i>Solidago juncea</i>	11.8	0.35	14.4	290
<i>Taraxacum campylodes</i>	26.3	0.15	22.7	417
<i>Trifolium pratense</i>	22.6	0.21	34.2	101
<i>Vicia cracca</i>	20.6	0.26	33.7	426
<i>(B) At community level</i>				
Site	SLA	LDMC	LNC	stom _{area}
site01	22.12	0.19	20.8	483
site01'	20.5	0.21	31.2	269
site02	26.3	0.13	23.1	459
site03	17.6	0.32	20.0	141
site03'	25.5	0.20	20.0	327
site04	22.2	0.21	27.3	299
site05	17.0	0.22	32.8	240
site06	26.9	0.21	24.0	746
site08	16.2	0.33	18.3	533
site09	19.2	0.21	20.5	327
site11	25.6	0.23	32.8	130
site14	20.1	0.23	34.2	251
site15	25.3	0.28	20.6	193

Data analysis

Site wetness clustering. We first used a clustering method based on soil properties to classify sites along a soil wetness gradient. We used the sites mean volumetric water content for the growing season (VWV_{grow}), the site percentage of soil portion above 2 mm (%>2 mm) and the site percentage of sand (%sand) and silt (%silt) in the soil portion below 2 mm. These four soil variables were used in a clustering analysis using the kmeans function (package stats in R) with 3 requested clusters. We then used a principal component analysis (PCA) on the same soil variables and site clusters in order to assign each cluster to a relative soil wetness : dry, intermediate and wet.

Prediction of habitat affinities using predictive model for species and communities. Using the predictive model developed by Belluau and Shipley (*in prep.*), we calculate the predicted habitat of a species based on its morpho-anatomical functional traits. The model is in the form of a series of structured equations (Shipley, 2015) in which the value of each endogenous variable is determined as a linear function of its direct causes. Since the exogenous variables in the model are all morpho-anatomical traits, which are linked to the predicted soil wetness affinities of each species through mediating effects of physiological traits, one can obtain the predicted habitat affinities given only the exogenous morpho-anatomical variables, using the rules of path analysis (Shipley, 2015). Therefore, using the morpho-anatomical traits measured on the species of each site and the causal structure given in Belluau and Shipley (*in prep.*), we calculated predicted wetness habitat affinity of each species, i.e. the presence of the given species on dry, intermediate or wet sites. Since we were not able to obtain the specific root length traits (extracting each species individual's roots *in situ* wasn't possible), we used the same specific root length mean traits value for all the species. Since the same value is used for all species, the SRL have the same causal effect for all species. This mean value was obtained from the original model built by Belluau and Shipley (2017). In accordance with the model requirements, *in situ* traits values were standardized prior to the analysis, using the same standardization parameters used in the original model.

To predict the community predicted habitats, they used the same model but instead of using the species traits values, we used the community weighted means (CWM) of each site. For each species and community, we obtain a value bounded between 1 (dry) and 3 (wet). A species, or community, with a score between 1 and 1.49 is predicted as dry, between 1.51 and 2.49 predicted as intermediate and between 2.49 and 3 as wet.

Comparison between observed and predicted affinities for species and communities. Based on the vegetation survey on each site and the site observed wetness classification we created a species presence-absence matrix for each soil wetness group. Note that a species can be observed in one, two or three of the wetness groups. The observed presence of species is then compared with the predicted presences on each soil wetness. Since we only predict the presence of a species and not its absence on a given soil wetness, we used the “Sørensen index” to assess the similarity between the predicted presence and the observed presence, calculated as :

$$\text{Ind}_{\text{Sor}} = (2a) / (2a+b+c) \quad \text{equ.1}$$

With a being the sum of the species both predicted and observed, b being the sum of the species predicted but not observed and c being the sum of the species observed but not predicted (Legendre and Legendre, 2012). The Sørensen index is comprised between 0 and 1, 0 being complete dissimilarity and 1 being complete similarity between predicted and observed presence on a given soil wetness. The same calculation and similarity index is used for comparing predicted and observed communities.

We conducted all statistical analyses within the R statistical environment (version 3.1.2, R Core Development Team, 2015-12-04). Unless otherwise indicated, tests of differences between groups were done using Kruskal-Wallis test by rank (KW). If the groups differ significantly, then we tested the differences between groups using Wilcoxon Mann–Whitney test (WMW).

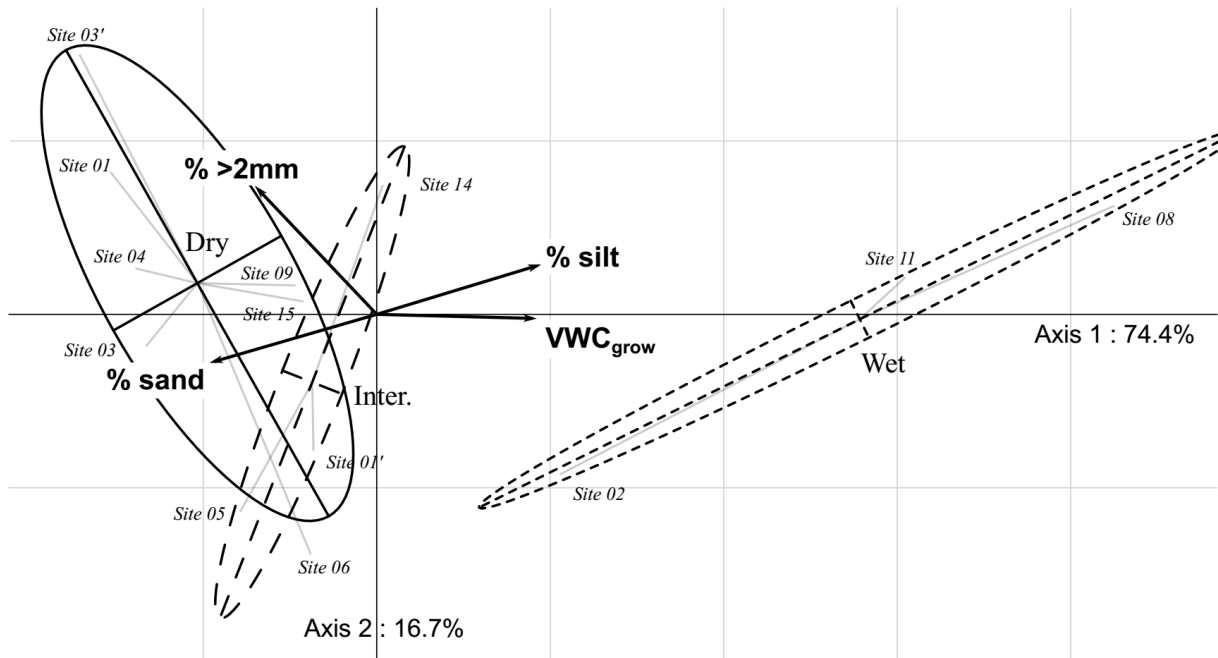


Figure 4.1 : Principal component analysis of the soil hydrological descriptors for each soil wetness group. The first axis explains 74.4 % and the second axis explains 16.7 % of the total variance, respectively. Ellipses represent the 75% confidence ellipse of each wetness group. The more these ellipses overlap, the less the groups are differentiated on the PCA axes. Solid grey lines are the distances between a site and the centroid of its corresponding group.

Results

Site wetness clustering

Using the *kmean* function, we created three groups of soil wetness, related to soil textural, hydrological and chemical descriptors. We obtained two groups, each containing three sites and a group of seven sites. The PCA (*dudi.pca* function in R, library *ade4*) shows that the groups are mostly differentiated along the first axis (74.3% of variance explained). This first axis is positively correlated with the volumetric water content and soil silt percentage, and negatively correlated with the percentage of sand (Fig. 4.1). The second axis (16.7% of variance explained)

is positively correlated with the proportion of soil particles above 2 mm. From this, we can associate each cluster with a soil wetness. Cluster 1 (7 sites) is related to dry sandy soil, cluster 3 (3 sites) to wet silty soil and cluster 2 (3 sites) to intermediate soils. Soil hydrological descriptors and derived soil wetness groups for each study site is reported in Table 4.3.

Table 4.3 : Soil hydrological descriptors and derived soil wetness groups for each study site.

VWC_{grow} is the sites mean volumetric water content for the growing season, %>2 mm is the site percentage of soil portion above 2 mm, % sand and % silt are the site percentage of sand and silt (in the soil portion below 2 mm). The soil wetness group is the groups created with the clustering analysis.

Site	VWC _{grow}	% >2 mm	% sand	% silt	Soil wetness group
site01	9.923	0.464	0.85	0.03	Dry
site01'	19.656	0.144	0.85	0.03	Inter.
site02	29.417	0.031	0.70	0.10	Wet
site03	4.656	0.259	0.85	0.03	Dry
site03'	12.644	0.603	0.85	0.03	Dry
site04	7.706	0.350	0.85	0.03	Dry
site05	17.907	0.121	0.95	0.00	Inter.
site06	13.478	0.020	0.85	0.03	Dry
site08	37.967	0.002	0.20	0.40	Wet
site09	6.751	0.240	0.70	0.10	Dry
site11	36.661	0.051	0.20	0.20	Wet
site14	23.370	0.365	0.70	0.10	Inter.
site15	6.878	0.221	0.70	0.10	Dry

Species trait values

Table 4.2A gives the mean values of SLA, LDMC, LNC and stomatal area for each of the 19 species. These are the morpho-anatomical traits that are exogenous variable in the prediction model of Belluau & Shipley (*in prep.*). Species mean traits of SLA and LDMC show no significant differences between species observed on different soil wetness group (KW). Observed dry species mean LNC value is significantly lower than observed intermediate species (WMW, $P = 0.015$). Stomatal area is significantly higher for observed intermediate species than for observed wet species (WMW, $P = 0.008$) but is not significantly different between other groups. Table 4.2B gives the community-weighted values of these traits measured in each site.

Observed presence of species and communities

Using the species inventories on the sites, we obtained the relative abundance of each dominant species on each site. From this species-site matrix, we calculated on which site a species is the most abundant. We observed 7 species on dry soils wetness only, 3 species on intermediate soil wetness only, and 4 species on wet soil wetness only. Table 4.2A gives the observed presence of each of the 19 dominant species in each of the three soil wetness groups. Only 3 species (over 19) were observed on two wetness groups and 3 species (over 19) were observed on the 3 wetness groups. For the communities, the observed soil wetness groups are the site classification according to the clustering analysis (Table 4.2B).

Predicted presence of species and communities

Based on their functional traits and the predictive model of habitat affinities (Belluau and Shipley, *in prep.*), we calculated the predicted habitat classification of each species. 7 species were predicted in dry soil wetness, 12 in intermediate soil wetness and none of the species were predicted in wet habitats (Table 4.4A). For the communities, the predicted habitats are calculated with the community weighted means of traits values of the three dominant species of a given site (Table 4.4B).

Comparison between observed and predicted presence for species and communities

For each soil wetness group separately, we compared the observed and predicted presence of each species using the Sørensen index (Table 4.5A). The model shows good predictions for the intermediate soil wetness group (Sørensen index = 0.63). The model predictions were less conclusive for on dry soil wetness group (Sørensen index = 0.5) and were simply wrong for the wet soil wetness group (Sørensen index = 0.0). Model predictions were poor when based on the community-weighted trait values (Table 4.4B). We also tested the predictions using the traits mean values per species per site (instead of using the trait mean value per species) but it gave the same results for 12 of the 13 sites.

Discussion

The model developed by Belluau and Shipley (*in prep.*) gives, for a species having particular value of the four morpho-anatomical traits, a predicted level of habitat soil wetness where that species is supposed to be most commonly observed *in situ*. The model predictions are based on calculation of physiological response traits to drought (called “hard” traits in Belluau and Shipley (*in prep.*)) using these morpho-anatomical traits (called “soft” in Belluau and Shipley (*in prep.*)). The predicted values of the physiological “hard” traits, given the soft traits, are then used to calculate the species (or community) predicted soil wetness group.

Table 4.4 : Observed and predicted presence on each soil wetness group. (A) For species. (B) For communities (using CWM at site level).

Species	<i>(A) At species level</i>					
	Predicted soil wetness group			Observed soil wetness group		
	Dry	Inter.	Wet	Dry	Inter.	Wet
<i>Euthamia graminifolia</i>	0	1	0	0	0	1
<i>Fragaria vesca subsp. americana</i>	0	1	0	1	0	0
<i>Galium mollugo</i>	1	0	0	1	0	0
<i>Lotus corniculatus</i>	0	1	0	0	1	0
<i>Lysimachia ciliata</i>	0	1	0	0	0	1
<i>Medicago lupulina</i>	0	1	0	1	0	1
<i>Melilotus albus</i>	0	1	0	1	1	1
<i>Pilosella caespitosa</i>	1	0	0	1	0	0
<i>Pilosella floribunda</i>	1	0	0	1	0	0
<i>Pilosella officinarum</i>	1	0	0	1	0	0
<i>Plantago major</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Potentilla simplex</i>	0	1	0	1	0	0
<i>Scorzoneroides autumnalis</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Silene vulgaris</i>	0	1	0	0	1	0
<i>Solidago canadensis</i>	0	1	0	1	1	1
<i>Solidago juncea</i>	0	1	0	1	0	0
<i>Taraxacum campylodes</i>	1	0	0	1	0	1
<i>Trifolium pratense</i>	0	1	0	1	1	1
<i>Vicia cracca</i>	0	1	0	1	1	0
Site	<i>(B) At community level</i>					
	Predicted soil wetness group			Observed soil wetness group		
	Dry	Inter.	Wet	Dry	Inter.	Wet
site01	0	1	0	1	0	0
site01'	0	1	0	0	1	0
site02	1	0	0	0	0	1
site03	0	1	0	1	0	0
site03'	0	1	0	1	0	0
site04	0	1	0	1	0	0
site05	0	1	0	0	1	0
site06	0	1	0	1	0	0
site08	0	1	0	0	0	1
site09	0	1	0	1	0	0
site11	0	1	0	0	0	1
site14	0	1	0	0	1	0
site15	0	1	0	1	0	0

Table 4.5 : Sørensen index on each soil wetness group. (A) Comparison for species. (B) Comparison for communities. Sørensen index value of zero means total dissimilarity, while a value of one means total similarity.

<i>(A) At species level</i>								
For dry soil wetness			For intermediate soil wetness			For wet soil wetness		
	Obs=1	Obs=0		Obs=1	Obs=0		Obs=1	Obs=0
Pred=1	a=5	b=2	Pred=1	a=6	b=6	Pred=1	a=0	b=0
Pred=0	c=8	IndSor=0.5	Pred=0	c=1	IndSor=0.63	Pred=0	c=9	IndSor=0.0
<i>(B) At community level</i>								
For dry soil wetness			For intermediate soil wetness			For wet soil wetness		
	Obs=1	Obs=0		Obs=1	Obs=0		Obs=1	Obs=0
Pred=1	a=0	b=1	Pred=1	a=3	b=9	Pred=1	a=0	b=0
Pred=0	c=7	IndSor=0.0	Pred=0	c=0	IndSor=0.4	Pred=0	c=3	IndSor=0.0

Model predictions don't follow the observations

The model that we tested here didn't make good predictions at species level. Except for intermediate soil wetness (IndSor= 0.63), the model doesn't give good prediction for dry soil nor wet soil wetness (IndSor=0.5 and 0.0 respectively). Regarding the comparison between observed and predicted presence at community level, the model gives bad predictions for all soil wetness (IndSor = 0.0 ; 0.4 and 0.0 ; for dry, intermediate and wet soil wetness respectively). The best model predictions are regarding the intermediate soil wetness predictions, with a Sørensen index of 0.63 which means that the model gave good predictions for only one prediction over two. The model produce often false positive and false negative predictions (i.e. predicted but not observed and not predicted but observed).

Limits and perspectives of the model

There are at least five limits to the model that could explain its poor predictive ability. The first limit is the fact that we couldn't measure the SRL values of our species and use these values

when obtaining the model predictions of the soil wetness group. Instead, we used the mean specific root length (SRL) value for the species in Chapter 2. Following the leaf economic spectrum findings (i.e. a strong correlation between leaf traits conserved among biomes and plant types), several studies have focused on the relationship between traits related to different parts of the plants. This whole-plant economic spectrum hypothesis was studied by Kramer-Walter *et al.* (2016), who found that the SRL trait wasn't correlated to the leaf economic spectrum in a context of a fertility gradient (soil nutrient availability being often related to soil water availability). The lack of the SRL traits (or rather the use of the same mean value for all species) would reduce the differences among species and create a “converging effect” leading to different species having more chance to be predicted in the same group.

A second limit of the model is that it assumes that field distribution of species is determined primarily by its hydrological niche. We took the species' presence on each site and positioned the sites based solely on the hydrological gradient. We then try to predict the species' presence with the model. However, the presence of a species on a given site is the consequence of several causes other than hydrological niche segregation. The predictive model of Belluau and Shipley (*in prep.*) was built to predict the presence of species on the soil wetness gradient based on traits measure in controlled conditions. Beside the wetness treatment, all the other sources of environmental variations were maintained constant throughout the experiment, which means that the traits selected by Belluau and Shipley (*in prep.*) responded to water availability only. When using *in situ* species' functional traits, these trait values would have responded to all environmental conditions, not just to soil water availability. In reality, the study species were not filtered solely based on soil water availability. All the other gradients, such as temperature, light, nutrients, site openness, local and regional fragmentation, anthropization, plays an important role in community assembly. These potential sources of environmental variation create some noise, some variability we cannot account for in the observed species presences. Recent studies (Moles *et al.*, 2014; Amatangelo *et al.*, 2014) have shown that functional traits can be correlated more or less to different environmental gradients. Moles *et al.* (2014) found that functional traits correlated more strongly with temperature than with precipitation at least over large spatial gradients.

A third limitation of the model is in the imprecise way in which the hydrological gradient is defined. As described in Belluau and Shipley (2017), species positions along the gradient of soil water availability is overwhelmingly given by rather vague habitat descriptions (Table B.1, ANNEXES B). For instance, our “dry”, “intermediate” and “wet” groups mostly correspond to Ellenberg’s moisture indices of (2-4), (4-6) and (6-8). An Ellenberg value of 3 (dry soil) is defined as soils that are “more often dry than moist”, an Ellenberg value of 5 (intermediate soil) is defined as habitats having “fresh soils of average dampness” while an Ellenberg value of 7 (wet soil) is defined as habitats having soils that are “constantly moist or damp, but not wet” (ANNEXES D, supplementary material). While these habitat descriptions do approximately agree with our classification in this paper, there is obviously a substantial degree of subjectivity involved.

The fourth limitation of the model is related to the way Belluau and Shipley (*in prep.*) constructed the model. The model’s traits (both “soft” and “hard”) were measured on individuals that grew without competitors, i.e. neither intra- nor interspecific competition. This means the traits used were related to species fundamental niches more than to their realized niches. However, the soil wetness groups were defined according to the realized niche of species using various databases (USDA ; TRY, Kattge *et al.*, 2011) floras (Marie-Victorin *et al.*, 2002) and Ellenberg indices (Ellenberg, 1988). These sources report information on species *in situ*, which means the presence of a species on a given site is the consequence of both abiotic and biotic filtering. The model thus tries to predict realized species presence based on fundamental traits. In this study, we use the model as constructed by Belluau and Shipley (*in prep.*) but, we give to the model the values of functional traits of individuals measured *in situ*. Since *in situ* species’ trait values are the consequence of species’ response to competition, facilitation and other positive and negative species interactions (biotic filter), and the environment (abiotic filter), the traits values are related to the realized niche. This major difference could explain the differences between observed and predicted soil wetness groups. Unfortunately, our study doesn’t allow us to measure the actual difference between the realized and fundamental niches. However, several authors (Li *et al.*, *in press.*; Hofmann *et al.*, 2013) focused on the quantification of the links between the two niches and the way those niches react to changes in environmental conditions or species richness.

The fifth limitation of our study is that we used community-weighted means (CWM) to test our model at community level. There is a debate on the use and limitation of CWM regarding the detection of the link between traits and environment. Authors like Peres-Neto *et al.* (2017) showed that, in simulated randomized dataset, some spurious correlation could arise. Other authors raised the question of the “optimality” of the CWM (Muscarella and Uriarte, 2017). They wonder if species-mean trait values could obscure the contribution and consequences of intraspecific variation to functional diversity patterns (Peres-Neto *et al.*, 2017 ; Violle *et al.*, 2012). These authors studied the effect and consequences of the inclusion of intraspecific variation into community assembly and found several limitations. The CWM traits values don’t account for intraspecific variability, both in space and time. A species could have two alternative strategies existing at the same time caused by some fluctuating environmental conditions maintaining two populations in two different “optimal” trait values (Muscarella and Uriarte, 2017). This debate raises the issue that CWM don’t account for diverging and converging effects on the assembly and need to be complemented with information about the inter- and intra-specific variation partitioning and the moments of species’ traits distributions (median, variance, skewness, kurtosis) (Le Bagousse-Pinguet *et al.*, 2014).

However, in our study, we do not expect intraspecific trait variation to change the overall conclusions since the species abundances are accounted only for the three dominant herbaceous species, instead of the whole community (or herbaceous strata), and for only three individuals per species, which is insufficient to calculate species’ traits distribution.

Knowing these intrinsic constraints, we need to take species interactions into account in the model to obtain better predictions. As stated by Kunstler *et al.* (2014), we need to disentangle the relative importance of biotic and abiotic filters. To do that, we need to investigate the species response to abiotic filters, biotic filters and the interaction of the two filters since they can occur simultaneously with antagonistic and synergistic effect at the same time. The model that we tested here, despite its poor predictive ability, furnishes an interesting conceptual approach to the prediction of plant species realized hydrological niche.

References

- Amatangelo, K.L., Johnson, S.E., Rogers, D.A., and Waller, D.M. (2014). Trait-environment relationships remain strong despite 50 years of trait compositional change in temperate forests. *Ecology*.
- Araya, Y.N., Silvertown, J., Gowing, D.J., McConway, K.J., Peter Linder, H., and Midgley, G. (2011). A fundamental, eco-hydrological basis for niche segregation in plant communities. *New Phytol.* *189*, 253–258.
- Belluau, M., and Shipley, B. (2017). Predicting habitat affinities of herbaceous dicots to soil wetness based on physiological traits of drought tolerance. *Ann. Bot.* *119*, 1073–1084.
- Cornelissen, J.H.C., Lavorel, S., Garnier, E., Diaz, S., Buchmann, N., Gurvich, D.E., Reich, P.B., ter Steege, H., Morgan, H.D., van der Heidjen, M.G. a, et al. (2003). A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Aust. J. Bot.* *51*, 335–380.
- Ellenberg, H. (1988). *Vegetation Ecology of Central Europe*. (New Rochelle, New York : Cambridge University Press).
- Grime, J.P., Hodgson, J.G., and Hunt, R. (2007). *Comparative plant ecology: a functional approach to common British species*. 2nd edition (Castlepoint Press, Brough, UK.).
- Hofmann, M., Bütof, A., Welk, E., and Bruelheide, H. (2013). Relationship between fundamental and realized niches in terms of frost and drought resistance. *Preslia* *85*, 1–17.
- Hutchinson, G.E. (1957). Concluding remarks. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*
- Kattge, J., Díaz, S., Lavorel, S., Prentice, I.C., Leadley, P., Bönisch, G., Garnier, E., Westoby, M., Reich, P.B., Wright, I.J., et al. (2011). TRY - a global database of plant traits. *Glob. Chang. Biol.* *17*, 2905–2935.
- Keddy, P.A. (1992). A pragmatic approach to functional ecology. *Funct. Ecol.* *6*, 621–626.
- Kramer-Walter, K.R., Bellingham, P.J., Millar, T.R., Smissen, R.D., Richardson, S.J., Laughlin, D.C., and Mommer, L. (2016). Root traits are multidimensional: specific root length is independent from root tissue density and the plant economic spectrum. *J. Ecol.* *104*.

- Kunstler, G., Lavergne, S., Courbaud, B., Thuiller, W., Zimmermann, N.E., Kattge, J., and Coomes, D.A. (2014). Competitive interactions between forest trees are driven by species' trait hierarchy, not phylogenetic or functional similarity : implications for forest community assembly. *Ecol Lett.* *15*, 831–840.
- Le Bagousse-Pinguet, Y., De Bello, F., Vandewalle, M., Leps, J., and Sykes, M.T. (2014). Species richness of limestone grasslands increases with trait overlap: Evidence from within- and between-species functional diversity partitioning. *J. Ecol.* *102*, 466–474.
- Legendre, P., and Legendre, L. (2012). Chapitre 07 - Ecological resemblance. *Numer. Ecol.* *24*, 265–335.
- Li, Y., Shipley, B., Price, J.N., de L. Dantas, V., Tamme, R., Westoby, M., Siefert, A., Schamp, B.S., Spasojevic, M.J., Jung, V., et al. Habitat filtering determines the functional niche occupancy of plant communities worldwide. *J. Ecol.* n/a-n/a.
- Lortie, C.J., Brooker, R.W., Choler, P., Kikvidze, Z., Michalet, R., Pugnaire, F.I., and Callaway, R.M. (2004). Rethinking plant community theory. *Oikos* *107*, 433–438.
- Marie-Victorin, F., Rouleau, E., and Brouillet, L. (2002). Flore laurentienne 3ème édition (Boucherville, Québec).
- Moles, A.T., Perkins, S.E., Laffan, S.W., Flores-Moreno, H., Awasthy, M., Tindall, M.L., Sack, L., Pitman, A., Kattge, J., Aarssen, L.W., et al. (2014). Which is a better predictor of plant traits: Temperature or precipitation? *J. Veg. Sci.* *25*, 1167–1180.
- Muscarella, R., and Uriarte, M. (2016). Do community-weighted mean functional traits reflect optimal strategies? *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* *283*, 20152434.
- Pérez-Harguindeguy, N., Díaz, S., Garnier, E., Lavorel, S., Poorter, H., Jaureguiberry, P., Bret-Harte, M.S., Cornwell, W.K., Craine, J.M., Gurvich, D.E., et al. (2013). New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. *Aust. J. Bot.* *61*, 167–234.
- Peres-Neto, P.R., Dray, S., and tee Braak, C.J.F. (2017). Linking trait variation to the environment: critical issues with community-weighted mean correlation resolved by the fourth-corner approach. *Ecography* *40*, 806–816.
- R Core team (2015). R Core Team. R A Lang. Environ. Stat. Comput. R Found. Stat. Comput., Vienna, Austria. URL <http://www.R-Project.org/>. *55*, 275–286.

- Sack, L., Cornwell, W.K., Santiago, L.S., Barbour, M.M., Choat, B., Evans, J.R., Munns, R., and Nicotra, A. (2010). A unique web resource for physiology, ecology and the environmental sciences: PrometheusWiki. *Funct. Plant Biol.* 37, 687–693.
- Saucier, J.-P., Berger, J.-P., D'Avignon, H., and Racine, P. (1994). Le point d'observation écologique (Normes techniques).
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682.
- Shipley, B. (2010). *From Plant Traits to Vegetation Structure* Plant (Cambridge: Cambridge University Press).
- Shipley, B. (2015). *Cause and Correlation in Biology: A User's Guide to Path Analysis, Structural Equations and Causal Inference* (Cambridge University press, Cambridge, UK.).
- Silvertown, J., Araya, Y., and Gowing, D. (2015). Hydrological niches in terrestrial plant communities: A review. *J. Ecol.* 103, 93–108.
- Violle, C., Enquist, B.J., McGill, B.J., Jiang, L., Albert, C.H., Hulshof, C., Jung, V., and Messier, J. (2012). The return of the variance: Intraspecific variability in community ecology. *Trends Ecol. Evol.* 27, 244–252.
- Violle, C., Navas, M.-L., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I., and Garnier, E. (2007). Let the Concept of Trait Be Functional! *Oikos* 116, 882–892.

Chapitre 5

-

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Contexte

Au cours de ce doctorat, mon objectif général est d'identifier les traits fonctionnels morphologiques, anatomiques et physiologiques de tolérance à la sécheresse qui peuvent prédire la présence des espèces le long d'un gradient d'hydrologie des sols. Nous avons vu dans les chapitres précédents que nous avons rempli les objectifs de l'étude. Dans le chapitre 2, nous avons montré qu'il était possible de prédire la distribution des espèces sur un gradient d'hydrologie des sols (Objectif 1, Fig. 1.6) à partir de cinq traits physiologiques de tolérance à la sécheresse. Ces cinq traits sont la photosynthèse nette maximale, la conductance stomatique maximale, le potentiel hydrique du sol au point de flétrissement, la conductance stomatique au point de flétrissement et l'efficacité d'utilisation de l'eau au point de flétrissement. Dans le chapitre 3, nous avons montré (objectif 2, Fig. 1.6) que les traits physiologiques de tolérance à la sécheresse sont prédits par les traits morpho-anatomiques en conditions optimales. Nous avons montré (objectif 3, Fig. 1.6) que les traits morpho-anatomiques seuls ne sont pas de bons prédicteurs de l'hydrologie des espèces et (objectif 4, Fig. 1.6) que la séquence « traits morpho-anatomiques → traits physiologiques → hydrologie des espèces » donne les meilleures prédictions. Dans le chapitre 4, nous avons montré (objectif 5, Fig. 1.6) que le modèle construit dans le chapitre 3 ne donne pas de bonnes prédictions si l'on utilise des traits morpho-anatomiques mesurés en conditions naturelles. Ces résultats confirment, au moins partiellement, l'hypothèse que la présence des espèces sur un gradient hydrologique peut être prédite à partir de leurs traits de tolérance à la sécheresse eux-mêmes prédits par leurs traits morpho-anatomiques.

En résumé, nous avons utilisé une approche fonctionnelle en construisant un modèle prédictif qui nous a permis de nous intéresser aux mécanismes de filtrage environnementaux et plus

précisément au rôle de la niche hydrologique des espèces dans l'assemblage des communautés végétales. La construction de ce modèle s'accompagne cependant de certaines limitations décrites ultérieurement.

Prédire les habitats d'espèces sur un gradient hydrologique à partir de leurs traits physiologiques

Au cours de la première partie de ce doctorat (objectif 1, Fig. 1.6), nous nous sommes intéressés aux relations entre les traits physiologiques et la distribution des espèces sur un gradient d'hydrologie du sol. En considérant la hiérarchie des traits décrits par Chapin III *et al.* (1993) et Silvertown *et al.* (2015), nous nous attendions :

- À ce que les traits physiologiques d'échanges gazeux au niveau de la feuille soient liés aux présences des espèces sur le gradient hydrologique

Les traits physiologiques de tolérance à la sécheresse prédisent les préférences d'habitat

Dans le chapitre 2 (Belluau et Shipley, 2017), nous avons montré (objectif 1, Fig. 1.6) que la présence des espèces le long du gradient hydrologique peut être prédite en utilisant cinq traits physiologiques (la photosynthèse nette maximale, la conductance stomatique maximale, le potentiel hydrique du sol au point de flétrissement, la conductance stomatique au point de flétrissement et l'efficacité d'utilisation de l'eau au point de flétrissement). Ce résultat confirme, au moins partiellement, l'hypothèse, avancée par des auteurs comme Silvertown ou Araya, que les traits physiologiques sont de bons prédicteurs de la niche hydrologique (Silvertown *et al.*, 2015 Araya *et al.*, 2011). Cependant, la réponse physiologique au stress n'est pas le seul mécanisme impliqué dans l'assemblage des communautés. Parmi les cinq traits physiologiques identifiés comme des causes de la présence des espèces, deux sont des traits mesurés au début de l'expérience (la photosynthèse nette maximale, la conductance stomatique maximale), avant que le stress ne soit installé. Ceci démontre que la survie d'une espèce donnée est déterminée non seulement par le comportement de ses individus lorsqu'ils subissent le stress mais aussi

lorsqu'ils ne le subissent pas encore. Les propriétés physiologiques des espèces en conditions d'existence « non-stressantes » conditionnent également les propriétés de l'espèce en conditions stressantes. Ainsi, une plante qui transpire beaucoup dans des conditions non-stressantes est également une plante qui subira plus fortement les stress. Et inversement, une espèce dont la transpiration est basse restera turgescente plus longtemps. Ce type de comportement rappelle le compromis de « safety/efficiency », qui sépare les stratégies des plantes entre le fait de continuer à fonctionner en conditions de stress (au détriment de l'efficacité) et le fait de fonctionner efficacement en pleine eau (au détriment du maintien de la conduction). Cette opposition entre sécurité et efficacité peut également être liée au compromis du spectre d'économie foliaire qui oppose des espèces conservatives à des espèces acquisitrices (Wright *et al.*, 2004). Alternativement, l'opposition entre efficacité en conditions de stress et en conditions normales peut aussi être mise en relation avec le triangle des stratégies de Grime (1977) où nos espèces se placeraient sur un gradient entre stress-tolérantes (S) et compétitrices (C).

Cette étude nous a permis d'obtenir une suite de traits physiologiques pertinents pour la répartition des espèces sur le gradient hydrologique. En effet, l'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE) discrimine les espèces capables de fonctionner dans des conditions stressantes (les espèces dont le WUE est positif), des espèces qui ne le sont pas (WUE négatif). De même, le potentiel hydrique du sol au point de flétrissement (Ψ_{wilt}) discrimine les espèces capables de conserver l'hydratation de leurs feuilles en cas de stress (Ψ_{wilt} très négatif), de celles qui ne le sont pas (Ψ_{wilt} négatif mais proche de zéro). Le trait de potentiel hydrique du sol au point de flétrissement peut ne pas sembler entrer dans le cadre des traits fonctionnels de par le fait qu'il soit lié au sol et non à la plante. En réalité, de jour, les potentiels hydriques du sol et de la feuille sont corrélés (Mitchell *et al.*, 2008a). De nuit, les potentiels hydriques du sol et de la feuille sont à l'équilibre (Daly *et al.*, 2004). Ainsi, dans une certaine mesure, nous pouvons considérer le potentiel hydrique du sol au point de flétrissement comme un indicateur relativement fiable (et non destructif) de l'état d'hydratation de la feuille au point de flétrissement.

Enfin, dans ce chapitre 2, nous avons mis à jour un aspect intéressant de la dynamique stomatique. Nous avons constaté que l'ensemble des espèces présentent un schéma commun de réponse stomatique à la diminution de la disponibilité en eau. La conductance stomatique maximum (g_s^{max}), mesurée avant que le stress ne s'installe, diminue progressivement à mesure

que le stress s'intensifie. Cette diminution, plus ou moins importante en fonction des espèces, continue jusqu'à un point d'inflexion (g_s^{inf}) à partir duquel la conductance stomatique chute jusqu'à un minimum (g_s^{min}), plus ou moins bas en fonction des espèces. On obtient donc un patron de diminution composé de deux pentes, une pente avant et une après le point d'inflexion. C'est la pente avant le point d'inflexion qui nous intéresse ici. Cette pente peut être considérée comme une représentation du contrôle stomatique exercé par la plante et constitue un lien avec les travaux en physiologie sur les deux stratégies de contrôle hydrique de la plante que sont l'isohydrie et l'anisohydrie. Les espèces isohydriques sont caractérisées par leur maintien du potentiel hydrique foliaire (Ψ_{feuille} stable) à mesure que les conditions environnementales changent, tandis que les espèces anisohydriques suivent les fluctuations environnementales de la disponibilité de l'eau (Ψ_{feuille} variable). La classification iso/anisohydrique est souvent interprétée en termes de comportement stomatique : les espèces isohydriques conservent une hydratation (Ψ_{feuille}) relativement stable de par un contrôle stomatique plus strict qui se traduit par une conductance stomatique plus faible mais plus stable au cours la diminution de la disponibilité en eau. Les espèces anisohydriques, qui régulent faiblement leur hydratation, ont également un contrôle stomatique moindre, se traduisant par des conductances stomatiques plus fortes et présentant des réductions avec la diminution de la disponibilité en eau (Jones, 2014 ; Tardieu et Simonneau, 1998). Dans notre étude, la classification iso/anisohydrique semble pertinente. Nos espèces de milieux secs présentent une faible conductance maximum, une diminution relativement faible (voire nulle) de la conductance stomatique avec l'intensification du stress et un maintien de la photosynthèse, ce qui les qualifierait d'espèces isohydriques. Inversement, nos espèces de milieux humides présentent une forte conductance maximum, une diminution relativement forte de la conductance stomatique avec l'intensification du stress et une disparition quasi totale de la photosynthèse, ce qui les qualifierait d'espèces anisohydriques. De plus, ces deux comportements sont aussi associés aux stratégies décrites dans le spectre économique foliaire (Wright *et al.*, 2004). Nos espèces isohydriques (de milieux secs) présentent des caractéristiques d'espèces conservatrices/stress-tolérantes alors que les espèces anisohydriques présentent des caractéristiques d'espèces acquiescentes/compétitives. Il faut toutefois noter que dans le cadre de notre étude, nous n'avons pas mesuré le potentiel hydrique

des feuilles au cours du stress et qu'ainsi nous ne pouvons pas classer nos espèces dans une stratégie ou une autre de façon catégorique.

Ajoutons à cela que l'opposition iso/anisohydrie est largement remise en cause par certains auteurs qui montrent l'existence de contre-exemples et d'approximations dans l'utilisation de ces concepts (Martinez-Vilalta et Garcia-Forner, 2016). Le premier point est que les espèces purement isohydriques ou anisohydriques sont rares et donc la grande majorité des espèces se situe quelque part entre les deux stratégies. Il n'existe pas encore, à ma connaissance, de moyen simple de quantifier le degré d'iso/anisohydrie d'une espèce. Un autre point est le fait que l'hydratation de la feuille (son potentiel hydrique, Ψ_{feuille}), n'est pas uniquement liée à la conductance stomatique. D'autres traits physiologiques, comme l'élasticité des parois cellulaires ou les concentrations intracellulaires en composés secondaires, jouent un rôle important dans le maintien du potentiel hydrique de la feuille. Ces points soulignent le besoin de mieux comprendre et de mieux définir les comportements iso/anisohydriques et leurs implications importantes pour la modélisation des réponses à la sécheresse, que ce soit à l'échelle des individus ou des écosystèmes.

L'apport des modèles prédictifs

Un des aspects originaux de ce doctorat est l'utilisation de deux types de modèles prédictifs. Dans un premier temps, nous avons utilisé une analyse par « cumulative link model » (CLM). Comme notre variable dépendante, la présence des espèces le long du gradient d'humidité du sol, est sous la forme d'une variable catégorielle ordonnée à trois niveaux (sec, intermédiaire ou humide), et que les variables explicatives sont les valeurs de trait de chaque espèce, nous devons utiliser une approche statistique par CLM (Christensen, 2015). Ce type d'analyse est une variante de régression logistique mais adaptée pour analyser des observations dépendantes ordinales (McCullagh, 1980). Ainsi, pour une combinaison de valeur de variables explicatives (nos traits physiologiques), le modèle attribue une probabilité à chaque espèce d'être dans une classe donnée. Dans un deuxième temps, nous avons utilisé des analyses par « structural equation modeling » (*sem*) ou « analyses de pistes ». Ces analyses sont souvent utilisées comme un outil d'observation et de compréhension des relations existant entre des variables. Par son

approche de causalité statistique, ce type d'analyse permet de connaître la force et le sens des relations entre des variables ou des groupes de variables.

Nous utilisons ici les analyses de pistes pour leur aspect prédictif mais aussi comme un moyen de comprendre les relations entre chaque trait (Fig. 2.7). La différence majeure entre l'approche par *sem* et par CLM est que les analyses de pistes, en intégrant les relations entre les variables explicatives, apportent un niveau de compréhension supplémentaire et révèlent un réseau de liens causaux. Ce niveau de complexité supplémentaire explique pourquoi les analyses de pistes ont une meilleure part de variance expliquée que les CLM et constitue une approche plus intégrative du rôle de chaque variable.

En conclusion, notre étude présente une réponse partielle à l'hypothèse de Silvertown *et al.* (2015). Les traits physiologiques des plantes en conditions stressantes permettent effectivement de prédire la présence des espèces le long d'un gradient d'hydrologie des sols. Cependant, la mesure de traits physiologiques est coûteuse en termes de moyens techniques et humains. Pour mesurer les traits physiologiques nécessaires à la prédiction, il faut placer les plantes dans des conditions stressantes et faire des mesures répétées dans le temps. Face à cette limitation, une solution consiste à trouver des traits plus facilement mesurables, en conditions non-stressantes et qui soient des estimateurs fiables des traits physiologiques que nous avons précédemment identifiés. La surface spécifique foliaire ou le taux de matière sèche sont de bons exemples car ce sont des traits faciles à mesurer et fortement corrélés aux capacités photosynthétiques de la feuille.

Liens entre physiologie et morphologie, causalité et prédiction

Nous avons vu dans la première partie de notre étude que les traits physiologiques permettaient de prédire la présence des espèces. Au cours de la deuxième partie de ce doctorat, nous nous sommes intéressés aux relations entre les traits physiologiques et morpho-anatomiques et l'incidence de ces relations sur les prédictions de présence des espèces sur le gradient hydrologique (objectifs 2 à 4, Fig. 1.6). En considérant la hiérarchie des traits décrits par Chapin III *et al.* (1993) et Silvertown *et al.* (2015), nous nous attendions :

- À ce que les traits morpho-anatomiques soient plus faiblement liés aux présences des espèces sur le gradient que les traits physiologiques
- À ce que les traits morpho-anatomiques soient fortement liés aux traits physiologiques
- À ce que la séquence trait morphologie → physiologie → habitat donne les meilleures prédictions.

Les traits morpho-anatomiques seuls prédisent mal les préférences d'habitat

Un premier point intéressant est l'absence de différences notables entre groupes d'espèces pour tous les traits morpho-anatomiques que nous avons identifiées (SLA, LDMC, LNC, SRL, stom_{area}). Lorsque l'on utilise les traits morpho-anatomiques seuls pour prédire les préférences d'habitat (la présence d'une espèce sur le gradient hydrologique) en utilisant une analyse CLM, le modèle échoue à prédire les présences. Seulement 13 % de la variance est expliqué par les traits morpho-anatomiques contre 48 % lorsque l'on utilise les traits physiologiques. Il est toutefois important de noter que les traits morpho-anatomiques sont tous mesurés en conditions optimales alors que certains traits physiologiques sont mesurés dans des conditions stressantes pour la plante.

Il est intéressant de constater qu'en plaçant des espèces ayant des origines et des stratégies d'existence différentes, dans un même environnement, contrôlé et sans compétiteur, ces espèces ne présentent pas de différences marquées. Il est également intéressant de noter que premièrement, les traits de SLA, LNC et LDMC sont les trois traits les plus communément mesurés en écologie fonctionnelle (Garnier *et al.*, 2017 ; communication personnelle) et deuxièmement, que ce sont également les trois traits dont les variations sont le plus souvent corrélées à des variations environnementales (lumière, perturbation, disponibilité en eau et nutriments, etc.) (Garnier *et al.*, 2016). Ainsi, une absence de différences de valeurs de traits entre nos groupes d'espèces suggère que ces groupes possèdent des niches fondamentales relativement proches (sans compétiteur) mais des niches réalisées bien distinctes (avec compétiteurs, en conditions naturelles). Toutefois, dans cette étude, ce n'est pas la valeur unitaire brute des traits qui présente le plus d'intérêt mais bien la combinaison de valeurs de ces

traits. Ce sont ces syndromes de traits qui, selon nous, sont les plus informatifs sur les stratégies des espèces (ou groupes d'espèces).

Les traits morpho-anatomiques prédisent les traits physiologiques

Un des aspects positifs mis en évidence par notre approche séquentielle est de montrer les liens causaux qui existent entre physiologie et morpho-anatomie. En particulier, nous avons montré que les traits morpho-anatomiques permettaient de prédire les traits physiologiques. Notre modèle (Fig. 3.3) montre que les traits morphologiques sont tous reliés entre eux, ce qui renforce l'idée que :

- Nous sommes face à des syndromes de traits
- Que les traits morpho-anatomiques sont liés aux traits physiologiques par des liens de causalité directs et indirects
- Qu'il n'y a pas de lien causal direct entre les traits morphologiques et les préférences d'habitat des espèces. Il est toutefois intéressant de noter que le trait de longueur spécifique racinaire (SRL) n'est pas lié aux autres traits et possède un seul lien causal, avec la photosynthèse. Ceci semble indiquer que le SRL est un trait faiblement relié au syndrome foliaire.

On trouve dans la littérature de nombreuses corrélations entre traits fonctionnels mais quasiment jamais de liens de causalité clairs. Ainsi, la force de ces liens est peu connue et constitue un des points capitaux que l'écologie fonctionnelle doit éclaircir. Plusieurs auteurs majeurs en écologie fonctionnelle (Cornelissen *et al.*, 2003 ; Pérez-Harguindeguy *et al.*, 2013 ; Garnier *et al.*, 2016) soulignent le besoin de connaître plus finement les liens entre les traits et les fonctions qui leurs sont associées. Pour qu'un trait fonctionnel soit pertinent, il doit être lié à une ou plusieurs fonctions. Si le trait considéré est « proche » de la fonction (nos traits physiologiques), ce trait est généralement plus dur à mesurer mais répond directement à une variation environnementale. Cependant, si le trait est « éloigné » de la fonction (nos traits morpho-anatomiques), ce trait est généralement plus facile à mesurer mais peut capturer d'autres sources de variations environnementales. Grâce à notre modèle de piste, nous savons maintenant que le trait de teneur

en matière sèche de la feuille (LDMC) est lié de façon positive à la fonction de photosynthèse (la photosynthèse nette maximale, A_{\max}) mais également à la fonction de transpiration de la feuille (la conductance stomatique maximale, g_s^{\max}). De plus, nous savons aussi que le lien du LDMC avec la transpiration (g_s^{\max}) est plus fort qu'avec la photosynthèse (A_{\max}) (coefficient de piste de 0.582 contre 0.445, respectivement) dans nos conditions d'étude. Notre modèle de piste met aussi en évidence des relations indirectes entre les traits et les fonctions. Ceci illustre le besoin capital de connaître plus précisément les liens entre les traits morpho-anatomiques et les traits physiologiques associés aux fonctions.

Les analyses de pistes révèlent l'existence d'effets confondants.

Une des forces des analyses de pistes réside dans sa capacité à mettre en évidence des relations indirectes entre variables. Ces analyses montrent que les traits morpho-anatomiques ont des effets en « réseau » sur les traits physiologiques et que ces relations sont plus complexes qu'attendu. Le modèle de piste développé dans le chapitre 3 (Fig. 3.3) montre également que les traits morpho-anatomiques ont des effets antagonistes et synergétiques combinés (c'est-à-dire des liens causaux indirects positifs et négatifs en même temps). Ces effets agissant conjointement, la somme de ces liens indirects donne un effet total assez faible, expliquant ainsi que les traits morpho-anatomiques seuls prédisent mal les préférences d'habitat. Ces effets combinés brouillent les liens entre les traits et les fonctions, rendant par conséquent certains traits peu informatifs pour différencier les espèces et réaliser des prédictions fiables. Toutefois, si l'on considère les traits en prenant en compte les liens qui les unissent en tant que syndrome, ce que nous est permis par les analyses de pistes, nos résultats démontrent que l'approche prédictive par traits fonctionne (Belluau et Shipley, *en prépa.*). Ceci souligne encore une fois l'importance d'approfondir des concepts tels que le spectre économique foliaire (Wright *et al.*, 2004 ; Shipley *et al.*, 2006), racinaire (Barkaoui *et al.*, 2016 ; Kramer-Walter *et al.*, 2016) ou à l'échelle de la plante entière (Kichenin *et al.*, 2013 ; Blonder *et al.*, 2015).

Fiabilité du modèle causal prédictif

Les études par modèle fonctionnent selon deux grandes approches. La première approche est une modélisation empiriste consistant à acquérir des données au cours d'une expérience puis de construire un modèle expliquant ces données. La deuxième approche est une modélisation théorique consistant à construire un modèle théorique basé sur des cadres conceptuels. Une fois le modèle construit, on confirme sa validité par l'expérimentation. Ces deux approches s'opposent dans la position relative du modèle et des données. Les modèles empiristes utilisent les données d'expériences pour créer un modèle qui explique le comportement des données observées alors que les modèles théoriques sont construits à l'aide de connaissances antérieures et utilisent les données d'expériences pour confirmer la viabilité du modèle.

Au cours de ce doctorat, nous avons non seulement construit un modèle basé sur des expériences en conditions contrôlées (chapitre 2 et 3), mais nous nous sommes également intéressés à la fiabilité du modèle construit précédemment (chapitre 4). Pour cela, nous avons constitué un nouveau jeu de données de traits d'espèces mesurés *in situ*, accompagnés de leurs présences effectives le long d'un gradient d'hydrologie des sols. Ainsi, nous pouvons fournir au modèle un nouveau jeu de traits fonctionnels permettant d'obtenir les présences prédites des espèces que nous pouvons comparer à leurs présences observées *in situ* (objectif 5, Fig. 1.6).

Les traits morpho-anatomiques in situ prédisent mal les présences observées des espèces

Dans les chapitres 2 et 3, nous avons montré que le modèle que nous avons construit fonctionne en conditions contrôlées. Cependant, lorsque nous avons testé les prédictions du modèle en utilisant des traits des espèces en conditions naturelles, le modèle s'avérait peu fiable (Table 4.5). L'utilisation des traits agrégés de la communauté à l'échelle du site fournit des prédictions très peu fiables. Ces faibles prédictions s'expliquent d'une part par les limites intrinsèques du modèle (développé ultérieurement) et d'autre part par l'utilisation des traits agrégés des communautés. Il y a, depuis quelques années, un débat sur l'utilisation et la limitation des CWM concernant la détection du lien entre les traits et l'environnement. Des auteurs ont pointé des limites dans l'utilisation des CWM, notamment sur la question de «l'optimalité» des CWM

(Muscarella et Uriarte, 2017). Les valeurs des CWM ne tiennent pas compte de la variabilité intraspécifique, à la fois dans l'espace et dans le temps. Les valeurs de traits moyennes agrégées pourraient masquer la contribution et les conséquences de l'intégration des variations intraspécifique dans l'assemblage des communautés (Violle *et al.*, 2012). Une espèce qui aurait deux stratégies alternatives, causées par certaines conditions environnementales fluctuantes qui maintiennent les deux populations dans deux valeurs de traits «optimaux» en même temps, les CWM serait incapable d'exprimer cette variabilité (Muscarella et Uriarte, 2017). De la même façon, une communauté très diversifiée en termes de valeur de trait ne sera pas représentée correctement par un CWM. Ce débat a soulevé le fait que les CWM ne tiennent pas compte des effets divergents et convergents sur l'assemblage des communautés et doit être complété par des informations sur le partitionnement des variations inter et intraspécifiques et par les moments de distribution des traits des espèces (médiane, variance, asymétrie, kurtosis) (Le Bagousse-Pinguet *et al.*, 2014).

Dans notre étude, les traits agrégés des communautés ne sont pas de bons prédicteurs parce qu'ils réduisent les différences entre communautés. Étant donné que l'on se limite aux espèces identifiées comme dominantes et que celles-ci présentent peu de différences dans leurs valeurs de traits, lorsque l'on agrège les traits, toutes nos communautés tendent à se ressembler. Ainsi, le modèle tend à prédire que toutes les communautés se retrouvent dans le même type de sol (le sol intermédiaire).

Limites et perspectives du modèle prédictif

Dans ce doctorat, nous avons construit un modèle prédictif des présences d'espèces sur des sols représentant un gradient d'hydrologie en utilisant leurs traits fonctionnels. Le modèle donne des prédictions plutôt fiables avec des traits mesurés en conditions contrôlées mais s'avère assez grossier lorsque l'on utilise des traits mesurés en conditions naturelles. Ces mauvaises prédictions peuvent s'expliquer et être améliorées de plusieurs façons.

Le choix des « meilleurs » traits fonctionnels

Au début de cette thèse, nous avons été contraints pour des raisons de temps de manipulation de ne choisir qu'un nombre restreint de traits à étudier. Le choix de ces traits physiologiques se base en partie sur la littérature et en partie sur des contraintes techniques. La volonté de réaliser un suivi de l'état physiologique des plantes nous a poussés à choisir une approche non destructive et des traits tels que les échanges de gaz au niveau de la feuille ou des mesures visuelles de flétrissement. Compte tenu de la littérature, nous nous attendions à ce que ces traits à réponse rapide soient de bons estimateurs de l'état de stress de la plante et soient mesurables tout au long de l'expérience. Cependant, une approche méthodologique différente (notamment avec des mesures destructives) nous aurait très probablement amenés à considérer d'autres suites de traits à inclure dans l'étude. De nombreux autres traits physiologiques, que nous n'avons pas mesuré par manque de temps, de matériels et d'échantillons, auraient été pertinents pour mesurer la réponse des espèces à la sécheresse, tels que le potentiel hydrique des feuilles, des tiges, des racines, les concentrations en composés secondaires, l'élasticité des parois cellulaires, la teneur en azote racinaire, la capacité d'absorption racinaire, etc. La liste est longue et comprend des traits à tous les niveaux d'organisation de la plante. Certains traits, tels que le potentiel hydrique de la feuille, des racines et des tiges au cours du stress (Hernández *et al.*, 2010), auraient permis d'explorer le cadre conceptuel de l'architecture hydraulique de la plante (Sack *et al.*, 2003 ; Schultz, 2003) et de replacer le comportement foliaire de nos espèces dans le cadre conceptuel de l'iso/anisohydrie (Martinez-Vilalta et Garcia-Forner, 2016).

La prise en compte de ces autres traits physiologiques aurait assurément modifié la partie physiologique de notre modèle toutefois il est possible que nous ayons abouti aux mêmes traits morpho-anatomiques. Si l'on considère la théorie de hiérarchisation des traits de Silvertown *et al.* (2015) et Chapin III *et al.* (1993), les traits à l'échelle morpho-anatomiques contraignent les traits à l'échelle physiologique. Comme certains traits morpho-anatomiques sont liés à plusieurs traits physiologiques, nous aurions possiblement abouti à un choix de traits morpho-anatomiques relativement identique.

Une autre cause des mauvaises prédictions du modèle vient de l'absence de mesure pour le trait de longueur spécifique racinaire (SRL). En conditions naturelles, les systèmes racinaires des

individus sont entremêlés et imbriqués, rendant l'identification des individus, leur séparation et la mesure de la longueur des racines quasi impossible. Comme ce trait ne nous était pas accessible, nous avons utilisé la même valeur de SRL pour toutes les espèces, correspondant à la moyenne du trait pour les 25 espèces utilisées dans les chapitres 2 et 3. Ceci a très probablement réduit la capacité du modèle à discriminer les espèces et conduit à des prédictions erronées. Bien que ce trait soit assez compliqué à mesurer, il est possible qu'il soit reporté dans des bases de données de traits en ligne. L'ajout de ce trait dans nos données pourrait amener à une amélioration des prédictions.

La classification des sites le long du gradient hydrologique

Comme décrit dans le chapitre 2 (Belluau et Shipley, 2017), les positions des espèces le long du gradient de disponibilité en eau dans le sol sont attribuées à l'aide de descriptions d'habitats assez imprécises et parfois contradictoires (tableau B.1, ANNEXES B).

Par exemple, nos groupes d'espèces de milieux « secs », « intermédiaires » et « humides » correspondent principalement aux indices d'humidité d'Ellenberg de (2-4), (4-6) et (6-8). Une valeur d'Ellenberg de 3 (sol sec) est définie comme des sols « plus souvent secs qu'humides », une valeur d'Ellenberg de 5 (sol intermédiaire) est définie comme des habitats ayant des « sols frais d'humidité moyenne » alors qu'une valeur d'Ellenberg de 7 (sol humide) est définie comme un habitat ayant des sols « constamment mouillés ou humides, mais pas détrempés » (ANNEXES D, supplementary material). D'autres sources d'informations sont purement textuelles ou qualitatives, telles que les informations contenues dans les flores (Marie-Victorin *et al.*, 2002) ou les bases de données en ligne (Kattge *et al.*, 2001), et sont donc intrinsèquement sujettes à interprétation. À cela s'ajoute le problème que posent des informations contradictoires entre différentes sources pour une espèce donnée. Bien que toutes les descriptions d'habitats soient relativement proches de notre classification dans cette étude, il reste évidemment un degré important de partialité dans notre classement.

De par cette subjectivité du classement, nous ne pouvons pas nous assurer qu'un site classé comme « humide » dans notre étude soit effectivement « humide ». Ceci peut expliquer l'incapacité du modèle à faire des prédictions correctes sur le bord humide de notre gradient. Il

serait intéressant d'étendre la zone d'étude ou d'augmenter la variabilité de sites. Ceci permettrait également d'augmenter le nombre d'espèces incluses dans l'étude et potentiellement la diversité fonctionnelle entre les sites.

Un autre moyen de retirer la subjectivité de notre classification serait d'utiliser uniquement des variables numériques quantitatives pour classer nos sites. Une méthode pour rendre notre classification quantitative et généralisable aurait d'utiliser des variables climatiques à large échelle appliquée aux aires de distributions effectives des espèces. Il aurait été possible, par exemple, d'utiliser la plateforme GBIF (<https://www.gbif.org/>) où les occurrences géolocalisées de milliers d'espèces sont répertoriées. Pour chacune de ces occurrences, il est possible d'extraire l'indice d'aridité en utilisant les données climatiques spatialisées disponible sur la plateforme du Climate Research Unit ou de WorldClim ou encore de la FAO, disponible aujourd'hui à des résolutions relativement fines. Avec ces deux informations, occurrence et indice d'aridité, nous serions en mesure de calculer l'affinité hydrologique moyenne de chaque espèce et ainsi rendre notre étude plus facilement généralisable en facilitant l'attribution des habitats. Évidemment, ceci implique un changement profond des analyses statistiques (notamment la disparition des analyses CLM qui ne sont plus applicables) pouvant mener à un modèle très différent.

La distribution des espèces n'est pas déterminée que par l'hydrologie

Lors de notre étude en conditions contrôlées, seule la disponibilité en eau a été manipulée, toutes les autres sources de variation environnementale ont été maintenues constantes tout au long de l'expérience. Ceci signifie que les traits physiologiques utilisés pour construire le modèle ont répondu à la disponibilité en eau uniquement. Quant aux traits morpho-anatomiques, dans l'expérience en conditions contrôlées, ceux-ci sont mesurés dans des conditions non contraignantes. Cependant, dans l'expérience en conditions naturelles, les espèces *in situ* ont également répondu à toutes les autres sources de variation des conditions environnementales et non pas seulement à la disponibilité en eau dans le sol. Ainsi, les valeurs de traits exprimés par les espèces *in situ* sont également le reflet de leurs réponses aux autres gradients abiotiques, tels que la température, la lumière, les nutriments, l'ouverture du site, les fragmentations locale et

régionale, l'anthropisation (Garnier *et al.*, 2016). Nous avons cherché à contrôler le plus possible ces sources de variations lors de la sélection de nos sites. Ainsi, lorsque ces traits *in situ* sont utilisés dans notre modèle prédictif, les prédictions sont brouillées par l'effet des autres gradients.

Ces différences de valeurs entre un trait soumis à un ou plusieurs gradients sont un aspect important pour les études sur la niche des espèces (Maire *et al.*, 2012). On sait notamment que certains traits, comme le SLA ou le LDMC, sont plus ou moins fortement corrélés avec différentes variations environnementales, telle que la température ou la lumière (Moles *et al.*, 2014; Amatangelo *et al.*, 2014). Toutes ces sources potentielles de variation environnementale engendrent une variation de la valeur des traits que nous ne pouvons ni contrôler ni diviser en plusieurs composantes associées aux différentes sources de variations. Face à des sources de variations multiples et potentiellement en interaction, la réponse des traits est difficile à prévoir. L'étude de l'interaction entre un gradient de sécheresse et de température, par Vile *et al.* (2012), a montré que les effets combinés des deux gradients ne pouvaient pas être simplement additionnés. Ces effets « confondants », c'est-à-dire la combinaison d'effets antagonistes et synergétiques s'appliquant en même temps, rendent toutes prédictions de réponses des traits extrêmement hasardeuses.

L'importance des niches fondamentales et réalisées

Les traits qui ont servi à construire le modèle, qu'ils soient physiologiques ou morpho-anatomiques, ont tous été mesurés sur des individus qui ont poussé sans compétiteur (intra- ou interspécifique). En l'absence de compétiteur, les traits qui ont été mesurés en conditions contrôlées sont liés à la niche fondamentale des espèces. Cela implique que les traits fonctionnels, qui sont les variables explicatives de notre modèle, sont tous liés à la niche fondamentale. Parallèlement, les groupes d'hydrologie du sol ont été définis à l'aide de différentes bases de données (USDA; TRY, Kattge *et al.*, 2011), de flores locales (Marie-Victorin *et al.*, 2002) et des indices de Ellenberg (Ellenberg, 1988, Hill *et al.*, 1999). Ces sources rapportent des informations sur les espèces lorsqu'elles sont observées en conditions naturelles. *In situ*, la présence d'une espèce sur un site donné est la conséquence de l'interaction des deux

niveaux de filtrages, abiotique et biotique, et intègre donc l'effet des compétiteurs (intra- et interspécifique). Ainsi, dans notre modèle, la classification des espèces en groupe d'hydrologie des sols, qui est notre variable réponse, est définie à partir d'informations liées à la niche réalisée des espèces.

Le modèle que nous avons construit dans les chapitres 2 et 3 (Fig. 3.3) a pour but de prédire la présence d'espèces (liées à la niche réalisée) sur la base de traits liés à la niche fondamentale. Ces différences de niches pourraient expliquer les écarts de prédictions entre les groupes observés et prédits. Malheureusement, notre étude ne nous permet pas de mesurer l'effet des différences entre niches réalisées et fondamentales. Cependant, plusieurs auteurs (Li *et al.*, *in press* ; Hofmann *et al.*, 2013) se concentrent actuellement sur la quantification des liens entre les deux niches et la façon dont ces niches réagissent aux changements de conditions environnementales, de régime de perturbations ou encore de richesse spécifique.

Dans l'assemblage des communautés, le filtrage environnemental et la différenciation de niches sont deux mécanismes qui agissent simultanément. Le filtrage environnemental (l'effet des filtres biogéographiques et abiotiques tend à faire converger les valeurs de traits alors que la différenciation de niche (l'effet des interactions intra et interspécifique) tend à avoir un effet de dispersion sur la distribution des valeurs de traits tant à l'échelle de l'espèce qu'à l'échelle de la communauté. Notre modèle permet d'explorer le mécanisme de filtrage environnemental mais ne nous informe pas sur le mécanisme de différenciation des niches. Ainsi, même si les observations des espèces *in situ* sont le produit de ces deux mécanismes, ils ne peuvent pas être distingués l'un de l'autre.

Prise en compte des interactions biotiques

Une des perspectives majeures qui transparait à l'issue de ce doctorat est le besoin d'améliorer notre modèle. En effet, nous avons montré qu'il existe un écart notable entre les traits d'une espèce mesurée avec et sans compétiteur (niche réalisée contre niche fondamentale). Il conviendra, pour améliorer notre modèle, de prendre en compte les effets de la composante biotique lors de l'assemblage des communautés. Il existe de nombreux moyens d'intégrer les composantes biotiques dans notre modèle.

Une possibilité consiste à modifier le modèle en remplaçant les traits morpho-anatomiques mesurés sans compétiteur (liés à la niche fondamentale) par les traits morpho-anatomiques mesurés avec des compétiteurs (liés la niche réalisée). Cela consiste à mesurer les différences de valeurs pour des traits morpho-anatomiques mesurées sur des individus isolés, des individus en compétition intraspécifique et des individus en compétition interspécifique. Dans ce cas, on peut s'attendre à ce que certains liens causaux soient remplacés par d'autres dans notre modèle. La force des liens entre traits physiologique et morphologique devrait être modifiée lorsque l'on ajoute une source de variation (les compétiteurs) dans la valeur des traits morpho-anatomiques. L'effet de cette compétition pourra ensuite être intégré au modèle comme un facteur de correction des valeurs de traits et ainsi donner de meilleures prédictions.

Une autre méthode pour améliorer notre modèle, et susceptible de donner les meilleurs résultats, consiste à intégrer les composantes biotiques au modèle mais aussi l'interaction entre les composantes biotiques et abiotiques. L'hypothèse qui sous-tend cette approche est que la compétition est modulée par le niveau de stress. Lorsque deux espèces sont en compétition pour une ressource, le niveau de disponibilité de la ressource va conditionner la force de la compétition. On peut s'attendre à ce qu'en conditions stressantes, c'est-à-dire un faible niveau de disponibilité de la ressource, le niveau de compétition ne soit pas le même que lorsque les espèces sont dans un milieu où la ressource est en abondance. Cette hypothèse est appelée l'hypothèse « stress-gradient » et prédit que la fréquence des interactions de facilitation et de compétition varie inversement avec les gradients de stress abiotique, la facilitation étant plus fréquente dans des conditions de stress abiotique élevé par rapport à des conditions abiotiques moins contraignantes (Bertness et Callaway, 1994). Cette hypothèse a déjà été largement testée sur de larges gradients de stress et reste encore controversée. De nombreuses études confirment l'existence de ce stress-gradient bien que certains auteurs discutent de sa généralisation (He et Bertness, 2009). Ajoutons que les auteurs qui s'intéressent à cette hypothèse choisissent généralement de se concentrer sur seulement quelques paires d'espèces (Maestre *et al.*, 2009). De même, ces études se sont fréquemment concentrées sur des variations à large échelle du niveau de stress plutôt que des variations locales. Pour améliorer notre modèle et tester l'existence de cette hypothèse à plus petite échelle, nous devons prendre en compte l'interaction entre les filtrages biotique et abiotique et mesurer les capacités compétitrices de nos espèces le

long du gradient de disponibilité en eau. Cette nouvelle étude, que nous proposons ici, a déjà été mise en place mais il nous a été impossible de l'intégrer dans ce doctorat. Toutefois, les résultats préliminaires suggèrent que la compétition entre les individus est moins importante qu'attendu.

Finalement, la mise en place d'une expérience pour répondre à ces questions nécessiterait de faire pousser chaque espèce en monoculture (compétition intraspécifique) et en mélange (compétition intra- et interspécifique), le tout en imposant un gradient de disponibilité en eau. Ce gradient pourrait être mis en place suivant plusieurs modalités : soit un arrêt de l'arrosage et un dessèchement du sol progressif, soit une disponibilité en eau maintenue dans le temps par des arrosages modulables. Bien que ce type d'expérience soit relativement commune, elles sont tout de même assez complexes à analyser du fait des nombreux effets interactifs qui doivent être séparés les uns des autres pour être interprétables. Des modèles linéaires à effets mixtes devraient permettre de distinguer les effets de l'identité fonctionnelle des espèces (si elles sont originaires de sol sec, intermédiaire ou humide), les effets de la compétition (si les compétiteurs sont originaires de sol sec, intermédiaire ou humide), les effets du traitement (si les individus sont stressés ou non) et les effets de 3 interactions triples : identité*compétition, compétition*traitement et enfin identité*compétition*traitement. Ceci permettra ainsi de démêler les interactions entre les filtres biotiques et abiotiques, et ainsi raffiner notre modèle afin d'obtenir des prédictions plus fiables de la présence effective des espèces le long d'un gradient de disponibilité en eau.

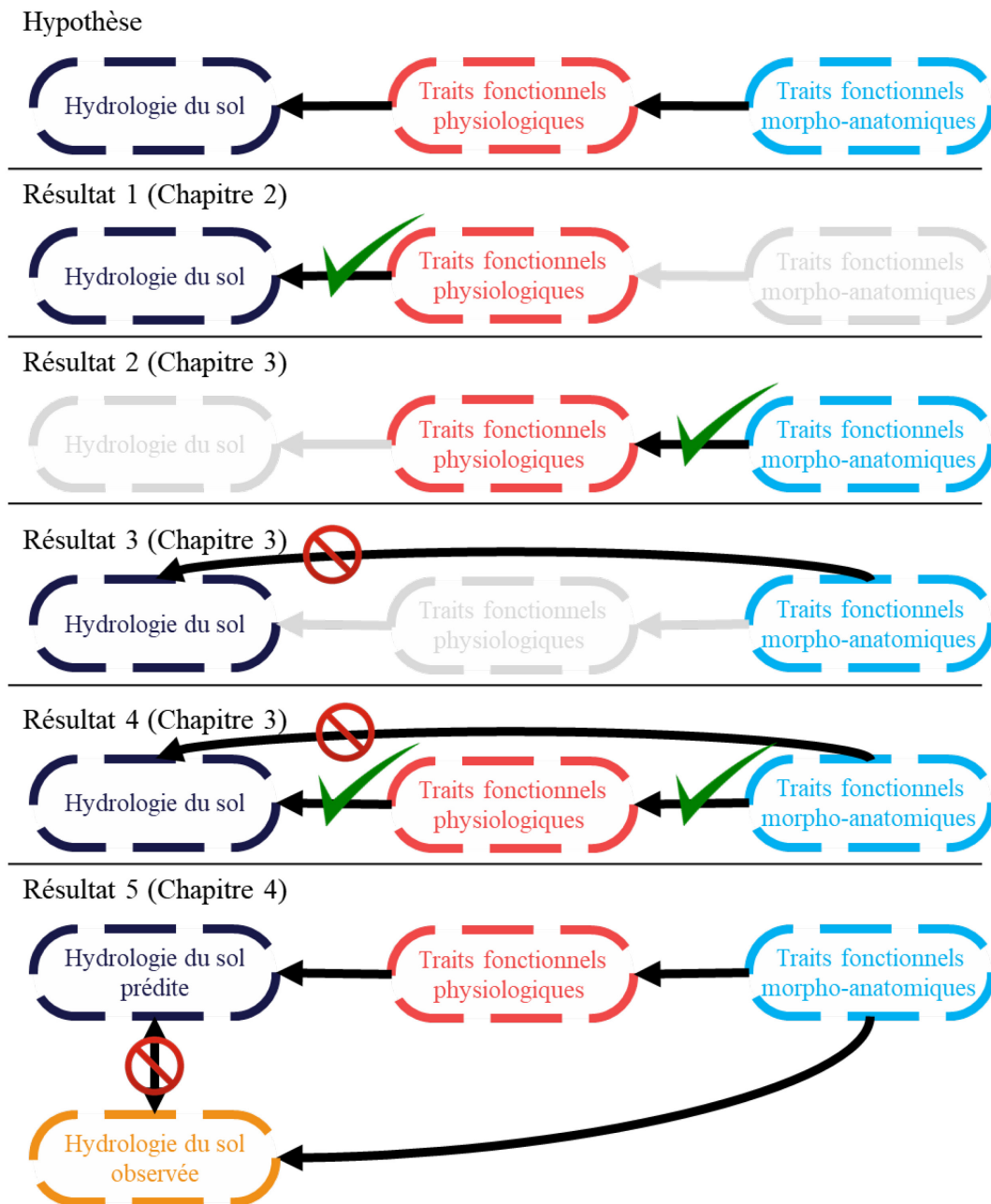


Figure 5.1 : Représentation graphique des hypothèses et résultats de l'étude. Le résultat 1 est issu du chapitre 2. Les résultats 2 à 4 sont extraits du chapitre 3. Le résultat 5 est tiré du chapitre 4. L'hypothèse testée ici n'est que partiellement validée.

Conclusion

Au cours de ce doctorat, nous avons identifié des traits fonctionnels morphologiques, anatomiques et physiologiques de tolérance à la sécheresse qui peuvent prédire la présence des espèces le long d'un gradient hydrologique des sols. Plus spécifiquement, nous avons montré que :

- Les traits physiologiques (la photosynthèse nette maximale, la conductance stomatique maximale, le potentiel hydrique du sol au point de flétrissement, la conductance stomatique au point de flétrissement et l'efficacité d'utilisation de l'eau au point de flétrissement) sont de bons prédicteurs de la tolérance à la sécheresse et permettent de prédire la présence des espèces sur un gradient d'hydrologie des sols (résultat 1, Fig. 5.1)
- Les traits morpho-anatomiques (la surface spécifique foliaire, la teneur en matière sèche foliaire, la teneur en azote foliaire, la longueur spécifique racinaire et la surface stomatique) en conditions contrôlées prédisent les traits physiologiques au cours du stress (résultat 2, Fig. 5.1)
- Les traits morpho-anatomiques seuls ne prédisent pas les présences des espèces sur le gradient (résultat 3, Fig. 5.1)
- Les prédictions sont plus fiables en utilisant une séquence « traits morpho-anatomiques → traits physiologiques → habitat des espèces » (résultat 4, Fig. 5.1)
- Les prédictions du modèle ne sont pas fiables lorsque l'on utilise des traits morpho-anatomiques mesurés en conditions naturelles (résultat 5, Fig. 5.1).

Nous avons également exploré les mécanismes d'assemblage des communautés en utilisant une approche écophysiological qui nous a permis de construire un modèle causal prédictif basé sur les relations entre les traits fonctionnels et leurs fonctions associées. Ce modèle a été développé en conditions contrôlées puis testé en conditions naturelles pour évaluer la fiabilité de ses prédictions. Il apparaît que notre modèle est fiable lorsqu'on utilise des traits fonctionnels liés à la niche fondamentale des espèces et perd en fiabilité lorsque l'on utilise des traits fonctionnels liés à la niche réalisée. La méthode que nous avons utilisée dans ce doctorat peut être modifiée relativement facilement pour étudier d'autres gradients naturels que la disponibilité en eau.

Cependant, comme notre modèle n'est fiable que sous certaines conditions, il apparaît nécessaire de le compléter et de l'améliorer pour augmenter son pouvoir prédictif. Pour cela, il nous faudra prendre en compte les effets des filtrages environnementaux (autre que la disponibilité en eau) et des différenciations de niches (issues des interactions biotiques).

ANNEXES A

-

APPENDICES TO CHAPTER 1

Content :

Table A.1 : Traits morpho-anatomiques des espèces, mesurés à l'échelle de l'individu, mais non inclus dans les analyses.

Table A.2 : Traits morpho-anatomiques des espèces, mesurés à l'échelle de la feuille, mais non inclus dans les analyses.

Table A.3 : Traits morpho-anatomiques des espèces, mesurés à l'échelle de la tige et des racines, mais non inclus dans les analyses.

Table A.1

Espèce	HV	MS _{tot}	RGR	SF _{tot}	NF	RRC	RRF
<i>Achillea millefolium</i>	0.3154	2.2683	0.2427	597.22	19.8	0.127	0.184
<i>Asclepias syriaca</i>	0.1314	1.2988	0.1433	76.17	12.0	3.047	4.979
<i>Campanula americana</i>	0.1636	0.7958	0.2445	178.91	18.8	0.308	0.544
<i>Centaurea cyanus</i>	0.2630	3.8707	0.2400	1029.55	42.8	0.124	0.171
<i>Cerastium tomentosum</i>	0.4553	0.5948	0.1885	116.72	59.8	0.096	0.242
<i>Chenopodium polyspermum</i>	0.3554	2.4484	0.2409	248.00	83.6	0.069	0.349
<i>Cistus salviifolius</i>	0.2110	1.1479	0.1584	111.05	22.4	0.161	0.418
<i>Daucus carota</i>	0.4176	5.9799	0.2252	929.43	19.6	0.500	0.812
<i>Epilobium ciliatum</i> subsp. <i>glandulosum</i>	0.0376	0.1969	0.1995	37.09	19.8	0.132	0.175
<i>Erigeron canadensis</i>	0.0588	0.5900	0.1784	75.93	43.6	0.339	0.669
<i>Eupatorium perfoliatum</i>	0.0445	0.1229	0.2378	15.01	4.8	1.428	2.287
<i>Hypericum perforatum</i>	0.4094	1.0471	0.2071	325.66	478.6	0.268	0.588
<i>Jacquemontia gracillima</i>	0.4530	5.9084	0.1105	1426.16	35.6	0.197	0.391
<i>Lythrum salicaria</i>	0.3104	1.7493	0.2508	385.41	62.4	0.593	0.980
<i>Medicago lupulina</i>	0.3128	1.7495	0.1928	321.43	188.8	0.143	0.290
<i>Medicago sativa</i>	0.4916	5.5640	0.1846	662.15	184.8	0.811	1.978
<i>Melilotus albus</i>	0.2230	2.3934	0.1511	252.95	92.8	0.412	0.755
<i>Myagrum perfoliatum</i>	0.2098	3.1599	0.2423	1002.42	23.4	0.068	0.085
<i>Nigella damascena</i>	0.3378	2.6110	0.2165	579.39	16.2	0.251	0.463
<i>Plantago lanceolata</i>	0.2626	2.6828	0.2163	724.50	27.4	0.090	0.119
<i>Rumex acetosella</i>	0.1530	1.1922	0.2595	412.67	49.8	0.175	0.355
<i>Scorzoneroïdes autumnalis</i>	0.3328	2.8377	0.2415	984.13	22.6	0.092	0.114
<i>Silene vulgaris</i>	0.3912	1.8243	0.2317	491.15	92.2	0.090	0.169
<i>Stellaria media</i>	0.4872	4.6753	0.2356	1412.74	525.8	0.120	0.276
<i>Trifolium pratense</i>	0.2554	3.1031	0.2073	582.24	112.8	0.216	0.507

Table A.1 : Traits morpho-anatomiques des espèces, mesurés à l'échelle de l'individu, mais non inclus dans les analyses. Pour tous les traits suivants, nous avons utilisé la valeur moyenne de cinq individus par espèce : Hauteur végétative (HV, m) ; Masse sèche totale (MS_{tot}, g) ; Taux de croissance relatif (RGR, g g⁻¹ j⁻¹) ; Surface foliaire totale (SF_{tot}, cm²) ; Nombre de feuilles (NF, feuille) ; Ratio racinaire / caulinaire (RRC, g g⁻¹) ; Ratio racinaire / foliaire (RRF, g g⁻¹).

Table A.2

Espèce	SF _{moyen}	TCF	RCA	DN	Ψ_{feuille}	Stom _{long}	Stom _{larg}	Stom _{dens}	Stom _{spec}
<i>Achillea millefolium</i>	25.55	375.15	10.78	0.006	-0.350	37.31	20.22	17.55	0.010
<i>Asclepias syriaca</i>	6.42	415.78	8.28	0.005	-0.792	22.24	14.36	189.19	0.047
<i>Campanula americana</i>	10.40	432.78	8.94	0.003	-0.229	23.91	17.02	108.26	0.035
<i>Centaurea cyanus</i>	23.93	367.10	7.37	0.002	-0.223	26.35	16.93	76.53	0.027
<i>Cerastium tomentosum</i>	1.93	452.51	14.22	0.003	-0.162	25.03	18.03	91.70	0.032
<i>Chenopodium polyspermum</i>	2.89	406.22	9.36	0.002	-0.341	27.46	13.85	62.58	0.019
<i>Cistus salvifolius</i>	4.89	429.55	43.01	0.003	-0.486	24.56	16.59	127.27	0.041
<i>Daucus carota</i>	48.46	410.37	13.24	0.005	-0.205	23.93	14.99	78.97	0.022
<i>Epilobium ciliatum</i> subsp. <i>glandulosum</i>	1.72	396.39	16.59	0.004	-0.412	14.75	10.68	405.05	0.050
<i>Erigeron canadensis</i>	1.62	414.44	10.75	0.004	-0.422	20.38	14.45	171.73	0.040
<i>Eupatorium perfoliatum</i>	3.18	348.92	13.44	0.003	-0.421	27.45	15.73	203.30	0.069
<i>Hypericum perforatum</i>	0.72	467.37	13.96	0.004	-0.276	17.87	9.95	133.77	0.019
<i>Jacquemontia gracillima</i>	46.23	414.24	13.49	0.003	-0.346	14.98	7.13	106.66	0.009
<i>Lythrum salicaria</i>	7.07	413.56	9.63	0.005	-0.244	25.27	19.02	85.66	0.032
<i>Medicago lupulina</i>	1.68	435.03	10.95	0.006	-0.308	16.56	8.95	192.26	0.022
<i>Medicago sativa</i>	3.63	431.38	9.47	0.005	-0.334	18.98	9.93	102.04	0.015
<i>Melilotus albus</i>	2.70	390.44	17.45	0.005	-0.409	19.23	11.39	95.82	0.016
<i>Myagrurn perfoliatum</i>	42.78	387.03	8.15	0.001	-0.288	24.10	14.06	105.46	0.028
<i>Nigella damascena</i>	41.19	428.11	16.68	0.007	-0.318	42.65	26.91	34.21	0.031
<i>Plantago lanceolata</i>	27.02	354.03	7.37	0.001	-0.443	25.74	14.71	144.35	0.043
<i>Rumex acetosella</i>	8.04	407.42	8.35	0.002	-0.256	47.01	27.56	22.43	0.023
<i>Scorzoneroïdes autumnalis</i>	44.22	403.64	11.13	0.003	-0.284	26.92	16.67	63.23	0.022
<i>Silene vulgaris</i>	5.28	389.91	8.14	0.002	-0.313	26.33	19.18	75.63	0.030
<i>Stellaria media</i>	2.61	416.30	9.89	0.002	-0.170	35.07	23.96	21.02	0.014
<i>Trifolium pratense</i>	5.34	463.17	9.93	0.006	-0.319	13.77	7.17	195.99	0.015

Table A.2 : Traits morpho-anatomiques des espèces, mesurés à l'échelle de la feuille, mais non inclus dans les analyses. Pour tous les traits suivants, nous avons utilisé la valeur moyenne de cinq individus par espèce : Surface foliaire unitaire moyenne (SF_{moyen} , cm^2) ; Teneur en carbone de la feuille (TCF, mg g^{-1}) ; Ratio carbone / azote foliaire (RCA, $\text{mg g}^{-1} / \text{mg g}^{-1}$) ; Densité de nervures (DN, mm mm^{-2}) ; Potentiel hydrique de la feuille (Ψ_{feuille} , MPa) ; Longueur stomatique ($Stom_{\text{long}}$, μm) ; Largeur stomatique ($Stom_{\text{larg}}$, μm) ; Densité stomatique ($Stom_{\text{dens}}$, $\text{stomate } \mu\text{m}^{-2}$) ; Densité spécifique stomatique ($Stom_{\text{spec}}$, cm cm^{-2}).

Table A.3

Espèces	TMST	DST	Ψ_{tige}	TMSR	LR
<i>Achillea millefolium</i>	0.139	0.728	-0.056	0.150	23.176
<i>Asclepias syriaca</i>	0.215	0.616	-0.043	0.328	11.161
<i>Campanula americana</i>	0.087	0.903	-0.084	0.171	45.872
<i>Centaurea cyanus</i>	0.062	1.035	-0.097	0.149	29.588
<i>Cerastium tomentosum</i>	0.214	0.261	-0.044	0.146	5.585
<i>Chenopodium polyspermum</i>	0.117	0.505	-0.097	0.258	11.364
<i>Cistus salvifolius</i>	0.282	0.839	-0.037	0.370	13.302
<i>Daucus carota</i>	0.121	0.741	-0.100	0.185	47.859
<i>Epilobium ciliatum</i> subsp. <i>glandulosum</i>	0.071	0.373	-0.042	0.231	4.518
<i>Erigeron canadensis</i>	0.117	0.579	-0.067	0.212	22.374
<i>Eupatorium perfoliatum</i>	0.168	0.362	-0.056	0.224	2.389
<i>Hypericum perforatum</i>	0.163	0.791	-0.045	0.243	27.352
<i>Jacquemontia gracillima</i>	0.125	1.053	-0.049	0.209	46.353
<i>Lythrum salicaria</i>	0.164	0.849	-0.041	0.271	10.642
<i>Medicago lupulina</i>	0.163	0.642	-0.050	0.329	17.236
<i>Medicago sativa</i>	0.204	0.627	-0.040	0.437	40.941
<i>Melilotus albus</i>	0.251	0.798	-0.036	0.281	14.164
<i>Myagrurn perfoliatum</i>	0.061	0.868	-0.119	0.095	9.367
<i>Nigella damascena</i>	0.107	0.746	-0.045	0.181	42.276
<i>Plantago lanceolata</i>	0.084	0.876	-0.119	0.170	26.703
<i>Rumex acetosella</i>	0.081	0.666	-0.138	0.301	10.176
<i>Scorzoneroïdes autumnalis</i>	0.120	0.804	-0.094	0.120	15.426
<i>Silene vulgaris</i>	0.098	0.615	-0.036	0.166	13.647
<i>Stellaria media</i>	0.052	0.794	-0.075	0.167	54.944
<i>Trifolium pratense</i>	0.128	0.593	-0.121	0.259	32.575

Table A.3 : Traits morpho-anatomiques des espèces, mesurés à l'échelle de la tige et des racines,

mais non inclus dans les analyses. Pour tous les traits suivants, nous avons utilisé la valeur moyenne de cinq individus par espèce : Teneur en matière sèche de la tige (TMST, g g⁻¹) ; Densité spécifique de la tige (DST, mg mm⁻³) ; Potentiel hydrique de la tige (Ψ_{tige} , MPa) ; Teneur en matière sèche de la racine (TMSR, g g⁻¹) ; Longueur racinaire (LR, m)

ANNEXES B

-

APPENDICES TO CHAPTER 2

Content :

Table B.1: Information used to create the wetness habitat classification.

Appendix BA: Relations between measures of water content (VWC/RWC/water potential).

Appendix BB: Segmented linear regression for dynamic response of stomatal conductance.

Figure B.2: Initial hypothesized causal structure.

Table B.2: Traits used in the cumulative link model and path analysis.

Table B.3: Scores, probabilities and ranking of the species.

Appendix BC: R script for all analysis included in the study.

Table B.1

Species	Soil hydrology	TRY PPT	TRY PET	TRY AI	Ellenberg	USDA	eflora	Tela	Flore laurentienne
<i>Achillea millefolium</i>	Dry	741.4	545.1	1.4	4	Mildly disturbed soil of grasslands and open forests / drought tolerant species.	Pastures, meadows, roadsides, stream sides, woodlands, waste grounds, dry or sandy soils, also in damp, clayey, and salty soils.	5	Fields and dryland.
<i>Asclepias syriaca</i>	Dry	887.6	870.3	1.0	-	Grows in sandy, clayey, or rocky calcareous soils, banks or flood plains of lakes, ponds, and waterways, in prairies, forest margins, roadsides, and waste places.	-	4	Fields and wasteland.
<i>Campanula americana</i>	Inter.	964.2	-	-	3/7	Hydrophyte/nonhydrophytes, Occur in wetlands and non-wetlands.	-	4/5	-
<i>Centaurea cyanus</i>	Inter.	964.2	-	-	4	Nonhydrophytes.	Grasslands, woodlands, forests, roadsides, other disturbed sites.	-	-
<i>Cerastium tomentosum</i>	Dry	-	-	-	-	-	Rock-garden and wall plant, often escaping onto roadsides, riverbanks, old fields.	-	-
<i>Chenopodium polyspermum</i>	Wet	-	-	-	6	-	Moist disturbed soils, gardens, waste areas, alluvial plains.	6/7	Uncultivated sites, gardens, roadbed.
<i>Cistus salviifolius</i>	Dry	679.9	1367.1	0.5	-	-	-	4	-
<i>Daucus carota</i>	Inter.	993.2	761.5	1.3	4	-	Cultivated and adventive worldwide in temperate regions.	5/6	Fields and uncultivated sites.

Species	Soil hydrology	TRY PPT	TRY PET	TRY AI	Ellenberg	USDA	eflora	Tela	Flore laurentienne
<i>Epilobium ciliatum</i> subsp. <i>glandulosum</i>	Wet	1109.8	730.7	1.5	-	-	-	-	Moderately wet sites.
<i>Erigeron canadensis</i>	Dry	747.9	855.3	0.9	4	Grasslands, and in, moist disturbed sites including, riparian and wetland areas.	Disturbed places.	5	Fields and wasteland, burned sites.
<i>Eupatorium perfoliatum</i>	Wet	964.2	-	-	-	Moist or wet conditions, variety of wetland habitats.	Moist, low ground, marshes, roadsides, swamps, wet pastures.	-	Wet sites, burned, riverbanks.
<i>Hypericum perforatum</i>	Wet	640.2	494.2	1.3	4	In grasslands, pastures, meadows, and rangelands. But it also occurs in forested areas.	In wet, shaded or open grassy places often near streamsOpen woodlands, meadows, grasslands, and steppes, riverbanks, stony and grassy slopes, roadsides, in dry or well-drained habitats.	5	Fields and wasteland.
<i>Jacquemontia gracillima</i>	Inter.	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lythrum salicaria</i>	Wet	1049.4	730.7	1.4	8~	-	Common in rice fields and wet places, Damp grasslands, banks.	7	Submerged sites in spring.
<i>Medicago lupulina</i>	Dry	707.4	680.4	1.0	4	-	Stream banks, roadsides, waste fields, woodland margins.	4	Fields and uncultivated sites.
<i>Medicago sativa</i>	Inter.	299.4	-	-	4	Deep, well-drained, friable soils. Absent of overflows or high water tables soils.	Cultivated throughout China, often escaped to roadsides, fields, grasslands, and stream banks.	4/5	Persistent after crops.
<i>Melilotus albus</i>	Dry	1109.8	730.7	1.5	3/4	Roadsides, riparian zones and other communities from low to middle elevations.	Moist soil in fields, roadsides, wastelands.	4	Uncultivated sites, riverbank, gardens.

Species	Soil hydrology	TRY PPT	TRY PET	TRY AI	Ellenberg	USDA	eflora	Tela	Flore laurentienne
<i>Myagrum perfoliatum</i>	Inter.	-	-	-	4	-	Roadsides, waste ground, disturbed sites.	-	-
<i>Nigella damascena</i>	Inter.	-	-	-	-	-	Dump sites and waste places.	-	-
<i>Plantago lanceolata</i>	Dry	863.0	887.9	0.9	-	-	Seaside, meadows, boggy places, stony mountain slopes, gravel beds, sandy area, roadsides, wastelands.	4/5	Fields and uncultivated sites.
<i>Rumex acetosella</i>	Dry	703.2	-	-	3	-	Roadsides, cultivated fields, waste places, disturbed areas, lawns, meadows, railroad gravels, sandy and muddy shores: usually in acidic soils.	4	Dryland, sandy sites.
<i>Scorzoneroïdes autumnalis</i>	Dry	793.6	394.2	2.0	5	-	Roadsides, pastures, open fields.	5	Fields and roadsides.
<i>Silene vulgaris</i>	Dry	-	613.9	-	4/5	-	Roadsides, waste ground, gravel pits and shores, arable land.	4/5	Gardens.
<i>Stellaria media</i>	Inter.	783.6	547.3	1.4	-	-	Cultivated ground, waste places, open woodlands.	5	Rich wet soils.
<i>Trifolium pratense</i>	Inter.	899.5	473.1	1.9	5	Well-drained loamy soils, but also on soil not as well-drained. best adapted where summer temperatures are moderately cool to warm and moisture is sufficient.	Cultivated and naturalized; woodland margins, wet meadows, roadsides.	5	Fields and cultivated grassland.

Table B.1 : Information used to create the ordinal wetness habitat classification.

Soil hydrology is the ordinal classification ("dry", "intermediate", "wet") we created for this study based on the following data. **TRY PPT**, **PET** and **AI** are respectively data of annual precipitation, annual evapotranspiration and average annual aridity index (annual precipitation divided by annual evapotranspiration) associated with a species from the TRY database (Kattge *et al.*, 2001). **Ellenberg** data are coming from Ellenberg's 12 level index for soil water status (Ellenberg, 1988) [1 - Indicator of extreme dryness, restricted to soils that often dry out for some time ; 3 - Dry-site indicator, more often found on dry ground than in moist places ; 5 - Moist-site indicator, mainly on fresh soils of average dampness ; 7 - Dampness indicator, mainly on constantly moist or damp, but not on wet soils ; 9 - Wet-site indicator, often on water-saturated, badly aerated soils ; 10 - Indicator of shallow-water sites that may lack standing water for extensive periods ; 11 - Plant rooting under water, but at least for a time exposed above, or plant floating on the surface ; 12 - Submerged plant, permanently or almost constantly under water]. **USDA** and **eFlora** data are from their respective websites and databases (United States Department of Agriculture online database : <http://plants.usda.gov/java/> ; eFlora online database : <http://www.efloras.org/index.aspx>). **Tela** data are from an online database on French vegetation, available at <http://philippe.julve.pagesperso-orange.fr/catminat.htm> (Julve, 1998). The Tela indicators are : [1 – hyperxerophilic ; 2 - peroxerophilics ; 3 - xerophilics ; 4 - mesoxerophilics ; 5 – mesohydrics ; 6 - mesohygrophilics ; 7 - hygrophilics ; 8 - hydrophilics ; 9 - seasonal amphibians ; 10 - permanent amphibians ; 11 - aquatic superficial ; 12 - deep aquatic]. The **Flore laurentienne** data are for Marie-Victorin *et al.*'s (2002) flora. We didn't used clear priority rules to choose between two contradictive sources but rather personal observation and communication with local experts to help the decision.

Appendix BA: Relations between measures of water content (VWC/RWC/water potential).

We empirically determined the relationships between volumetric water content (VWC, m³ water/m³ soil) and relative water content (RWC, g water/g soil) and between relative water content and soil water potential (Ψ , MPa) for our planting substrate.

First, we link volumetric water content (VWC, m³ water/m³ soil, expressed in %) and relative water content (RWC, g water/g soil) (Fig. BA.1A). From this relationship, we fit a quadratic regression (Table BA.1).

Table BA.1 : Estimate from the quadratic regression of soil volumetric water content (VWC, m³ water/m³ soil, expressed in %) by soil relative water content (RWC, g water/g soil)

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
RWC	21.668	9.113	2.378	0.018
RWC ²	1339.506	86.971	15.402	<2e-16
RWC ³	-3312.089	204.120	-16.226	<2e-16
Adjusted R-squared	0.995			
p-value:	<2e-16			

From this, we obtain the following equation:

$$\text{VWC} = 21.668 * \text{RWC} + 1339.506 * \text{RWC}^2 - 3312.089 * \text{RWC}^3 \text{ (Eqn.1)}$$

Second, we constructed the relationship between relative water content and soil water potential (Fig. BA.1B). We then transform RWC into VWC (based on the eqn. 1) (Fig. BA.1C). Once this relationship is constructed, we used the “smooth.spline” and “predict.smooth.spline” R functions to determine the soil water potential values from the soil volumetric water content values.

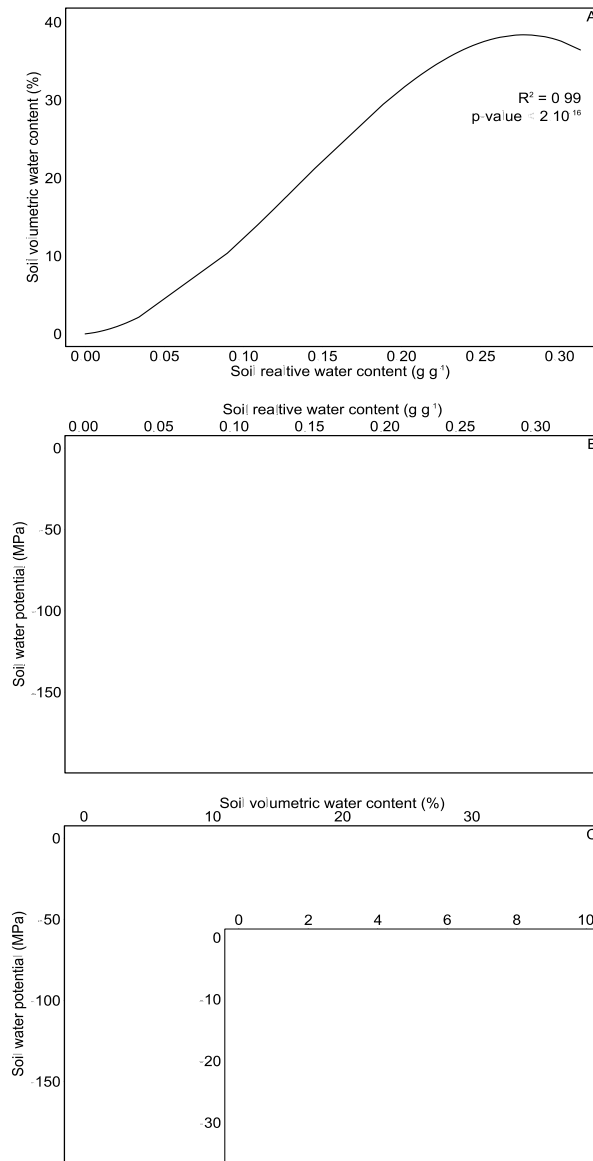


Figure BA.1 : (A) Relationship between soil volumetric water content (VWC, m³ water/m³ soil, expressed in %) and soil relative water content (RWC, g water/g soil) with fitted regression. (B) Relationship between soil relative water content (RWC, g water/g soil) and soil water potential (Ψ , MPa). (C) Relationship between soil volumetric water content (VWC, m³ water/m³ soil, expressed in %) and soil water potential (Ψ , MPa). This last relationship is used to convert measured soil volumetric water content to soil water potential. The inset box shows the critical range of volumetric water content values.

Appendix BB : Segmented linear regression for dynamic response of stomatal conductance.

For all species, we plotted conductance as a function of soil water content. A general pattern was found in which stomatal conductance decreased linearly with decreasing soil water content until a critical level of soil moisture availability was reached (i.e., a threshold or inflection), after which the rate of decrease in stomatal conductance was more pronounced (Fig. 2.1). Therefore, we used segmented linear regression (also known as piecewise, change-point, “broken-stick” or “hockey stick” regression, among others) (Toms & Lesperance, 2003) to minimize the overall residual sum of squares of the two regression equations. Parameter estimates of the two equations were constrained, such that (i) the two intersecting lines were equal at their point of intersection (i.e., the inflection point), and (ii) the slopes of both lines must not be negative, since conductance cannot increase if water content decreases. This segmented linear regression allowed us to calculate seven parameters (Table 2.2) : (i) the maximum conductance at the point at which soil moisture field capacity was attained (g_s^{\max} , $\text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), (ii) the soil moisture content at the inflection point (Ψ_{inf} , MPa), (iii) the conductance at the inflection point (g_s^{inf} , $\text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (iv) the conductance at stage 2 of the visual wilting index (g_s^{wilt} , $\text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (v) the minimum conductance at final stage 4 of the visual wilting index (g_s^{min} , $\text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), the slopes between the point of (vi) maximum conductance and the inflection point conductance ($\text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}/\text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), and (vii) between inflection point conductance and the minimum conductance ($\text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}/\text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). We have included the piece-wise regression details and R code below.

Toms JD, Lesperance ML. 2003. Piecewise regression: A tool for identifying ecological thresholds. *Ecology* **84**: 2034–2041.

R script for segmented linear regression function

```
Find.breakpoint<-function (x,y,initial.breakpoint,plot.regression=FALSE)
{
# x, y are the two vectors for the regression
# initial.breakpoint is the initial value of breakpoint
# plot.regression=TRUE if you want to plot the results
if(sum(x<initial.breakpoint)<3)stop("breakpoint too close to zero")
# we do two independant regressions (one before and one after the breakpoint)
# to find the initial values for the slopes and intercepts
reg1<-coef(lm(y[x<initial.breakpoint]~x[x<initial.breakpoint]))
reg2<-coef(lm(y[x>=initial.breakpoint]~x[x>=initial.breakpoint]))
initial.values<-c(reg2[1],reg1[2],reg2[2],initial.breakpoint)

# function to minimize (sum of square for the two regressions)fr<-function (mypars,x,y,bpoint)
{
x1<-x[x<bpoint]
y1<-y[x<bpoint]
x2<-x[x>=bpoint]
y2<-y[x>=bpoint]
a2<-mypars[1]
b1<-mypars[2]
b2<-mypars[3]
bpoint<-mypars[4]
SS1<-(y1-(a2+bpoint*(b2-b1)+b1*x1))^2
SS2<-(y2-(a2+b2*x2))^2
sum(SS1) + sum(SS2)
}
# this find the values of the four parameters (two slopes, intercept and breakpoint)
# constrained by :
# (1) the two regressions have to coincide at the breakpoint
# (2) the two slopes have to be positive
out<-nlminb(start=initial.values,objective=fr,lower=c(-Inf,0,0,0),
upper=c(Inf,Inf,Inf,Inf),,x=x,y=y,bpoint=10) #
a2<-out$par[1]
b1<-out$par[2]
b2<-out$par[3]
break.point<-out$par[4]
a1<-a2+break.point*(b2-b1)
if(plot.regression){
plot(y~x)
abline(a1,b1)
abline(a2,b2)
lines(x=rep(break.point,2),y=c(min(y),max(y)),lty=2)
}
MSE<-sqrt(out$objective/(length(x)-4))
list(intercept1=a1,slope1=b1,intercept2=a2,slope2=b2,breakpoint=break.point,MSE=MSE)
}
Find.breakpoint(x,y,5,plot.regression=T)
```

Figure B.2

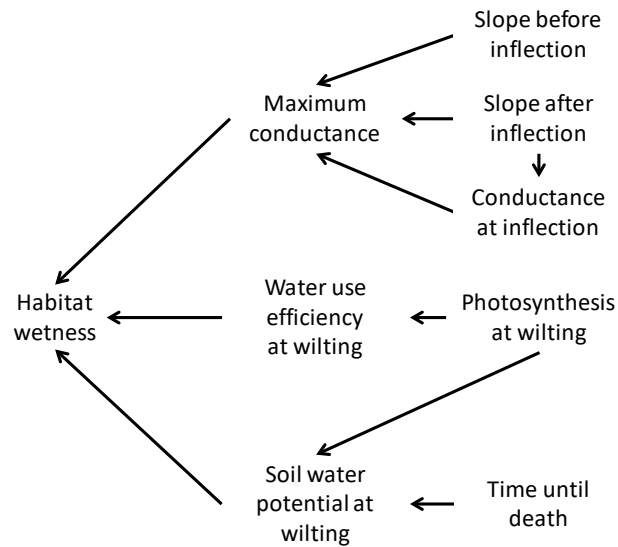


Figure B.2 : Initial hypothesized causal structure. The relationships expressed in the *a priori* model reflect a combination of mathematical and ecological links. For instance, maximum conductance and WUE are related to their logical antecedents by mathematical relationships: they are both calculated using these parameters, and we therefore know that they are related to them. In contrast, the link between soil water potential and its own antecedents is based on ecological hypotheses. Because photosynthesis increases water demand (at equal WUE), we can expect that the plant's own water use will precipitate soil drying in combination with other drought parameters (e.g. duration of drought).

Table B.2

Species name	Slope after inflection	Slope before inflection	g_s^{\max}	g_s^{\inf}	g_s^{wilt}	g_s^{\min}	A_{\max}	A_{wilt}	WUE_{\max}	WUE_{wilt}	Ψ_{\inf}	Ψ_{wilt}	Time until death
<i>Achillea millefolium</i>	12.49	0.00	142.9	142.9	102.6	62.5	7.7	0.8	0.05	0.02	-0.29	-0.76	29
<i>Asclepias syriaca</i>	19.84	0.62	346.7	330.1	141.9	72.6	11.1	2.8	0.06	0.05	-0.18	-0.80	51
<i>Campanula americana</i>	21.96	8.00	512.7	272.8	102.4	52.8	12.5	0.0	0.07	0.03	-0.24	-3.15	49
<i>Centaurea cyanus</i>	22.38	2.27	285.8	206.8	187.0	88.7	9.7	1.0	0.04	0.02	-0.27	-0.56	31
<i>Cerastium tomentosum</i>	19.39	0.00	176.2	176.2	90.3	65.3	7.4	2.0	0.04	0.03	-0.25	-6.12	59
<i>Chenopodium polyspermum</i>	29.65	4.88	437.0	290.4	56.4	-5.0	10.1	1.5	0.07	0.00	-0.24	-4.04	33
<i>Cistus salvifolius</i>	40.54	4.78	451.2	290.9	54.1	30.1	8.1	0.5	0.03	0.02	-0.29	-15.08	45
<i>Daucus carota</i>	22.53	0.00	231.6	231.6	193.7	36.3	14.3	-1.0	0.02	0.003	-0.19	-0.31	23
<i>Epilobium ciliatum</i> subsp. <i>glandulosum</i>	26.32	0.38	257.7	245.4	83.9	53.7	6.1	-1.1	0.04	0.01	-0.29	-6.63	42
<i>Erigeron canadensis</i>	6.80	1.92	169.3	108.6	54.4	51.6	8.9	-0.4	0.05	0.02	-0.19	-27.47	61
<i>Eupatorium perfoliatum</i>	22.01	5.79	397.4	220.8	145.6	12.0	8.7	0.3	0.05	0.00	-0.22	-0.26	49
<i>Hypericum perforatum</i>	19.99	2.77	358.0	273.8	92.9	81.5	6.1	-2.4	0.02	-0.02	-0.22	-15.76	41
<i>Jacquemontia gracillima</i>	21.47	0.43	329.2	318.1	41.1	11.5	10.2	0.1	0.05	0.02	-0.20	-5.18	31
<i>Lythrum salicaria</i>	30.58	0.00	361.1	361.1	91.8	52.7	10.5	0.2	0.03	0.02	-0.24	-6.19	44
<i>Medicago lupulina</i>	24.58	0.72	270.3	247.6	56.2	36.1	9.4	-1.0	0.04	0.00	-0.19	-10.10	40
<i>Medicago sativa</i>	26.41	3.45	325.7	211.6	76.4	29.2	13.9	-2.5	0.05	-0.01	-0.31	-3.38	33
<i>Melilotus albus</i>	23.04	0.00	265.9	265.9	46.5	28.7	12.0	-0.5	0.05	0.01	-0.25	-11.26	37
<i>Myagrum perfoliatum</i>	28.64	4.17	453.8	337.0	36.9	-5.5	14.5	0.3	0.05	0.04	-0.15	-3.91	29
<i>Nigella damascena</i>	13.41	0.93	203.9	178.1	40.5	15.4	13.8	-0.3	0.09	0.00	-0.14	-3.88	38
<i>Plantago lanceolata</i>	31.19	1.42	307.3	260.7	59.5	37.4	11.9	0.9	0.02	0.03	-0.30	-12.58	31
<i>Rumex acetosella</i>	30.70	0.00	286.4	286.4	117.4	17.0	11.9	0.8	0.05	0.04	-0.19	-0.78	28
<i>Scorzonerooides autumnalis</i>	31.68	1.00	231.1	199.4	95.0	18.0	7.7	1.9	0.05	0.06	-0.19	-2.01	38
<i>Silene vulgaris</i>	21.24	0.32	232.9	222.7	61.9	51.7	7.4	-0.3	0.06	0.01	-0.21	-21.62	46
<i>Stellaria media</i>	15.71	0.00	185.2	185.2	198.7	66.6	4.5	-1.7	0.05	0.00	-0.26	-0.19	28
<i>Trifolium pratense</i>	45.11	0.00	464.7	464.7	410.6	108.3	11.3	-0.5	0.05	0.01	-0.22	-0.31	26

Table B.2 : Traits used in the cumulative link model and path analysis. Taxonomic authorities are given in Table B.1.

Table B.3

Species name	Soil hydrology	Species score	P _{dry}	P _{med}	P _{wet}	Habitat group rating
<i>Achillea millefolium</i>	Dry	-5.24	0.499	0.475	0.026	Dry
<i>Asclepias syriaca</i>	Dry	-7.09	0.863	0.132	0.004	Dry
<i>Campanula americana</i>	Intermediate	-1.09	0.015	0.360	0.625	Wet
<i>Centaurea cyanus</i>	Intermediate	-4.24	0.267	0.666	0.067	Intermediate
<i>Cerastium tomentosum</i>	Dry	-8.87	0.974	0.025	0.001	Dry
<i>Chenopodium polyspermum</i>	Wet	-1.73	0.029	0.503	0.468	Intermediate
<i>Cistus salvifolius</i>	Dry	-5.08	0.459	0.511	0.030	Intermediate
<i>Daucus carota</i>	Intermediate	-5.20	0.488	0.485	0.027	Dry
<i>Epilobium ciliatum</i> subsp. <i>Glandulosum</i>	Wet	-2.54	0.063	0.657	0.281	Intermediate
<i>Erigeron canadensis</i>	Dry	-17.86	1.000	0.000	0.000	Dry
<i>Eupatorium perfoliatum</i>	Wet	2.67	0.000	0.013	0.986	Wet
<i>Hypericum perforatum</i>	Wet	-0.90	0.013	0.318	0.669	Wet
<i>Jacquemontia gracillima</i>	Intermediate	-4.05	0.231	0.689	0.080	Intermediate
<i>Lythrum salicaria</i>	Wet	-4.01	0.225	0.692	0.083	Intermediate
<i>Medicago lupulina</i>	Dry	-4.68	0.363	0.593	0.044	Intermediate
<i>Medicago sativa</i>	Intermediate	-0.37	0.008	0.218	0.774	Wet
<i>Melilotus albus</i>	Dry	-8.05	0.943	0.055	0.002	Dry
<i>Myagrurn perfoliatum</i>	Intermediate	-4.17	0.254	0.675	0.071	Intermediate
<i>Nigella damascena</i>	Intermediate	-4.55	0.333	0.617	0.050	Intermediate
<i>Plantago lanceolata</i>	Dry	-9.96	0.991	0.009	0.000	Dry
<i>Rumex acetosella</i>	Dry	-7.57	0.911	0.087	0.003	Dry
<i>Scorzonerooides autumnalis</i>	Dry	-10.57	0.995	0.005	0.000	Dry
<i>Silene vulgaris</i>	Dry	-11.97	0.999	0.001	0.000	Dry
<i>Stellaria media</i>	Intermediate	-1.88	0.033	0.536	0.431	Intermediate
<i>Trifolium pratense</i>	Intermediate	-3.36	0.132	0.721	0.147	Intermediate

Table B.3 : Scores, probabilities and ranking of the species. The predicted values of species score are calculated using Eqn.1 and 2a,b,c. Soil hydrology is the *a priori* classification we used in the study. Habitat group rating is the rating predicted by the model.

Appendix BC: R script for CLM, path analysis and other functions.

```
#####  
# Cumulative Link Model (CLM) [ordinal] on traits #  
#####  
library(ordinal)  
options(java.parameters = "-Xmx8000m")  
library(xlsx)  
dat<-read.xlsx2("data",sheetName="",colClasses=NA,as.data.frame=TRUE, header=TRUE)  
summary(dat)  
rownames(dat)<-dat$gen.esp  
dat$group<-as.ordered(dat$group)  
  
clm_dat<-clm(group~WUE_wilt+g_max+psi_wilt+g_wilt+a_max,data=dat)  
summary(clm_dat)  
clm_dat$coefficient  
clm_dat2<-clm(group~1,dat=dat)  
summary(clm_dat2)  
R2<-1-((clm_dat$logLik)/(clm_dat2$logLik))  
R2 # deviance explained by the model
```

```
#####  
# Path Analysis (sem) [ggm, lavaan + MCX2 function] #  
#####  
library(ggm)  
library(lavaan)  
options(java.parameters = "-Xmx8000m")  
library(xlsx)  
  
# Final Path Model  
my.mod<-"  
cote~g_max+WUE_wilt+psi_wilt+g_wilt+a_max  
a_max~g_max  
duration~psi_wilt  
WUE_wilt~a_wilt+g_wilt  
psi_wilt~g_wilt+a_wilt  
cote~~0*duration  
g_max~~0*g_wilt  
g_max~~0*a_wilt  
g_wilt~~0*a_wilt"  
  
fit<-sem(my.mod,data=dat,std.ov=T,fixed.x=F,estimator="MLM" )  
summary(fit,standardized=T,rsquare=T,fit.measure=T)  
  
# Final Path Model Diagram  
my.dag<-DAG(cote~g_max+WUE_wilt+psi_wilt+g_wilt+a_max,  
a_max~g_max,  
duration~psi_wilt,  
WUE_wilt~a_wilt+g_wilt,  
psi_wilt~g_wilt+a_wilt)  
drawGraph(my.dag,adjust=T)
```

```

#####
# MCX2 function for MonteCarlo simulation #
#####

function (model.df, n.obs, model.chi.square, n.sim = 10000)
{
x <- (-1 + sqrt(1 + 8 * model.df))/2
if ((x - as.integer(x)) == 0)
v <- x
if ((x - as.integer(x)) > 0 & (x - as.integer(x)) < 1)
v <- as.integer(x) + 1
if ((x - as.integer(x)) > 1)
return("error")
c.value <- v * (v + 1)/2 - model.df
MCX2 <- rep(NA, n.sim)
for (i in 1:n.sim) {
dat <- matrix(rnorm(n.obs * v), ncol = v)
obs.VCV <- var(dat)
model.VCV <- diag(v)
diag(model.VCV)[1:c.value] <- diag(obs.VCV)[1:c.value]
MCX2[i] <- (n.obs - 1) * (log(det(model.VCV)) + sum(diag(obs.VCV) * (1/diag(model.VCV)))) -
log(det(obs.VCV)) - v)
}
prob <- sum(MCX2 >= model.chi.square)/n.sim
x <- seq(0, max(MCX2))
theoretical.prob <- dchisq(x, model.df)
hist(MCX2, freq = F, ylab = "proportion of simulations",
xlab = "Maximum likelihood chi-square statistic", main = "Monte Carlo simulations",
ylim = c(0, max(theoretical.prob)), sub = paste(as.character(model.df), "df"))
lines(x, theoretical.prob, lty = 2)
lines(x = c(model.chi.square, model.chi.square), y = c(0,1), lwd = 2)
legend(x = "topright", legend = "theoretical X2 distribution", lty = 2)
list(MCprobability = prob, MLprobability = 1 - pchisq(model.chi.square, model.df))
}

# MonteCarlo simulation function (model.df, n.obs, model.chi.square, n.sim = 10000)
# with model.chi.square = "Minimum Function Test Statistic" from sem(fit)

MCX2(17, 25, 13.828, n.sim = 1000)

# $MLprobability = proba Loglikelihood from sem(fit) = 0.6792376
# $MCprobability = simulation de MonteCarlo = 0.774

```

ANNEXES C

-

APPENDICES TO CHAPTER 3 :

Content :

Table C.1 : Traits used in the analysis.

Table C.2 : References reporting correlations between variables included in our model (Fig. 3.3).

Table C.1

Species name	SLA	LDMC	LNC	Stom _{area}	SRL	g_s^{\max}	g_s^{wilt}	A_{\max}	A_{wilt}	WUE _{wilt}	Ψ_{wilt}
<i>Achillea millefolium</i>	42.51	0.091	37.03	592.48	119.15	142.92	102.55	7.66	0.80	0.018	-0.76
<i>Asclepias syriaca</i>	38.95	0.145	50.66	250.78	11.76	346.74	141.85	11.13	2.78	0.046	-0.80
<i>Campanula americana</i>	51.31	0.156	49.55	319.63	235.62	512.72	102.44	12.47	0.02	0.026	-3.15
<i>Centaurea cyanus</i>	41.68	0.082	50.73	350.37	70.76	285.78	186.96	9.70	0.98	0.018	-0.56
<i>Cerastium tomentosum</i>	45.60	0.102	31.85	354.39	156.25	176.20	90.34	7.36	1.95	0.032	-6.12
<i>Chenopodium polyspermum</i>	53.75	0.103	45.59	298.66	90.39	437.02	56.39	10.13	1.53	0.028	-4.04
<i>Cistus salvifolius</i>	27.40	0.244	10.42	320.11	103.51	451.23	54.06	8.14	0.47	0.022	-15.08
<i>Daucus carota</i>	38.57	0.131	38.90	231.34	161.81	169.26	54.41	8.86	-0.44	0.019	-27.47
<i>Epilobium ciliatum</i> subsp. <i>glandulosum</i>	37.49	0.164	36.11	281.71	26.79	231.57	193.74	14.29	-1.04	0.003	-0.31
<i>Erigeron canadensis</i>	33.48	0.172	24.29	123.76	217.19	257.72	83.95	6.07	-1.10	0.006	-6.67
<i>Eupatorium perfoliatum</i>	53.81	0.135	27.59	339.01	51.27	397.40	145.59	8.65	0.29	0.000	-0.26
<i>Hypericum perforatum</i>	85.10	0.157	34.59	139.66	141.72	358.04	92.87	6.05	-2.44	-0.020	-15.76
<i>Jacquemontia gracillima</i>	57.88	0.140	37.21	83.89	45.53	329.24	41.09	10.20	0.11	0.024	-5.18
<i>Lythrum salicaria</i>	59.44	0.122	43.03	377.57	18.64	361.15	91.84	10.46	0.15	0.019	-6.19
<i>Medicago lupulina</i>	45.78	0.189	42.46	116.38	87.60	270.33	56.24	9.42	-1.00	0.004	-10.10
<i>Medicago sativa</i>	55.08	0.169	45.96	148.03	16.37	325.68	76.43	13.93	-2.54	-0.009	-3.39
<i>Melilotus albus</i>	27.15	0.205	23.58	172.01	30.25	265.94	46.46	12.04	-0.50	0.015	-11.26
<i>Myagrurum perfoliatum</i>	41.66	0.068	48.68	266.08	51.82	453.83	36.85	14.45	0.27	0.036	-3.91
<i>Nigella damascena</i>	47.08	0.141	26.13	901.53	95.54	203.90	40.53	13.78	-0.25	0.003	-3.88
<i>Plantago lanceolata</i>	40.85	0.080	50.03	297.44	118.86	307.25	59.54	11.91	0.90	0.028	-12.58
<i>Rumex acetosella</i>	75.84	0.061	49.89	1017.48	71.90	286.42	117.41	11.86	0.77	0.041	-0.78
<i>Scorzoneroides autumnalis</i>	48.74	0.096	39.42	352.54	67.38	231.12	94.98	7.69	1.94	0.063	-2.01
<i>Silene vulgaris</i>	58.15	0.072	48.11	396.65	114.88	232.92	61.87	7.35	-0.29	0.013	-21.62
<i>Stellaria media</i>	78.31	0.073	42.23	660.05	113.77	185.15	198.75	4.50	-1.67	0.003	-0.19
<i>Trifolium pratense</i>	54.92	0.142	48.10	77.51	62.06	464.71	410.56	11.32	-0.51	0.009	-0.31

Table C.1 : Traits used in the analysis. Traits values are the mean of five individuals per species. Units are reported in Table 3.2.

Table C.2

Link to	from	Path coefficient sign	References	Information reported	Plant type, species, model
WUE _{wilt}	A_{wilt}	Positive	-	Mathematical relationship, WUE is calculated as net photosynthesis divided by stomatal conductance.	-
	g_s^{wilt}	Negative	-	Mathematical relationship, WUE is calculated as net photosynthesis divided by stomatal conductance.	-
g_s^{wilt}	LNC	Positive	Schulze <i>et al.</i> , 1994	Positive correlation between maximum stomatal conductance and leaf nitrogen content.	Multiple plant type.
			Kröber and Bruelheide, 2014	Positive correlation between maximum stomatal conductance and leaf nitrogen content.	39 evergreen and deciduous broadleaved subtropical tree species.
Ψ_{wilt}	A_{wilt}	Positive	Daly <i>et al.</i> , 2004	Leaf water potential = soil water potential (at night) ; maximum assimilation and minimum leaf water potential are covariant.	Meta-analysis of models found in the literature.
Ψ_{wilt}	$Stom_{are}$ _a	Positive	Mitchell <i>et al.</i> , 2008	Leaf water potential at turgor loss point correlate negatively with leaf water potential at full turgor.	Twenty study species incorporating a diversity of leaf types, taxa and growth habits.
			Galmés <i>et al.</i> , 2013	Negative correlation between $stom_{area}$ and $stom_{dens}$, positive correlation between $stom_{dens}$ and g_s^{max} . These two correlations lead to a negative correlation between $stom_{area}$ and g_s^{max} .	Ten Mediterranean species naturally occurring in the Balearic Islands including taxas representative of different growth forms and leaf habits.
g_s^{max}	LNC	Positive	Schulze <i>et al.</i> , 1994	Positive correlation between maximum stomatal conductance and leaf nitrogen content.	Multiple plant type.
			Kröber and Bruelheide, 2014	Positive correlation between maximum stomatal conductance and leaf nitrogen content.	39 evergreen and deciduous broadleaved subtropical tree species.
			Juhrbandt <i>et al.</i> , 2004	Positive correlation between maximum stomatal conductance and leaf nitrogen content and $stom_{dens}$, and negative with leaf size.	8 tree species abundant in early stages of secondary forest succession.

Link to	from	Path coefficient sign	References	Information reported	Plant type, species, model
g_s^{\max}	LDMC	Positive	Chaturvedi <i>et al.</i> , 2014	Positive correlation between maximum stomatal conductance and LDMC.	10 dominant tree species selected on site.
A_{\max}	SLA	Negative	Garnier <i>et al.</i> , 2016	Positive correlation between A_{\max} and SLA.	Multiple plant type.
			Wright <i>et al.</i> , 2004	Negative correlation between A_{\max} and LMA (1/SLA).	Multiple plant type.
A_{\max}	SLA	Negative	Tyree, 2007 (in Pugnaire and Valladares, 2007)	Negative correlation between LMA and A_{\max} .	Across ecologically and geographically broad species comparisons of high light-adapted species.
A_{\max}	LNC	Positive	Garnier <i>et al.</i> , 2016	Positive correlation between A_{\max} and LNC.	Multiple plant type.
			Wright <i>et al.</i> , 2004	Positive correlation between A_{\max} and LNC.	Multiple plant type.
A_{\max}	LDMC	Positive	Garnier <i>et al.</i> , 2016	Negative correlation between A_{\max} and LDMC.	Multiple plant type.
			Wright <i>et al.</i> , 2004	Negative correlation between A_{\max} and LDMC.	Multiple plant type.
A_{\max}	Stom _{area}	Positive	Garnier <i>et al.</i> , 2016	Positive correlation between g_s^{\max} and A_{\max} , positive correlation between g_s^{\max} and stom _{area} .	Six Ramellet tomato accessions.
A_{\max}	SRL	Negative	Alameda and Villar, 2012	SRL was positively related to photosynthesis ($R^2=0.34$ *) and transpiration rates.	Seedlings of a woody species (<i>Fraxinus angustifolia</i> Vahl.).
			-	SRL was positively correlated with the leaf water potential, indicating that longer and thinner roots can reduce the probabilities of reaching a water stress situation.	-
		Negative	Reich <i>et al.</i> , 1998	Positive correlation between A_{\max} and SRL ($R^2=0.79$ * and 0.97 *).	Nine species of Deciduous hardwood and Evergreen conifers.
A_{wilt}	SLA	Negative	Tyree, 2007 (in Pugnaire and Valladares, 2007)	As plants approach the wilt point there is a gradual loss in stomatal conductance and a reduction in photosynthetic rate.	-
A_{wilt}	LDMC	Negative	Garnier <i>et al.</i> , 2016	Negative correlation between A_{\max} and LDMC.	Multiple plant type.
			Wright <i>et al.</i> , 2004	Negative correlation between A_{\max} and LDMC.	Multiple plant type.

Link to	from	Path coefficient sign	References	Information reported	Plant type, species, model
SLA	LDMC	Negative	Garnier <i>et al.</i> , 2016	Negative correlation between SLA and LDMC.	Multiple plant type.
			Wright <i>et al.</i> , 2004	Negative correlation between SLA and LDMC.	Multiple plant type.
LNC	LDMC	Negative	Garnier <i>et al.</i> , 2016	Negative correlation between LNC and LDMC.	Multiple plant type.
			Wright <i>et al.</i> , 2004	Negative correlation between LNC and LDMC.	Multiple plant type.
LDMC	Stom _{area} _a	Negative	Römermann <i>et al.</i> , 2016	Positive correlation between LDMC and stom _{area} (stomatal size ~ LDMC, R ² = 0.03 **)	15 summer green woody species.

Table C.2 : References reporting correlations between variables included in our model (Fig. 3.3). The columns "Link to" and "from" report the causal links presented in the path diagram (Fig. 3.3). The "Path coefficient sign" column reports the sign of the causal link presented in the model. The last two columns report the information on correlations found in the cited literature, as well as the type of plant, species or model used. All references are listed below.

References

- Alameda, D., and Villar, R. (2012). Linking root traits to plant physiology and growth in *Fraxinus angustifolia* Vahl. seedlings under soil compaction conditions. *Environ. Exp. Bot.* 79, 49–57.
- Chaturvedi, R.K., Raghubanshi, A.S., and Singh, J.S. (2014). Relative effects of different leaf attributes on sapling growth in tropical dry forest. *J. Plant Ecol.* 7, 544–558.
- Daly, E., Porporato, A., and Rodriguez-Iturbe, I. (2004). Coupled Dynamics of Photosynthesis, Transpiration, and Soil Water Balance. Part I: Upscaling from Hourly to Daily Level. *J. Hydrometeorol.* 5, 546–558.
- Galmés, J., Ochogavía, J.M., Gago, J., Roldán, E.J., Cifre, J., Conesa, M.À., Ochogavía, J.M., Gago, J., Roldán, E.J., Cifre, J., et al. (2013). Leaf responses to drought stress in Mediterranean accessions of *Solanum lycopersicum*: anatomical adaptations in relation to gas exchange parameters. *Plant, Cell Environ.* 36, 920–935.
- Garnier, E., Navas, M.-L., and Grigulis, K. (2016). Plant functional diversity: organism traits, community structure, and ecosystem properties. (Oxford University press, Oxford, UK.).
- Juhrbandt, J., Leuschner, C., and Hölscher, D. (2004). The relationship between maximal stomatal conductance and leaf traits in eight Southeast Asian early successional tree species. *For. Ecol. Manage.* 202, 245–256.
- Kröber, W., and Bruelheide, H. (2014). Transpiration and stomatal control: A cross-species study of leaf traits in 39 evergreen and deciduous broadleaved subtropical tree species. *Trees - Struct. Funct.* 28, 901–914.
- Mitchell, P.J., Veneklaas, E.J., Lambers, H., and Burgess, S.S.O. (2008). Leaf water relations during summer water deficit: Differential responses in turgor maintenance and variation in leaf structure among different plant communities in south-western Australia. *Plant, Cell Environ.* 31, 1791–1802.
- Reich, P.B., Walter, M.B., Tjoelker, M.B., Vanderklein, D., and Buschena, C. (1998). Photosynthesis and respiration rates depend on leaf and root morphology and nitrogen concentration in nine boreal tree species differing in relative growth rate. *Funct. Ecol.* 12, 395–405.

- Römermann, C., Bucher, S.F., Hahn, M., and Bernhardt-Römermann, M. (2016). Plant functional traits - fixed facts or variable depending on the season? *Folia Geobot.* 51, 143–159.
- Schulze, E.D., Kelliher, F.M., Körner, C., Lloyd, J., and Leuning, R. (1994). Relationships among maximal stomatal conductance, carbon assimilation rate, and plant nitrogen nutrition: A global ecology scaling exercise. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 25, 629–660.
- Tyree, M.T. (2007). Chapter 6 : Water Relations and Hydraulic Architecture. In *Functional Plant Ecology*, Second Edition, F.I. Pugnaire, and F. Valladares, eds. (CRC Press, New York, USA.), pp. 175–211.
- Wright, I.J., Reich, P.B., Westoby, M., Ackerly, D.D., Baruch, Z., Bongers, F., Cavender-bares, J., Chapin, T., Cornelissen, J.H.C., Diemer, M., et al. (2004). The worldwide leaf economics spectrum. *Nature* 428, 821–827.

ANNEXES D

-

PREDICTING HABITAT AFFINITIES OF PLANT SPECIES USING COMMONLY MEASURED FUNCTIONAL TRAITS

Predicting habitat affinities of plant species using commonly measured functional traits

[Citation]

Bill Shipley ; Michael Belluau ; Ingolf Kühn ; Nadejda A. Soudzilovskaia ; Michael Bahn ; Josep Penuelas ; Jens Kattge ; Lawren Sack ; Jeannine Cavender ; Wim A. Ozinga ; Benjamin Blonder ; Peter M. van Bodegom ; Peter Manning ; Thomas Hickler, ; Enio Sosinski ; Valério De Patta Pillar ; Vladimir Onipchenko ; Peter.Poschlod

Abstract

Questions. Heinz Ellenberg classically defined “indicator” scores for species representing their typical positions along gradients of key environmental variables, and these have proven very useful for designating ecological distributions. We tested a key tenant of trait-based ecology, i.e., the ability to predict ecological preferences from species’ traits. More specifically, can we predict Ellenberg indicator scores for soil nutrients, soil moisture and irradiance from four well-studied traits: leaf area, leaf dry matter content, specific leaf area and seed mass? Can we use such relationships to estimate Ellenberg scores for species never classified by Ellenberg?

Location. Global

Methods. Cumulative link models were developed to predict Ellenberg nutrients, irradiance and moisture values from Ln-transformed trait values using 922, 981 and 988 species respectively. We then independently tested these prediction equations using the trait values of 423 and 421

new species that occurred elsewhere in Europe, North America and Morocco and whose habitat affinities we could classify from independent sources as 3-level ordinal ranks related to soil moisture and irradiance. The traits were specific leaf area, leaf dry matter content, leaf area and seed mass.

Results. The four functional traits predicted the Ellenberg indicator scores of site fertility, light and moisture with average error rates of < 2 Ellenberg ranks out of 9. We then used the trait values of 423 and 421 species respectively that occurred (mostly) outside of Germany but whose habitat affinities we could classify as 3-level ordinal ranks related to soil moisture and irradiance. The predicted positions of the new species, given the equations derived from the Ellenberg indices, agreed well with their independent habitat classifications, although our equation for Ellenberg irradiance levels performed poorly on the lower ranks.

Conclusions. These prediction equations, and their eventual extensions, could be used to provide approximate descriptions of habitat affinities of large numbers of species worldwide.

Introduction

Plant ecology, emerging from plant geography, has existed as an academic discipline for more than a century (Warming et al, 1909). A major recurring theme in this discipline is that plant species are differentially distributed along important abiotic gradients with respect to the most common environmental variables that control plant growth and survival. Given this history, one might think that basic information concerning the range and modal values of most plant species along such abiotic gradients (i.e. their habitat “affinities”) would be generally available. In fact, such basic ecological information is often missing with the exception of species like aquatics, desert species, or understory herbs that are restricted to clearly differentiated habitats.

One exception is the German flora. Heinz Ellenberg (1988, 1978, 1992), working with this flora, defined a series of ordinal scales for seven major environmental variables (irradiance level; soil moisture, pH, nitrogen availability, soil salinity; average yearly temperature and continentality). He then assigned a single “indicator” score for each species with respect to each environmental value identifying position along the environmental gradient at which the species was most common. These indicator scores can be viewed collectively as very approximate descriptions of

the mode of the realized Hutchinsonian niche (Hutchinson 1957) of each species. The scales are ordered and go from one (lowest level) to nine (highest level) except for moisture which goes to 12 (see Supplementary material below). We use three Ellenberg indicator scores that are directly linked to resource capture: “nitrogen” (better interpreted as a description of site productivity or soil nutrient levels), “irradiance” and “moisture”. Ellenberg values have proven very popular since Ellenberg’s (1988, 1978) original references have been cited over 7000 times in the ecological literature.

These ordinal scales, and the indicator value assigned to a species for a given scale, were not based on direct physical measurements of the environment but rather on Ellenberg’s own field observations with input from his collaborators. Ellenberg indicator scores, being based on expert opinion rather than direct physical measurement of the abiotic variables, require the sort of extensive and exhaustive knowledge of a local flora that takes a lifetime to obtain, and that few people possess. Their subjective nature also makes them very difficult to generalize to new geographical locations in a way that is comparable (Valladares *et al.*, 2008). Strictly speaking, since these are expert *opinions* rather than objective *measurements*, the only people who could to truly extend such indicator scores to new locations would be Heinz Ellenberg (who died in 1997), or someone who trained with him. Similar, but not identical, schemes have been produced for other European countries such as Austria (Karrer 1992), Switzerland (Landolt 1977) Italy (Guarino *et al.*, 2012; Pignatti, 2005) and Poland (Zarzycki *et al.*, 2002).

Despite the subjective nature of Ellenberg indicator scores, a number of independent publications have shown that average Ellenberg numbers, based on weighted or unweighted vegetation relevés, do correlate well with more explicit environmental measurements (Bartelheimer *et al.*, 2014 ; Carpenter *et al.*, 2014 ; Douma *et al.*, 2012 ; Ertsen *et al.*, 1998 ; Franzaring *et al.*, 2007). Mean Ellenberg indicator scores of plots in a large vegetation dataset representing all terrestrial habitats across the Netherlands were also highly correlated to the position of plots across the main gradients in species composition as revealed by ordination models (Ozinga *et al.*, 2005). Although Ellenberg indicator scores are only approximate and non-metric descriptions of the mode of a species’ distribution along such environmental gradients, they might better integrate the effect of temporal and spatial variation of such environmental conditions on plant performance in ways that more explicit but short-term

environmental measurements cannot. Some of the environmental properties referenced by Ellenberg indicator scores can be measured using well-established methods and are sufficiently stable in time and well-defined (soil pH or salt content) that they can be directly measured using samples taken at a single point in time. Habitat affinities based on such direct measurements are rare in practice because one must take them over large spatial extents in order to properly quantify the distribution of a species along such gradients and to identify the values at which a species reaches maximum abundance. Other variables, such as soil moisture, irradiance level or temperature, can be measured using well-established methods. However, they are so temporally and spatially variable that one would require both spatially extensive sampling and long-term monitoring in order to quantify them in a way that is meaningful to plant performance; such studies are even rarer. Finally, even if the above practical problems can be overcome, there does not even exist a generally-accepted method of quantifying an important soil property like soil nutrient availability (or “fertility”), which is determined by a complicated interaction of both a number of soil properties (Fujita *et al.*, 2013) and plant and fungal properties that enable uptake of different limiting nutrients. Such difficulties explain, in large part, why we do not yet possess even basic information concerning the habitat affinities of most plant species and why we are unlikely to fill this knowledge gap in the near future. If this is true, then can we generalize this expert knowledge to new geographical areas?

One method, developed by Hill *et al.*, (1999) for the British flora, uses co-occurrence data of vegetation, in conjunction with the Ellenberg indicator scores of the subset of species for which this information is available, to generalize to new species and to adjust the values of other species as needed. Although this method worked well for the British flora, which contains many species in common with the German flora, it would not work when extrapolating to geographical areas with few or no species for which Ellenberg numbers are available. Another method (Klaus *et al.*, 2012) of generalizing Ellenberg numbers to new locations was based on calibration curves linking Near Infrared Spectrometric signatures (NIRS) of vegetation samples in Germany with averaged Ellenberg values of these samples. In this paper we evaluate a trait-based method for predicting Ellenberg indicator scores and evaluate its potential to predict habitat affinities of new species around the world for which Ellenberg indicator scores do not exist.

A functional trait is any phenotypic attribute, measurable on an individual plant, that affects its growth, survival or reproductive success and thus its fitness in a given environmental context (Violle *et al.*, 2007). Extrapolating to all individuals of a given species in a local area, such functional traits affect the demographic performance of the species and so a basic postulate of trait-based ecology is that a species' demographic performance along major environmental gradients is partly determined by the values of at least some of its functional traits at some stage in its ontogeny (Grime 1979). Ideally, when estimating a species' habitat from its traits, one would choose traits that are simultaneously the most important mechanistic determinants of plant fitness along the chosen environmental gradients, are widely measured for many plant species, and are easily measurable for new species. In practice these criteria are often strongly conflicting. For instance, the ability to survive and grow in drying soils is partly determined by physiological properties related to leaf gas exchange, turgor maintenance, and the hydraulic conductivity of water through its roots, stem and leaves (Bartlett *et al.*, 2012). However, such traits are not currently available for most species, necessitating approaches from more widely measured traits for large-scale prediction, such that additional traits can be utilized as they become available.

In this study, we evaluate four widely measured traits (leaf area, leaf dry matter content, specific leaf area and seed mass) as predictors of Ellenberg indicator scores for light, soil moisture and soil nutrient availability. Average values of each of these traits are already available for large numbers of plant species worldwide, each can be quickly and easily measured with minimal cost, and each has been shown to vary along these environmental gradients for at least some sites and combinations of species as reviewed in Garnier and Navas (2013). For instance, small leaf size has often been associated with dry (Greive, 1956 ; Monk, 1966 ; Scoffoni *et al.*, 2011) and/or nutrient-poor soils (McDonald *et al.*, 2003). Species having large leaves or large SLA are often associated with low light conditions (Hodgson *et al.*, 2011). Increasing SLA and decreasing LDMC have been associated with higher soil fertility (Hodgson *et al.*, 2011). Larger seeds have been associated with dry, poorer soils and more shaded habitats (Tautenhahn *et al.*, 2008).

Methods

Data base for developing prediction equations

The trait data for specific leaf area (SLA, $\text{mm}^2 \text{mg}^{-1}$), leaf dry matter content (LDMC, g g^{-1}), leaf area (LA, mm^2) and seed mass (SM, mg) were previously published values obtained from the TRY database (Kattge *et al.*, 2011), www.try-db.org, accessed 10/07/2013. We calculated the mean value for each species across all observations of the species in TRY. We used Ellenberg indicator scores that can be directly related to resource availability: irradiance (light) level, soil nutrients and moisture, which take integer values from 1 to 9. Although the full range of Ellenberg indicator scores for moisture go to 12, we excluded aquatics, thus limiting this indicator range to 9. Note that Ellenberg (1978) originally described one of his indices an index of soil nitrogen but this index is more properly interpreted as a more general description of soil fertility, soil nutrient availability or site productivity (Hill *et al.*, 1999, Schaffers *et al.*, 2000) and is here called a “nutrient” index. These Ellenberg indicator scores are ordinal scores and their English descriptions are given in Appendix 1. The TRY database contains Ellenberg numbers for 1835 species.

We chose four traits that previous authors have associated with one or more of these resources and that were sufficiently documented in the TRY database along with the Ellenberg values: specific leaf area (SLA, $\text{mm}^2 \text{mg}^{-1}$), leaf dry matter content (LDMC, g g^{-1}), leaf area (LA, mm^2) and seed mass (SM, mg). We then calculated the mean value of each trait. Other plant traits from the TRY database that can reasonably be linked to these resource gradients, such as leaf nitrogen concentration, leaf thickness, net photosynthetic rate or leaf lifespan, did not have sufficient coverage with respect to the Ellenberg indicator scores and so were not included in this analysis. For instance, the total number of species with complete data with respect to Ellenberg nutrients goes from 922 using our chosen four traits to 399 if we include leaf nitrogen content and to only 55 if we also include leaf lifespan. Finally, since the relationships between traits and habitat affinities might differ between different basic plant types, we included the “graminoid/herb/shrub/tree” classification in TRY as a categorical factor. A few species, classified as “ferns” were excluded since they do not have a seed size. A few species,

ambiguously classified as “herb/shrub” or “shrub/tree”, were classified as “herbs” and “trees” respectively. The number of species having complete coverage for all four traits and each Ellenberg score, as well as the distribution of species among the different Ellenberg scores, are given in Table C.1. Of the three Ellenberg scores, the distribution of species for Ellenberg irradiance was the most problematic, since 86% of the 981 species had Ellenberg scores of 6 or more.

Table C.1 : The number of species (% of total) having complete information on the four traits and for which the Ellenberg scores for nutrients, moisture and light are known.

Ellenberg score	Soil nutrients	Habitat moisture	Irradiance level
1	48 (5.2%)	2 (0.2%)	1 (0.1%)
2	141 (15.3%)	36 (3.6%)	6 (0.6%)
3	127 (13.8%)	130 (13.2%)	19 (1.9%)
4	128 (13.9%)	214 (21.7%)	60 (6.1%)
5	141 (15.3%)	228 (23.1%)	51 (5.2%)
6	111 (12.0%)	107 (10.8%)	141 (14.4%)
7	118 (12.8%)	88 (8.9%)	317 (32.3%)
8	85 (9.2%)	92 (9.3%)	276 (28.1%)
9	23 (2.5%)	91 (9.2%)	110 (11.2%)
Total	922	988	981

Statistical analysis and development of the prediction equations

Since the Ellenberg values are only ordered ranks, we used cumulative link models to predict these Ellenberg scores from the four traits. This was done using the *clm* function of the ordinal library (Christensen 2015) of R. Cumulative link models are generalizations of maximum likelihood logistic regression to more than two ordered states (Agresti 2002). Given an Ellenberg scale with 9 ordered states ($j=1,9$), the probability that species i will be found in a state less than, or equal to level j , given its trait values is given in Equation 1. Here we present only the simplest version in Equation 1 but this can be generalized to include the “plant form” factor and any combination of interaction terms, just as in any other generalized linear model. LS_i is the latent score for species i , α_i is the intercept, or “threshold value”, i.e. the value of the latent score for which a species has a higher probability of being classified in state j than in a lower state, and β 's are partial slopes. The latent score can be interpreted as the predicted

position of a species along the unmeasured latent environmental gradient, measured on a continuous scale as defined by the traits, and which is then divided into ordinal classes as represented by the Ellenberg indicator scores. The probability of a species i being associated with each state j of an Ellenberg scale is given in Equation 2.

$$LS_i = \beta_1 \ln(LA_i) + \beta_2 \ln(LDMC_i) + \beta_3 \ln(SLA_i) + \beta_4 \ln(SM_i)$$

$$p_i(\leq j) = \frac{e^{\alpha_j - LS_i}}{1 + e^{\alpha_j - LS_i}} \quad (1a,b)$$

$$p_i(j=1) = p_i(\leq 1)$$

$$p_i(j) = p_i(\leq j) - p(\leq j-1); 1 < j < 9 \quad (2a,b,c)$$

$$p_i(j=9) = 1 - p(\leq 8)$$

To use these prediction equations for a new species, once parameterized, one would first enter its trait values in equation 1a to get the latent score (LS_i), then enter this latent score into equation 1b to obtain the probability that this species has an Ellenberg indicator value of j or less. To obtain the probability that the species has an Ellenberg indicator value of exactly j , one would apply equations 2a,b,c. A worked example is provided in the Appendix. These calculations are automated using the “predict” function associated with the `clm` function in R. Although a very large number of possible models can be generated given four traits plus the categorical “plant type” including all possible interactions, we present two for each Ellenberg indicator variable: (i) a simplified model involving only the four traits as main effects for each of the four plant types and (ii) the best model, based on AIC values and obtained using the “stepAIC” function in the MASS library of R (Venables *et al.*, 1994). Given the large sample sizes and resulting statistical power, this second model was invariably more complicated and involved several higher-order interaction terms.

Evaluating predictive error

The above equations only predict the probability that any species will be classified into each level of a given Ellenberg scale. By multiplying each level ($j=1$ to 9) to the predicted probability

(p_{ij}) of a species i being classified into each level, i.e. ($\hat{s}_i = \sum_j j \cdot p_{ij}$) we get the mean predicted

Ellenberg score for each species, which varies continuously from 1 to 9. To determine how well the average predicted score of the species agrees with the actual scores (s_i), we estimated the distribution of errors as the percentage of species having a given difference between the observed (s_j) and predicted scores and the mean predictive error (MPE, Equation 3) of cross-validated models (see below), which measures the average error (number of Ellenberg levels) between the observed (s) and predicted scores.

$$MPE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (s_i - \bar{s}_i)^2}{n}} \quad (1a,b)$$

Independent validation of the prediction equations

We evaluated the predictive ability of our equations with respect to independent observations in two ways. First, we used cross-validation; i.e. we randomly chose 80% of our data to fit the equation and then used these parameterized equations to predict the mean Ellenberg scores of the remaining 20%, after which we calculated the mean predictive error. We did this 100 times, each time randomly subdividing the data into the calibration and evaluation subsets. This determines the likely error rate when extending the equations to new species whose Ellenberg values are known.

However, the main objective of the study was to extend our predictive ability to species that were never classified by Ellenberg, including species that are found outside of central Europe. We therefore identified species for which we had trait data but for which Ellenberg values did not exist, and for which we could obtain habitat descriptions. Such habitat descriptions are very approximate (“understory species”, “typically found in wetlands” etc.) and not as detailed as those of Ellenberg. We therefore concentrated on species with clearly different habitat affinities. First, we identified 1134 species in the TRY database for which there was information on all four traits but for which Ellenberg scores were missing. Of these 1134 new species, we then identified 55 species, mostly in North America, for which available habitat descriptions (local

floras, field guides, online sites such as that managed by the United States Department of Agriculture) clearly indicate that they are most commonly found in wet, but not permanently inundated, soils (approximately Ellenberg moisture values of >6) and 43 species that are most commonly found in shaded or partially shaded habitats (approximately Ellenberg irradiance values of <5). Next, using the same 1134 species from the TRY database, we combined this with the BiolFlor data base (Klotz *et al.*, 2002; www.ufz.de/biolflor). We used the BiolFlor information on “phytosociological affinity” of the plant species following Schubert *et al.* (2001) and classified each of the phytosociological classes (i.e. habitat types) either as “wet” or “shaded” with values “yes”, “no”, “indifferent” or “unknown”, respectively. Then we simply counted the number of “yes” and “no” occurrences of the species in the habitat types, because species can occur in several habitats. Knowing the species from extensive field experience, classifying species with more “yes” than “no” counts for “wet” habitats and more or equal counts of “yes” compared to “no” for shaded habitats proved to yield sensible results in classifying them. This gave us a further 55 and 296 species classified as occurring or not occurring on wet soils, 87 and 264 species classified as occurring or not occurring in shaded habitats. Finally, we used the data set of Frenette-Dussault *et al.* (2013) consisting of 34 species of the Moroccan steppe, close to the Saharan desert, which has very dry and nutrient-poor soils and uniformly low and sparse vegetation growing in full sun. The predicted mean Ellenberg scores (Eqn. 1) for all of these species with respect to soil moisture and light were then calculated.

If the prediction equations can be generalised then the predicted mean Ellenberg scores of these species with respect to Ellenberg moisture should be lowest for the Moroccan species, be higher for the TRY “non-wetland” species, and be highest for the “wetland” species. If the prediction equations can be generalised then the mean Ellenberg scores with respect to irradiance should be lowest for the “shade” species, be larger for the “non-shade” species, and be highest for the Moroccan species. Finally, the mean Ellenberg nutrient scores should be lower in the Moroccan steppe species than in the other species. Since the mean predicted Ellenberg scores for both moisture and light were approximately normally distributed, we tested the hypothesised differences in the latent scores using one-way ANOVA followed by Tukey post-hoc tests.

Table C.2 : Results of the cumulative link model (Equations 1 and 2), giving the probabilities that a species with given ln-transformed values of leaf area (LA, mm²), leaf dry matter content (LDMC, g g⁻¹), specific leaf area (SLA, mm² mg⁻¹) and seed mass (SM, mg) would be classified in each of the nine ordinal Ellenberg classes for site irradiance level (light), site soil nutrients, and soil moisture level. Shown are the maximum likelihood values for each of four plant types (H= herb, G=graminoid, S=shrub, T=tree. of the partial slopes associated with each of the four ln-transformed traits and their interactions which together give the latent score. Also shown are the “threshold values” or intercepts; thus “x|y” (eg. 1|2) gives the value of the latent score, calculated from the partial slopes and trait values, at which a species is more likely to be in Ellenberg state 2 rather than 1. Two sets of models are shown: a simplified model that doesn’t include interactions between traits and the best model as determined by AIC values. MPE gives the mean predictive error for each model.

Simplified model without interactions												
Term	Ellenberg nutrients				Ellenberg light				Ellenberg soil moisture			
	G	H	S	T	G	H	S	T	G	H	S	T
intercept	0	0.5	0.47	3.83	0	-3.57	-8.36	-8.41	0	-7.14	-3.95	-3.23
ln(LA)	0.67	0.44	0.59	0.38	-0.77	-0.17	-0.21	-0.75	0.16	0.21	0.06	0.37
ln(LDMC)	-1.52	-0.65	0.04	1.33	-0.48	-0.39	-2.84	1.03	-0.48	-0.18	0.41	0.53
ln(SLA)	0.73	1.4	1.45	0.82	-2.16	-2.15	-1.41	0.9	-0.63	1.32	1.22	0.42
ln(SM)	0.1	0.09	-0.14	-0.12	0.04	-0.09	-0.18	-0.08	-0.3	-0.15	-0.14	-0.17
Threshold coefficients												
1 2	5.27				-18.41				-7.41			
2 3	7.2				-16.45				-4.41			
3 4	8.12				-15.09				-2.68			
4 5	8.88				-13.72				-1.43			
5 6	9.68				-13.11				-0.37			
6 7	10.37				-12.05				0.18			
7 8	11.41				-10.41				0.74			
8 9	13.18				-8.45				1.6			
AIC	3568.02				3061.75				3773.2			
MEP	1.81				1.3				1.8			

Best model using AIC													
Term	Ellenberg nutrients				Ellenberg light				Ellenberg soil moisture				
	G	H	S	T	G	H	S	T	G	H	S	T	
intercept	0	2.13	6.95	1.13	0	59.5 7	42.52	3	173.7	0	9.15	7.05	4.32
A=ln(LA)	0.82	0.04	0.66	1.06	8.73	0.17	3.46	17.9	1.84	1.84	1.84	1.84	
B=ln(LDMC)	-	-	-	-	-	-	-	127.5	-	-	-	-	-
C=ln(SLA)	8.94	5.12	0.48	9.22	42.12	3.27	4.05	2	3.82	3.99	4.66	4.18	
D=ln(SM)	0.25	1.66	1.96	0.54	19.52	-2.04	3.74	-33.31	4.94	2.35	2.31	3.18	
A*B	0.52	0.52	0.52	0.52	-28.3	3.54	11.51	-41.67	0.08	0.38	0.25	0.05	
A*C	0.64	0.17	0.46	1.04	6.12	-0.51	-0.03	-17.34	0.94	0.94	0.94	0.94	
A*D	0.24	0.24	0.24	0.24	-3.36	-0.11	-1.44	4.94	0.7	0.7	0.7	0.7	
B*C	0.04	0.04	0.04	0.04	4.02	-0.98	0.47	5.57	0.07	0.07	0.07	0.07	
B*D	1	1	1	1	14.5	-0.8	-1.55	-38.38	1.56	1.56	1.56	1.56	
C*D	0.24	0.24	0.24	0.24	26.05	0.95	18.64	-35.12	1.32	1.63	0.95	1.02	
A*B*C	0.19	0.19	0.19	0.19	8.39	-1.26	3.65	13.17	0.42	0.42	0.42	0.42	
A*B*D	-	-	-	-	-2.16	0.4	-0.1	5.3	0.32	0.32	0.32	0.32	
A*C*D	-	-	-	-	3.52	-0.43	1.7	4.48	0.08	0.08	0.08	0.08	
B*C*D	-	-	-	-	-1.14	0.33	-0.15	-1.79	0.08	0.08	0.08	0.08	
A*B*C*D	-	-	-	-	7.74	-0.33	6.11	11.39	0.27	0.27	0.27	0.27	
A*B*C*D	-	-	-	-	-1	0.15	-0.56	-1.46	-	-	-	-	
Threshold coefficients													
1 2	9.54				43				-19.7				
2 3	11.5				44.96				-16.59				
3 4	12.43				46.34				-14.8				
4 5	13.2				47.83				-13.52				
5 6	14.01				48.5				-12.43				
6 7	14.72				49.62				-11.86				
7 8	15.76				51.36				-11.29				
8 9	17.55				53.42				-10.4				
AIC	3559.16				3054.74				3744.86				
MEP	1.77				1.27				1.76				

Table C.3 : Levels of prediction error in cross-validated data (100 independent runs, 20% of data for each run) for the Ellenberg scores of soil nutrients, habitat moisture, and irradiance, each having 9 levels. The first column (“Error” is the difference in the observed and predicted Ellenberg score; thus, 1=the predicted score is within 1 score of the real score, etc. Subsequent columns give the percent of the cross-validated observations having this level of prediction error (cumulative percent error). These error rates are given for both the AIC-selected models and the simplified models.

Error	soil nutrients		Habitat moisture		Irradiance level	
	AIC-selected	simplified	AIC-selected	simplified	AIC-selected	simplified
0	39.5	38.4	45.2	41.6	63.7	59.1
1	34.3 (73.8)	34.9 (73.2)	28.0 (73.2)	29.6 (71.2)	26.1 (89.9)	29.4 (88.5)
2	16.9 (90.7)	16.9 (90.1)	17.1 (90.3)	19.8 (91.0)	6.7 (96.5)	8.0 (96.5)
3	6.8 (97.5)	7.3 (97.4)	7.1 (97.4)	6.8 (97.8)	2.4 (98.9)	2.4 (98.9)
4	2.3 (99.8)	2.4 (99.8)	2.2 (99.6)	2.0 (99.9)	1.1 (100.0)	1.1 (100.0)
5	0.2 (100.0)	0.2 (100.0)	0.4 (100.0)	0.1 (100.0)	0	0

Results

Table C.2 presents the cumulative link models. Two models are presented for each gradient: a “simplified” model (i.e. each trait without interactions between them, but including differences in slopes between plant types) and the model having the best AIC score, which is always more complicated. All coefficients in these models, except for the partial slope associated with seed mass for the Ellenberg nutrient scores, are significantly different from zero ($p < 0.05$). The average predictive error of these models, based on 100 independent cross-validation runs, varied between 1.3 (light) to 1.8 (nutrients, moisture) Ellenberg ranks. Table C.3 presents the distribution of errors for each model and Figure C.1 shows the predicted vs. observed cross-validated values for the AIC-selected models. Between 70% (soil fertility and moisture) and 90% (irradiance) of the cross-validated predictions were within one Ellenberg rank of the actual value and at least 90% were within two Ellenberg ranks. The prediction errors for the simplified models were very similar to the more complicated models, showing that the more complicated models, while capturing statistically significant effects, provided only minor improvements in predictive ability.

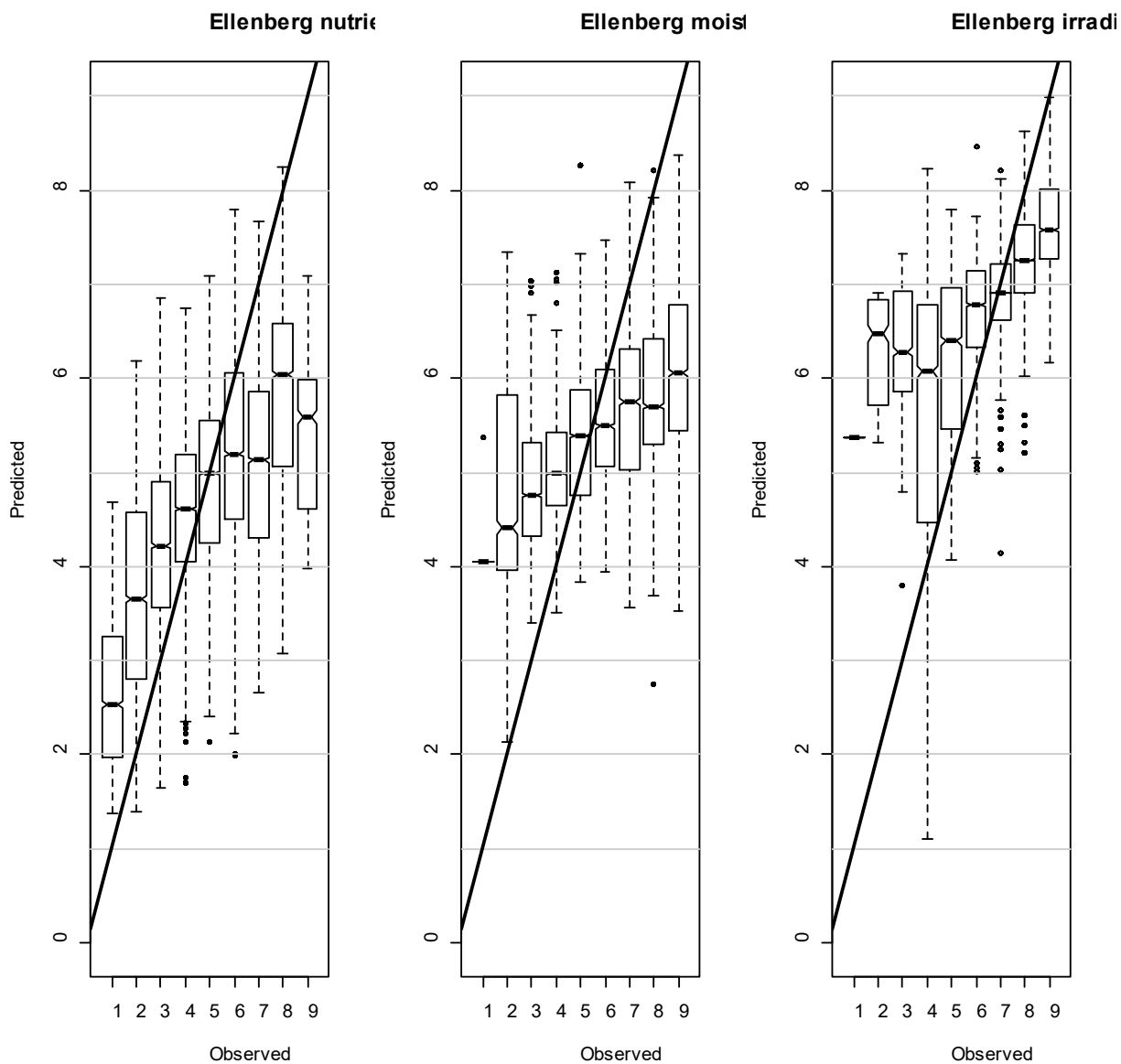


Figure D.1 : The observed Ellenberg indicator values for soil nutrient, soil moisture and irradiance plotted against the mean Ellenberg indicator values predicted by four traits: specific leaf area, leaf dry matter content, leaf area and seed mass. Results based on 922 (nutrients), 981 (moisture) and 988 (irradiance) species.

In order to illustrate the trait – environment relationships predicted by the models, we plotted the predicted Ellenberg scores as a function of the levels of variation in each trait for each plant type while fixing the other traits at their mean values. The results are shown in Figures C.2 – C.4. In general, both increasing leaf size and decreasing LDMC (i.e. less dense leaf tissues) indicated habitat preferences for soils that were wetter and with more nutrients, i.e. more productive habitats. These two traits did not respond strongly to changing irradiance levels. The only exceptions were in the trees, whose LDMC values increased with increasing habitat productivity and the graminoids, whose leaf areas decreased with increasing light levels.

Increasing SLA (panel C of figures C.2 - C.4) coincide with an affinity for habitats having wetter, more fertile soils and also lower light levels. Two partial exceptions were seen in the graminoid species and the trees. SLA in the graminoid species and trees was relatively unresponsive to soil nutrient levels and SLA actually decreased with increasing moisture levels in the graminoids.

Seed size was the least informative trait with respect to the three Ellenberg gradients. It decreased with increasing soil moisture (except for the herbs) but was largely unresponsive to soil nutrients and decreased only slightly (and not at all for the herbs and shrubs) with increasing light levels.

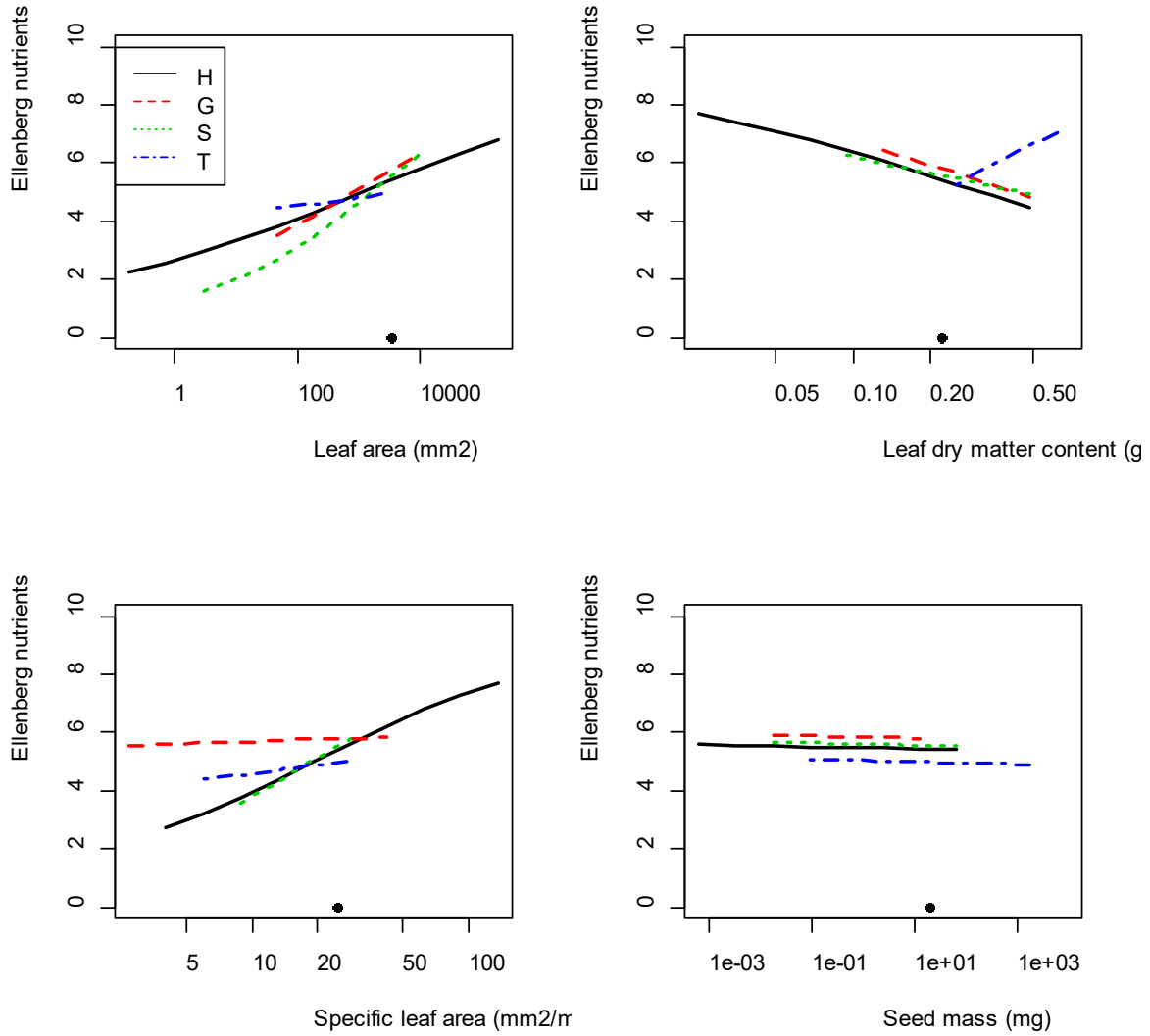


Figure D.2 : The predicted Ellenberg indicator values for soil nutrient status as a function of each plant trait. Results are shown for four plant types (H: herbs, G: graminoids, S: shrubs, T: trees). Each line shows the response for that trait when holding constant the other traits at their mean values in the data set. The mean value of each trait is shown by the dot on the x-axis.

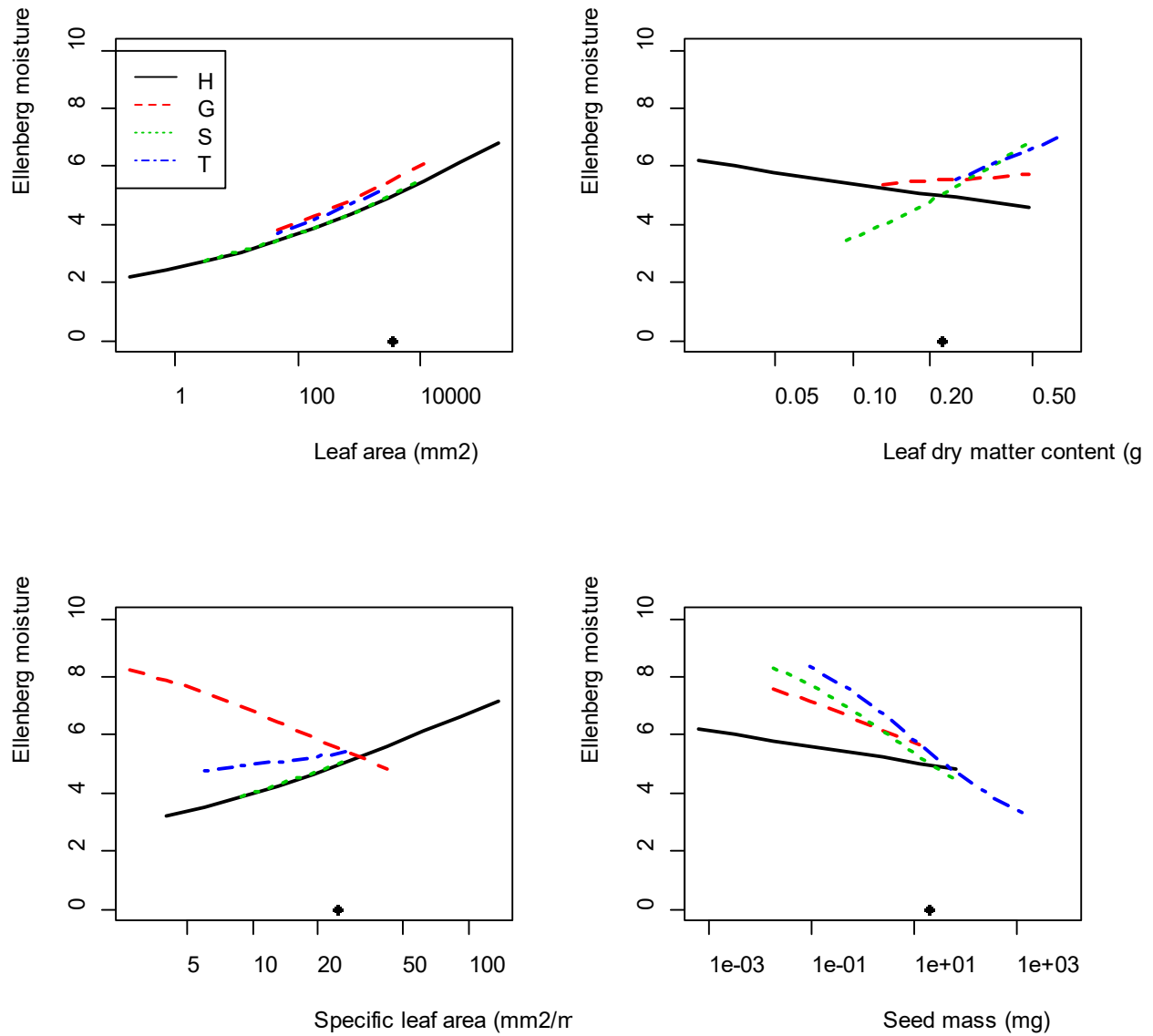


Figure D.3 : The predicted Ellenberg indicator values for soil moisture status as a function of each plant trait. See Figure C.1 for details.

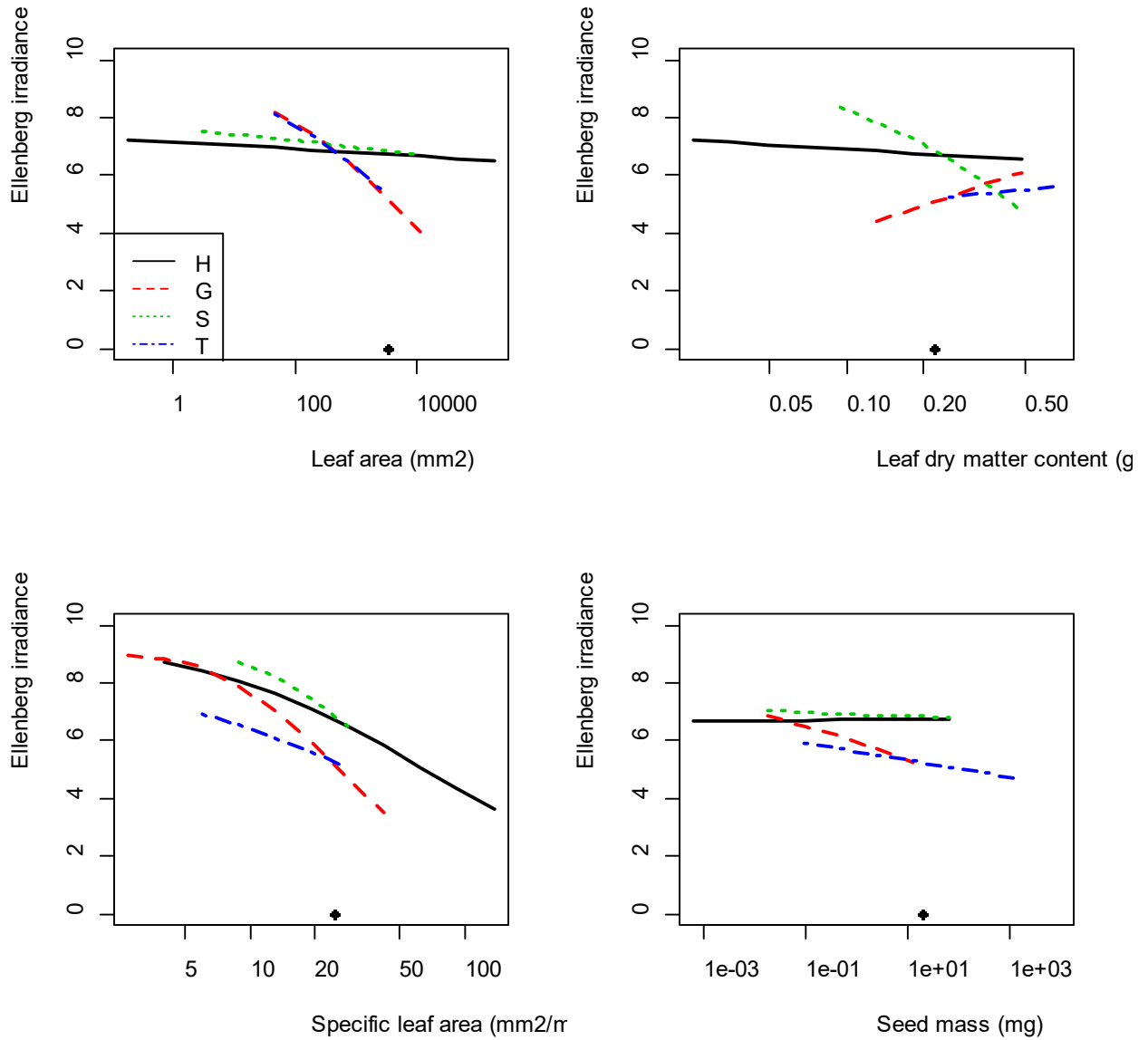


Figure D.4 : The predicted Ellenberg indicator values for irradiance as a function of each plant trait. See Figure C.1 for details.

Next, we predicted the mean Ellenberg scores for those species that were never classified by Ellenberg. Of the 1134 species in the TRY data base for which Ellenberg numbers were missing but for which we had values for the four traits, we were able to classify 125 species as commonly occurring in “wet” soils and 264 species as commonly occurring in drier soils (i.e. not “wet” habitats). Similarly, we could classify 91 species as commonly occurring in “shaded” habitats and 296 species as commonly occurring in non-shaded habitats (i.e. “open” habitats). We further included the 34 species that occur in the Moroccan steppe, which is a very dry, nutrient poor and open habitat, giving a total of 423 and 421 species classified with respect to soil wetness and habitat light levels, respectively. The average predicted Ellenberg scores for soil moisture increased as predicted (Figure C.5): Moroccan species < dry species (TRY) < wet species (TRY). These mean Ellenberg scores differed significantly ($F_{2,370}=15.40$, $p=3.7e^{-07}$) and each was different from the others based on a Tukey post-hoc test. The average predicted Ellenberg scores for light also increased as predicted (Figure C.5): Moroccan species > open species (TRY) > shade (forest) species (TRY). These mean Ellenberg scores differed significantly ($F_{2,370}=31.99$, $p=2.2e^{-16}$) and each was different from the others based on a Tukey post-hoc test. Finally, the average predicted Ellenberg scores for nutrients were significantly lower in the Moroccan steppe species than for those of the other species ($F_{1,371}=80.62$, $p=2.2e^{-16}$).

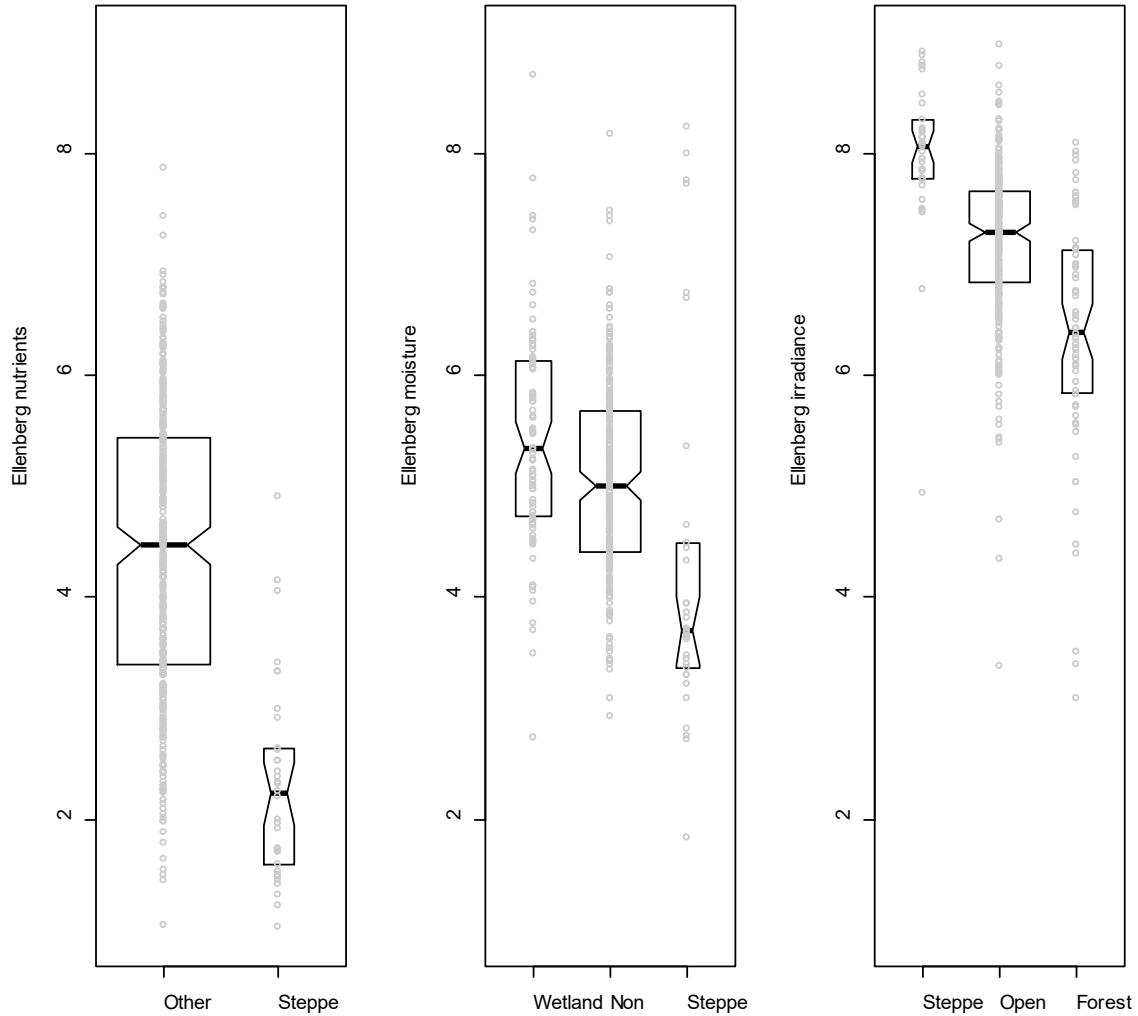


Figure D.5 : Predicted mean Ellenberg indicator values for soil nutrient and moisture status, as well as site irradiance. Predictions were obtained for species that had never been classified by Ellenberg. Species classified as being from the dry, infertile Moroccan steppe or not (soil nutrients), as being wetland, non-wetland or Moroccan steppe species (soil moisture) and as being forest understories, open habitats or from the Moroccan steppe.

Discussion

Trait – environment relationships

Our models predicted that herbaceous species having very small, dense leaves with a low SLA plus (to a lesser degree) larger seeds are more likely be found on the driest and the most infertile soils. In fact, the models for soil moisture and soil nutrients (Ellenberg's N) were quite similar even though the two sets of Ellenberg scores are only moderately correlated (Spearman $r=0.36$). Although these qualitative trait – environment trends have been repeatedly reported in the literature, the trees – and especially the graminoids - responded rather differently. Increasing SLA in these species was indicative of dryer sites (decreased Ellenberg moisture) but changed little with respect to habitat soil nutrients (Ellenberg N). A possible explanation can be found by decomposing SLA into its components (Vile *et al.*, 2005). SLA is approximately equal to $1/(LDMC \cdot T)$ (Shipley *et al.*, 2002) for typical laminar leaves, where T is leaf lamina thickness; it follows that $\ln(SLA) \sim -\ln(LDMC) - \ln(T)$. The negative relationship between SLA and LDMC can therefore be modulated by changes in lamina thickness and it has already been shown that, although graminoids and herbs have largely overlapping ranges of SLA, the relative importance of LDMC vs. T in determining this range is quite different (Pyankov *et al.*, 1999). With respect to increasing Ellenberg nutrients, graminoids decreased LDMC (which would increase SLA) but must have also increased lamina thickness (which would decrease SLA). As a result, SLA was largely insensitive to habitat nutrient levels. With respect to increasing Ellenberg moisture, graminoids did not change LDMC and so the increased lamina thickness actually decreased SLA.

The main response to increasing light levels in the herbs was to decrease SLA even though leaf size and LDMC responded only slightly. Again, a large decrease in SLA without a correspondingly large increase in LDMC means that the decrease in SLA in the herbs was mostly driven by increasing lamina thickness as irradiance levels increased. For the graminoids and trees, the decrease in SLA with increasing light levels was accompanied by an increase in LDMC, and so lamina thickness for these plant types did not change as much. The response of the trees (and somewhat for the shrubs) to levels of habitat irradiance should be interpreted with

care since most measurements of SLA in trees are taken on sun leaves. These differences in response between plant types are further complicated by the fact that the number herb species (691) was much greater than that of the shrubs (44), trees (31) or graminoids (156) and the range of trait variation in the plant types other than the herbs was often quite limited, as seen in Figures C.1 – C.3.

Predictive accuracy and generality

Through cross-validation we predicted Ellenberg scores that were within 2 ranks of the observed values in over 90% of the cases. Given that the ranks range from 1 to 9, this means that we could distinguish between low, medium and high scores but not within adjacent ranks. In 40-64% of the cases (depending on the Ellenberg characteristic), the exact score was predicted, with Ellenberg irradiance having the highest accuracy. However, these summary statistics do not provide a complete view of the predictive accuracy of our models.

First, the increased predictive accuracy for Ellenberg irradiance is a consequence of the fact that most species had Ellenberg irradiance scores of 6 or more (plants generally occurring in well-lit places or in only partial shade). As Figure C.1 shows, our equations do a poor job of differentiating between Ellenberg irradiance levels of 5 or less. In part this is because so few species had such scores (Table C.1) that such species had little weight in the model estimation. However, another reason is because there might actually be little real difference in these first five ranks, at least with respect to the chosen traits. An Ellenberg irradiance rank of 5 is a “semi-shade plant, rarely in full light, but generally with more than 10% relative illumination when trees are in full leaf”. In other words, ranks 1 - 5 all indicate species that are generally found in forested understories.

Second, as Figure C.1 shows, our equations predict values that are higher than observed for the lowest Ellenberg scores and values that are lower than observed for the highest Ellenberg scores. In part, this is due to low representation of species at these extremes (Table C.1) but it is also due to an unavoidable mathematical bias. Since these are ordinal scales that are bounded by 1 and 9, any prediction error at these bounds must increase the predicted values at the lower bound

and decrease them at the upper bound and this will necessarily generate such a bias. One should therefore use Figure C.1 to modify predicted Ellenberg values.

There are some obvious sources of error in these data. First, a substantial proportion of the unexplained variation is probably due the arbitrary nature of the original Ellenberg values, leading to errors in classification of the habitat affinities of the species. Second, the Ellenberg indicator scores do not include information on niche breadth. Although Ellenberg's classification was based on a lifetime of experience, the habitat descriptions for each class are sufficiently vague, and the field distributions of many species with respect to these habitat descriptions are sufficiently difficult to determine, that many species could probably be assigned to several adjacent Ellenberg classes with equal confidence. It is therefore not surprising that our prediction equations cannot discriminate between adjacent Ellenberg classes. Third, the trait values used in the analysis are estimates of species' means obtained from a heterogeneous collection of values uploaded to the TRY database; we do not know how closely the species' trait means calculated from the TRY database correspond to the true species' trait means (Cordlandwehr *et al.*, 2013) and, of course, intraspecific trait variation is completely ignored. A necessary consequence of errors in the predictor variables (i.e. the species' means for each trait) is also to reduce the predictive ability of the model. Finally, these equations treat each environmental gradient separately but these are correlated in nature and the actual habitat affinities of species would reflect correlated trait adaptations to all environmental gradients. Beyond these sources of error, it is surely true that more (or better) traits would further improve the predictive ability of our equations.

The main goal of this research was to determine the degree to which our easily measured and widely available trait values could be used to predict the habitat affinities of species not already classified by Ellenberg values and, especially, species for which no habitat affinities are available. Can one use these equations to predict the Ellenberg habitat affinities of species not classified by Ellenberg, especially of species outside of Central Europe? Strictly speaking, it is impossible answer this question since these numbers represent Ellenberg's expert opinion rather than some independently measurable attribute. However, if our equations are generalizable, we should be able to correctly differentiate between species that typically occupy clearly different points along the underlying environmental gradients. Our results (Figure C.5) suggest that this

is possible. With respect to soil fertility our equations assigned the Moroccan steppe species to Ellenberg levels of 1 (“extremely infertile sites”) to 3 (“more or less infertile sites”) while the heterogeneous collection of other species had a median score of around 5 (“sites with intermediate fertility”). With respect to soil moisture and irradiance our equations performed more poorly. Although the order of the predicted ranks for the “wetland”, “non-wetland” and “steppe” species was correct, the median moisture score for the “wetland” species was ~5.5 when it should have been around 7 (“plants typically found on constantly moist or damp”) or more. This level of error was also seen in the cross-validated estimates (Figure C.1). Similarly, although the order of the predicted ranks for the “steppe”, “open” and “forest” species was in correct, and while the “steppe” and “open habitat” species were assigned reasonable irradiance ranks, the species described as understory plants were incorrectly assigned Ellenberg ranks of between 6 and 7 when they should have received ranks of 5 or less. Our equations did particularly poorly when identifying understory species (Figure C.1).

We therefore propose our equations as a general, but only very approximate, method of describing the likely habitat affinities of soil moisture, soil nutrients and irradiance levels for species lacking such information. When distribution models already exist that include information on the relevant abiotic gradients for a given species then these would likely provide better predictions than would our equations. Species distribution models (Elith *et al.*, 2009, Peterson 2011) provide an alternate approach for estimating the realized niche of species. Because of the growing availability of species occurrence data and environmental layers (Maldonado *et al.*, 2015), habitat models can now be readily constructed for many species. However, these models tend to be more appropriate at larger spatial scales and often describe only large-scale climate variables like temperature and precipitation. Currently, such distribution models exist for only a tiny fraction of plant species. Since it is much easier to obtain information on a few static traits than to construct a species distribution model, we expect that our prediction equations will still be useful for the majority of species. Ultimately, as trait databases like TRY continue to accumulate trait information on more species, one may be able to use our equations to product coarse habitat descriptions for many thousands of species.

Acknowledgements

This research was partially funded by a Natural Sciences and Engineering Research Grant to BS. VO was supported by the Russian Science Foundation (# 14-50-00029). The study has been supported by the TRY initiative on plant traits (<http://www.try-db.org>). The TRY initiative and database is hosted, at the Max Planck Institute for Biogeochemistry, Jena, Germany. TRY is currently supported by DIVERSITAS/Future Earth and the German Centre for Integrative Biodiversity Research (iDiv) Halle-Jena-Leipzig.

References

- Agresti, A. 2002. *Categorical Data Analysis*. John Wiley & Sons, NY.
- Bartelheimer, M. & Poschod, P. 2014. The response of grassland species to nitrate versus ammonium coincides with their pH optima. *Journal of Vegetation Science* 25: 760-770.
- Bartlett, M.K., Scoffoni, C., Ardy, R., Zhang, Y., Sun, S., Cao, K. & Sack, L. 2012. Rapid determination of comparative drought tolerance traits: Using an osmometer to predict turgor loss point. *Methods in Ecology and Evolution* 3: 880-888.
- Carpenter, W. & Goodenough, A. 2014. How robust are community-based plant bioindicators? Empirical testing of the relationship between Ellenberg values and direct environmental measures in woodland communities. *Community Ecology* 15: 1-11.
- Christensen, R.H.B. 2015. ordinal - Regression Models for Ordinal Data. R package version 2015.6-28. In: <http://www.cran.r-project.org/package=ordinal/>.
- Cordlandwehr, V., Meredith, R.L., Ozinga, W.A., Bekker, R.M., Van Groenendael, J.M. & Bakker, J.P. 2013. Do plant traits retrieved from a database accurately predict on-site measurements? *Journal of Ecology* 101: 662-670.
- Douma, J.C., Witte, J.-P.M., Aerts, R., Bartholomeus, R.P., Ordoñez, J.C., Venterink, H.O., Wassen, M.J. & van Bodegom, P.M. 2012. Towards a functional basis for predicting vegetation patterns; incorporating plant traits in habitat distribution models. *Ecography* 35: 294-305.

- Elith, J. & Leathwick, J.R. 2009. Species distribution models: Ecological explanation and prediction across space and time. In: *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, pp. 677-697.
- Ellenberg, H. 1988. *Vegetation Ecology of Central Europe*. 4th. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Ellenberg, H. 1978. *Vegetation Mitteleuropas mit den Alpen in ökologischer Sicht*. Verlag.
- Ellenberg, H. 1992. *Zeigerwerte von Pflanzen in Mitteleuropa*. *Scripta Geobotanica* 18: 1-258.
- Ertsen, A.C.D., Alkemade, J.R.M. & Wassen, M.J. 1998. Calibrating Ellenberg indicator values for moisture, acidity, nutrient availability and salinity in the Netherlands. *Plant Ecol.* 135: 113-124.
- Franzaring, J., Fangmeier, A. & Hunt, R. 2007. On the consistencies between CSR plant strategies and Ellenberg ecological indicator values. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 81: 86-94.
- Frenette-Dussault, C., Shipley, B., Meziane, D. & Hingrat, Y. 2013. Trait-based climate change predictions of plant community structure in arid steppes. *Journal of Ecology* 101: 484-492.
- Fujita, Y., Van Bodegom, P.M. & Witte, J.M. 2013. Relationships between nutrient-related plant traits and combinations of soil N and P fertility measures. *PLoS ONE* 8.
- Garnier, E. & Navas, M.L. 2013. *Diversité fonctionnelle des plantes. Traits des organismes, structure des communautés, propriétés des écosystèmes*. de boeck.
- Greive, B.J. 1956. Studies in the water relations of plants: I. Transpiration of western Australian (Swan Plain) sclerophylls. *Royal Society of Western Australia* 40: 15-20.
- Grime, J.P. 1979. *Plant strategies and vegetation processes*. John Wiley and Sons, New York.
- Guarino, R., Domina, G. & Pignatti, S. 2012. Ellenberg's Indicator values for the Flora of Italy – first update: Pteridophyta, Gymnospermae and Monocotyledoneae. *Flora Mediterranea* 22: 197-209.
- Hill, M.O., Mountford, J.O., Roy, D.B. & Bunce, R.G.H. 1999. Ellenberg's Indicator Values for British Plants. In: Institute of Terrestrial Ecology, Huntingdon, UK.
- Hodgson, J.G., Montserrat-Martí, G., Charles, M., Jones, G., Wilson, P., Shipley, B., Sharafi, M., Cerabolini, B.E.L., Cornelissen, J.H.C., Band, S.R., Bogard, A., Castro-Díez, P.,

- Guerrero-Campo, J., Palmer, C., Pérez-Rontomé, M.C., Carter, G., Hynd, A., Romo-Díez, A., De Torres Espuny, L. & Royo Pla, F. 2011. Is leaf dry matter content a better predictor of soil fertility than specific leaf area? *Annals of Botany* 108: 1337-1345.
- Hutchinson, G.E. 1957. Concluding remarks. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 22: 415-427.
- Karrer, G. 1992. Österreichische Waldboden-Zustandsinventur. Teil VII: Vegetationsökologische Analysen- Mitt. Forstl. Bundesversuchsanst. Wien 168: 193-242.
- Kattge, J., Diaz, S., Lavorel, S., Prentice, C., Leadley, P., Bonisch, G., Garnier, E., Westoby, M., Reich, P.B., Wright, I.J., Cornelissen, J.H.C., Violle, C., Harrison, S.P., van Bodegom, P.M., Reichstein, M., Enquist, B.J., Soudzilovskaia, N.A., Ackerly, D.D., Anand, M., Atkin, O., Bahn, M., Baker, T.R., Baldocchi, D., Bekker, R., Blanco, C.C., Blonder, B., Bond, W.J., Bradstock, R., Bunker, D.E., Casanoves, F., Cavender-Bares, J., Chambers, J.Q., Chapin, F.S., Chave, J., Coomes, D., Cornwell, W.K., Craine, J.M., Dobrin, B.H., Duarte, L., Durka, W., Elser, J., Esser, G., Estiarte, M., Fagan, W.F., Fang, J., Fernandez-Mendez, F., Fidelis, A., Finegan, B., Flores, O., Ford, H., Frank, D., Freschet, G.T., Fyllas, N.M., Gallagher, R.V., Green, W.A., Gutierrez, A.G., Hickler, T., Higgins, S.I., Hodgson, J.G., Jalili, A., Jansen, S., Joly, C.A., Kerkhoff, A.J., Kirkup, D., Kitajima, K., Kleyer, M., Klotz, S., Knops, J.M.H., Kramer, K., Kuhn, I., Kurokawa, H., Laughlin, D., Lee, T.D., Leishman, M., Lens, F., Lenz, T., Lewis, S.L., Lloyd, J., Llusia, J., Louault, F., Ma, S., Mahecha, M.D., Manning, P., Massad, T., Medlyn, B.E., Messier, J., Moles, A.T., Muller, S.C., Nadrowski, K., Naeem, S., Niinemets, U., Nollert, S., Nuske, A., Ogaya, R., Oleksyn, J., Onipchenko, V.G., Onoda, Y., Ordonez, J., Overbeck, G., Ozinga, W.A., Patino, S., Paula, S., Pausas, J.G., Penuelas, J., Phillips, O.L., Pillar, V., Poorter, H., Poorter, L., Poschlod, P., Prinzing, A., Proulx, R., Rammig, A., Reinsch, S., Reu, B., Sack, L., Salgado-Negre, B., Sardans, J., Shiodera, S., Shipley, B., Siefert, A., Sosinski, E., Soussana, J.F., Swaine, E., Swenson, N., Thompson, K., Thornton, P., Waldram, M., Weiher, E., White, M., White, S., Wright, S.J., Yguel, B., Zaehle, S., Zanne, A.E. & Wirth, C. 2011. TRY - a global database of plant traits. *Global Change Biology* 17: 2905-2935.

- Klaus, V.H., Kleinebecker, T., Boch, S., Müller, J., Socher, S.A., Prati, D., Fischer, M. & Hölzel, N. 2012. NIRS meets Ellenberg's indicator values: Prediction of moisture and nitrogen values of agricultural grassland vegetation by means of near-infrared spectral characteristics. *Ecological Indicators* 14: 82-86.
- Klotz, S., Kühn, I. & Durka, W. 2002. Biolflor - eine Datenbank zu biologisch-ökologischen Merkmalen zur Flora von Deutschland. *Schriftenreihe für Vegetationskunde* 28: 1-333.
- Landolt, E. 1977. Ökologische Zeigerwerte zur Schweizer Flora. *Veröff. Geobot. Inst. Eidg. Techn. Hochsch. Stift. Rübel Zür.* 68: 1-208.
- Maldonado, C., Molina, C.I., Zizka, A., Persson, C., Taylor, C.M., Albán, J., Chilquillo, E., Rønsted, N. & Antonelli, A. 2015. Estimating species diversity and distribution in the era of Big Data: To what extent can we trust public databases? *Global Ecology and Biogeography* 24: 973-984.
- McDonald, P.G., Fonseca, C.R., Overton, J.M. & Westoby, M. 2003. Leaf-size divergence along rainfall and soil-nutrient gradients: Is the method of size reduction common among clades? *Functional Ecology* 17: 50-57.
- Monk, C.D. 1966. An ecological significance of evergreenness. *Ecology* 47: 504-505.
- Ozinga, W.A., Schaminée, J.H.J., Bekker, R.M., Bonn, S., Poschod, P., Tackenberg, O., Bakker, J. & Groenendael, J.M.v. 2005. Predictability of plant species composition from environmental conditions is constrained by dispersal limitation. *Oikos* 108: 555-561.
- Peterson, A.T. 2011. *Ecological niches and geographic distributions*. Princeton University Press, Princeton.
- Pignatti, S. 2005. Valori di bioindicazione delle piante vascolari della Flora d'Italia. *Braun-Blanquetia* 39: 3-95.
- Pyankov, V., Kondratchuk, A. & Shipley, B. 1999. Leaf structure and specific leaf mass: the alpine desert plants of the Eastern Pamirs (Tadjikistan). *The New Phytologist* 143: 131-142.
- Schaffers, A.P. & Sykora, K.V. 2000. Reliability of Ellenberg indicator values for moisture, nitrogen and soil reaction: a comparison with field measurements. *Journal of Vegetation Science* 11: 225-244.

- Schubert, R., Hilbig, W. & Klotz, S. 2001. *Bestimmungsbuch der Pflanzengesellschaften Deutschlands*. Spektrum, Heidelberg.
- Scoffoni, C., Rawls, M., McKown, A., Cochard, H. & Sack, L. 2011. Decline of leaf hydraulic conductance with dehydration: relationship to leaf size and venation architecture. *Plant Physiol* 156: 832-843.
- Shipley, B. & Vu, T.-T. 2002. Dry matter content as a measure of dry matter concentration in plants and their parts. *New Phytologist* 153: 359-364.
- Tautenhahn, S., Heilmeier, H., Götzenberger, L., Klotz, S., Wirth, C. & Kühn, I. 2008. On the biogeography of seed mass in Germany – distribution patterns and environmental correlates. *Ecography* 31: 457-468.
- Valladares, F. & Niinemets, Ü. 2008. Shade tolerance, a key plant feature of complex nature and consequences. In: *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, pp. 237-257.
- Venables, W.N. & Ripley, B.D. 1994. *Modern applied statistics with S-PLUS*. Springer-Verlag, New York.
- Vile, D., Garnier, E., Shipley, B., Laurent, G., Navas, M.L., Roumet, C., Lavorel, S., Diaz, S., Hodgson, J.G., Lloret, F., Midgley, G.F., Poorter, H., Rutherford, M.C., Wilson, P.J. & Wright, I.J. 2005. Specific leaf area and dry matter content estimate thickness in laminar leaves. *Ann Bot* 96: 1129-1136.
- Violle, C., Navas, M.L., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I. & Garnier, E. 2007. Let the concept of trait be functional! *Oikos* 116: 882-892.
- Warming, E. & Vahl, M. 1909. *Oecology of plants - an introduction to the study of plant communities*. Clarendon Press, Oxford.
- Zarzycki, K., Trzeńska-Tacik, H., Różański, W., Szelağ, Z., Wołek, J. & Korzeniak, U. 2002. *Ecological indicator values of vascular plants of Poland / Ekologiczne Liczby Wskaźnikowe Roślin Naczyniowych Polski*. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Krakow.

Supplementary material

Ellenberg scores for irradiance level ("light"), moisture and soil fertility.

Irradiance level

1	Plant typical of deep shade
2	Between 1 and 3
3	Shade plant, mostly less than 5% relative illumination, seldom more than 30% illumination when trees are in full leaf
4	Between 3 and 5
5	Semi-shade plant, rarely in full light, but generally with more than 10% relative illumination when trees are in full leaf
6	Between 5 and 7
7	Plant generally in well-lit places, but also occurring in partial shade
8	Light-loving plant rarely found where relative illumination in summer is less than 40%
9	Plant in full light, found mostly in full sun

Moisture

1	Plant typical of extreme dryness, restricted to soils that often dry out for some time
2	Between 1 and 3
3	More often found on dry ground than in moist places
4	Between 3 and 5
5	Plant typically found on fresh soils of average dampness
6	Between 4 and 7
7	Plant typically found on constantly moist or damp, but not on wet, soils
8	Between 7 and 9
9	Plant typically found on water-saturated, badly aerated soils

Soil nutrients (originally "nitrogen")

1	Plant typical of extremely infertile sites
2	Between 1 and 3
3	Typical of more or less infertile sites
4	Between 3 and 5
5	Typical of sites with intermediate fertility
6	Between 5 and 7
7	Typical of richly fertile sites
8	Between 7 and 9
9	Typical of extremely rich sites such as cattle resting places or near polluted rivers

A worked example of calculations

Here are the average trait values from TRY for *Lythrum salicaria* L., a herb: Leaf area = 1220.93 mm², leaf dry matter content (LDMC) = 0.47 g g⁻¹, Specific leaf area (SLA) = 21.56 mm² mg⁻¹ and seed mass (SM) = 0.11 mg. It is essential to use these units. For simplicity, we will predict its Ellenberg nutrient index using the simplified model in Table C.2 but exactly the same procedure is used for any of the equations. The numerical values below are taken directly from Table C.2, corresponding to the “simplified model without interactions” for “Ellenberg nutrients” and “H” (herbs).

We first predict the latent score for this species using equation (1a):

$$LS_i = 0.5 + 0.44 \ln(LA_i) - 0.70(LDMC_i) + 1.4 \ln(SLA_i) + 0.09 \ln(SM_i) = 8.22$$

Next, we calculate the probability of *Lythrum salicaria* being classified into an Ellenberg rank of j or less using equation 1b :

$$p_i(\leq j) = \frac{e^{\alpha_j - LS_i}}{1 + e^{\alpha_j - LS_i}} . \text{ This produces the following results:}$$

Ellenberg nutrient score (j)	$p_i(\leq j)$
1	0.0515283
2	0.2723523
3	0.4843249
4	0.6675843
5	0.8171683
6	0.8991014
7	0.9618480
8	0.9932890
9	1.0

Next, we calculate the probability of *Lythrum salicaria* being classified into each Ellenberg rank using equation 2:

$$p_i(j=1) = p_i(\leq 1)$$

$$p_i(j) = p_i(\leq j) - p_i(\leq j-1); 1 < j < 9$$

$$p_i(j=9) = 1 - p_i(\leq 8)$$

This gives :

Ellenberg nutrient score (j)	$p_i(j)$
1	0.051528300
2	0.220823955
3	0.211972688
4	0.183259321
5	0.149584067
6	0.081933020
7	0.062746685
8	0.031441001
9	0.006710963

Thus, *Lythrum salicaria* has almost equal chances of being classified in ranks 2 and 3, and almost as large a chance of being classified in rank 4. Finally, we calculate the average rank using $\hat{s}_j = \sum_i p_{ij}i$ giving value of 3.85. Finally, there is a 90% probability that it would be classified as between a score of 1 and 6.

BIBLIOGRAPHIE

- Abrams, M.D., Kubiske, M.E., and Mostoller, S.A. (1994). Relating wet and dry year ecophysiology to leaf structure in contrasting temperate tree species. *Ecology* 75, 123–133.
- Alameda, D., and Villar, R. (2012). Linking root traits to plant physiology and growth in *Fraxinus angustifolia* Vahl. seedlings under soil compaction conditions. *Environ. Exp. Bot.* 79, 49–57.
- Amatangelo, K.L., Johnson, S.E., Rogers, D.A., and Waller, D.M. (2014). Trait-environment relationships remain strong despite 50 years of trait compositional change in temperate forests. *Ecology* 95, 1780–1791.
- Araya, M., and Shipley, B. (2017). Predicting habitat affinities of herbaceous dicots to soil wetness based on physiological traits of drought tolerance. *Ann. Bot.* 119, 1073–1084.
- Araya, Y.N., Silvertown, J., Gowing, D.J., McConway, K.J., Peter Linder, H., and Midgley, G. (2011). A fundamental, eco-hydrological basis for niche segregation in plant communities. *New Phytol.* 189, 253–258.
- Augé, R.M., and Moore, J.L. (2002). Stomatal response to nonhydraulic root-to-shoot communication of partial soil drying in relation to foliar dehydration tolerance. *Environ. Exp. Bot.* 47, 217–229.
- Barkaoui, K., Roumet, C., and Volaire, F. (2016). Mean root trait more than root trait diversity determines drought resilience in native and cultivated Mediterranean grass mixtures. *Agric. Ecosyst. Environ.* 231, 122–132.
- Bartlett, M.K., Scoffoni, C., Ardy, R., Zhang, Y., Sun, S., Cao, K., and Sack, L. (2012a). Rapid determination of comparative drought tolerance traits: Using an osmometer to predict turgor loss point. *Methods Ecol. Evol.* 3, 880–888.
- Bartlett, M.K., Scoffoni, C., and Sack, L. (2012b). The determinants of leaf turgor loss point and prediction of drought tolerance of species and biomes: A global meta-analysis. *Ecol. Lett.* 15, 393–405.

- Ben-Haj-Salah, H., and Tardieu, F. (1995). Temperature Affects Expansion Rate of Maize Leaves without Change in Spatial Distribution of Cell Length (Analysis of the Coordination between Cell Division and Cell Expansion). *Plant Physiol.* *109*, 861–870.
- Bertness, M.D., and Callaway, R. (1994). Positive interactions in communities. *Trends Ecol. Evol.* *9*, 187–191.
- Blackman, C.J., Brodribb, T.J., and Jordan, G.J. (2010). Leaf hydraulic vulnerability is related to conduit dimensions and drought resistance across a diverse range of woody angiosperms. *New Phytol.* *188*, 1113–1123.
- Blonder, B., Vasseur, F., Violle, C., Shipley, B., Enquist, B.J., and Vile, D. (2015). Testing models for the leaf economics spectrum with leaf and whole-plant traits in *Arabidopsis thaliana*. *AoB Plants* *7*, 1–12.
- Boyer, J.S. (1970). Differing sensitivity of photosynthesis to low leaf water potentials in corn and soybean. *Plant Physiol.* *46*, 236–239.
- Boyer, J.S., and Westgate, M.E. (2004). Grain yields with limited water. *J. Exp. Bot.* *55*, 2385–2394.
- Brodribb, T.J., and Holbrook, N.M. (2003). Stomatal closure during leaf dehydration, correlation with other leaf physiological traits. *Plant Physiol.* *132*, 2166–2173.
- Brodribb, T.J., Holbrook, N.M., Edwards, E.J., and Gutiérrez, M. V. (2003). Relations between stomatal closure, leaf turgor and xylem vulnerability in eight tropical dry forest trees. *Plant, Cell Environ.* *26*, 443–450.
- Callaway, R. (1995). Positive interactions among plants. *Bot. Rev.* *61*, 306–349.
- Calow, P. (1999). *Blackwell's concise encyclopedia of ecology* (Oxford; Malden, Mass.: Wiley-Blackwell).
- Chapin III, F.S., Autumn, K., and Pugnaire, F.I. (1993). Evolution of Suites of Traits in Response to Environmental Stress. *Am. Nat.* *142*, S78–S92.
- Chapin III, F.S., Matson, P.A., Vitousek, P.M., and Mooney, H.A. (2002). *Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology* (New York: Springer-Verlag).
- Chapin III, F.S., Zavaleta, E.S., Eviner, V.T., Naylor, R.L., Vitousek, P.M., Reynolds, H.L., Hooper, D.U., Lavorel, S., Sala, O.E., Hobbie, S.E., et al. (2000). Consequences of changing biodiversity. *Nature* *405*, 234–242.

- Chave, J., Coomes, D., Jansen, S., Lewis, S.L., Swenson, N.G., and Zanne, A.E. (2009). Towards a worldwide wood economics spectrum. *Ecol. Lett.* *12*, 351–366.
- Chaves, M.M., Pereira, J.S., Maroco, J., Rodrigues, M.L., Ricardo, C.P.P., Osório, M.L., Carvalho, I., Faria, T., and Pinheiro, C. (2002). How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth. *Ann. Bot.* *89*, 907–916.
- Christensen, R.H.B. (2015). Ordinal : Regression Models for Ordinal Data. R Packag. Version 2015-06-28.
- Churkina, G., and Running, S.W. (1998). Contrasting Climatic Controls on the Estimated Productivity of Global Terrestrial Biomes. *Ecosystems* *1*(2), 206–215.
- Cochard, H., Coll, L., Le Roux, X., and Ameglio, T. (2002). Unraveling the effects of plant hydraulics on stomatal closure during water stress in walnut. *Plant Physiol.* *128*, 282–290.
- Cornelissen, J.H.C., Lavorel, S., Garnier, E., Diaz, S., Buchmann, N., Gurvich, D.E., Reich, P.B., ter Steege, H., Morgan, H.D., van der Heidjen, M.G., et al. (2003). A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Aust. J. Bot.* *51*, 335–380.
- Craine, J.M., Engelbrecht, B.M.J., Lusk, C.H., McDowell, N.G., and Poorter, H. (2012). Resource limitation, tolerance, and the future of ecological plant classification. *Front. Funct. Plant Ecol.* *3*, 246.
- Cruziat, P., Améglio, T., and Cochard, H. (2001). La cavitation : Un mécanisme perturbant la circulation de l'eau chez les végétaux. *Mec. Ind.* *2*, 289–298.
- Daly, E., Porporato, A., and Rodriguez-Iturbe, I. (2004). Coupled Dynamics of Photosynthesis, Transpiration, and Soil Water Balance. Part I: Upscaling from Hourly to Daily Level. *J. Hydrometeorol.* *5*, 546–558.
- Diaz, S., Kattge, J., Cornelissen, J.H.C., Wright, I.J., Lavorel, S., Dray, S., Reu, B., Kleyer, M., Wirth, C., Prentice, I.C., et al. (2016). The global spectrum of plant form and function. *Nature.* *529*, 167–171.
- Douma, J.C., Shipley, B., Witte, J.P.M., Aerts, R., and Van Bodegom, P.M. (2012). Disturbance and resource availability act differently on the same suite of plant traits: Revisiting assembly hypotheses. *Ecology* *93*, 825–835.

- Duarte, C.M., Sand-Jensen, K., Nielsen, S.L., Enríquez, S., and Agustí, S. (1995). Comparative functional plant ecology: rationale and potentials. *Trends Ecol. Evol.* *10*, 418–421.
- Ebrahimiyan, M., Majidi, M.M., Mirlohi, A., and Noroozi, A. (2013). Physiological traits related to drought tolerance in tall fescue. *Euphytica* *190*, 401–414.
- Ellenberg, H. (1988). *Vegetation Ecology of Central Europe*. (New Rochelle, New York : Cambridge University Press).
- Frenette-Dussault, C., Shipley, B., Léger, J.F., Meziane, D., and Hingrat, Y. (2012). Functional structure of an arid steppe plant community reveals similarities with Grime's C-S-R theory. *J. Veg. Sci.* *23*, 208–222.
- Freschet, G.T., Aerts, R., and Cornelissen, J.H.C. (2012). A plant economics spectrum of litter decomposability. *Funct. Ecol.* *26*, 56–65.
- Galmés, J., Flexas, J., Savé, R., and Medrano, H. (2007b). Water relations and stomatal characteristics of Mediterranean plants with different growth forms and leaf habits: Responses to water stress and recovery. *Plant Soil* *290*, 139–155.
- Galmés, J., Ochogavía, J.M., Gago, J., Roldán, E.J., Cifre, J., Conesa, M.À., Ochogavía, J.M., Gago, J., Roldán, E.J., Cifre, J., et al. (2013). Leaf responses to drought stress in Mediterranean accessions of *Solanum lycopersicum*: anatomical adaptations in relation to gas exchange parameters. *Plant, Cell Environ.* *36*, 920–935.
- Galmés, J., Ribas-Carbó, M., Medrano, H., and Flexas, J. (2007a). Response of leaf respiration to water stress in Mediterranean species with different growth forms. *J. Arid Environ.* *68*, 206–222.
- Garnier, E., Lavorel, S., Ansquer, P., Castro, H., Cruz, P., Dolezal, J., Eriksson, O., Fortunel, C., Freitas, H., Golodets, C., et al. (2007). Assessing the effects of land-use change on plant traits, communities and ecosystem functioning in grasslands: A standardized methodology and lessons from an application to 11 European sites. *Ann. Bot.* *99*, 967–985.
- Garnier, E., and Navas, M.-L. (2013). *Diversité fonctionnelle des plantes* (Bruxelle: De Boeck Supérieur).
- Garnier, E., Navas, M.-L., and Grigulis, K. (2016). *Plant functional diversity: organism traits, community structure, and ecosystem properties*. (Oxford, UK : Oxford University press).

- Garnier, E., Shipley, B., Roumet, C., and Laurent, G. (2001). A standardized protocol for the determination of specific leaf area and leaf dry matter content. *Funct. Ecol.* *15*, 688–695.
- Garnier, E., Stahl, U., Laporte, M.A., Kattge, J., Mougnot, I., Kühn, I., Laporte, B., Amiaud, B., Ahrestani, F.S., Bönisch, G., et al. (2017). Towards a thesaurus of plant characteristics: an ecological contribution. *J. Ecol.* *105*, 298–309.
- Gil, P.M., Gurovich, L., Schaffer, B., Alcayaga, J., Rey, S., and Iturriaga, R. (2008). Root to leaf electrical signaling in avocado in response to light and soil water content. *J. Plant Physiol.* *165*, 1070–1078.
- Grime, J.P. (1977). Evidence for the Existence of Three Primary Strategies in Plants and Its Relevance to Ecological and Evolutionary Theory. *Am. Nat.* *111*, 1169–1194.
- Grime, J.P. (2002). *Plant Strategies, Vegetation Processes, and Ecosystem Properties.* (Chichester, UK: Wiley).
- Hacke, U.G., and Sperry, J.S. (2001). Functional and ecological xylem anatomy. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* *4*, 97–115.
- Hallé, F., and Oldeman, R. a (1970). *Essai sur l'architecture et la dynamique de croissance des arbres tropicaux.* (Paris: Collection de Monographies de Botanique et de Biologie Végétale).
- He, Q., and Bertness, M.D. (2009). Extreme stresses, niches, and positive species interactions along stress gradients. *Ecology* *95*, 1437–1443.
- Hernández, E.I., Vilagrosa, A., Pausas, J.G., and Bellot, J. (2010). Morphological traits and water use strategies in seedlings of Mediterranean coexisting species. *Plant Ecol.* *207*, 233–244.
- Hill, M.O., Mountford, J.O., Roy, D.B., and Bunce, R.G.H. (1999). Ellenberg's indicator values for British plants. In: *ECOFACT Volume 2, Technical Annex.* (Cambridgeshire, UK : Institute of Terrestrial Ecology.).
- Hodgson, J.G., Wilson, P.J., Hunt, R., Grime, J.P., and Thompson, K. (1999). Allocating C-S-R plant functional types: A soft approach to a hard problem. *Oikos* *85*, 282–294.
- Hofmann, M., Bütof, A., Welk, E., and Bruehlheide, H. (2013). Relationship between fundamental and realized niches in terms of frost and drought resistance. *Preslia* *85*, 1–17.

- Holub, P., Fabšičová, M., Tůma, I., Záhora, J., and Fiala, K. (2013). Effects of artificially varying amounts of rainfall on two semi-natural grassland types. *J. Veg. Sci.* *24*, 518–529.
- Hutchinson, G.E. (1957). Concluding remarks. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.
- IPCC (2014). Climate Change 2014 Synthesis Report. Approved Summary for Policymakers.
- Jones, H.G. (2014). The use of indirect or proxy markers in plant physiology. *Plant, Cell Environ.* *37*, 1270–1272.
- Kattge, J., Díaz, S., Lavorel, S., Prentice, I.C., Leadley, P., Bönisch, G., Garnier, E., Westoby, M., Reich, P.B., Wright, I.J., et al. (2011). TRY - a global database of plant traits. *Glob. Chang. Biol.* *17*, 2905–2935.
- Kazakou, E., Violle, C., Roumet, C., Navas, M.-L., Vile, D., Kattge, J., and Garnier, E. (2014). Are trait-based species rankings consistent across data sets and spatial scales? *J. Veg. Sci.* *25*, 235–247.
- Keddy, P.A. (1992). A pragmatic approach to functional ecology. *Funct. Ecol.* *6*, 621–626.
- Kenzo, T., Yoneda, R., Azani, M.A., and Majid, N.M. (2008). Changes in leaf water use after removal of leaf lower surface hairs on *Mallotus macrostachyus* (Euphorbiaceae) in a tropical secondary forest in Malaysia. *J. For. Res.* *13*, 137–142.
- Kichenin, E., Wardle, D.A., Peltzer, D.A., Morse, C.W., and Freschet, G.T. (2013). Contrasting effects of plant inter- and intraspecific variation on community-level trait measures along an environmental gradient. *Funct. Ecol.* *27*, 1254–1261.
- Kleyer, M., Bekker, R.M., Knevel, I.C., Bakker, J.P., Thompson, K., Sonnenschein, M., Poschlod, P., Van Groenendael, J.M., Klimeš, L., Klimešová, J., et al. (2008). The LEDA Traitbase: A database of life-history traits of the Northwest European flora. *J. Ecol.* *96*, 1266–1274.
- Knight, C.A., Vogel, H., Kroymann, J., Shumate, A., Witsenboer, H., and Mitchell-Olds, T. (2006). Expression profiling and local adaptation of *Boechera holboellii* populations for water use efficiency across a naturally occurring water stress gradient. *Mol. Ecol.* *15*, 1229–1237.
- Kramer-Walter, K.R., Bellingham, P.J., Millar, T.R., Smissen, R.D., Richardson, S.J., Laughlin, D.C., and Mommer, L. (2016). Root traits are multidimensional: specific root length is

- independent from root tissue density and the plant economic spectrum. *J. Ecol.* *104*, 1299–1310.
- Lambers, H. (2008). *Plant Physiological Ecology* (New York: Springer New York).
- Lavorel, S., and Garnier, E. (2002). Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: Revisiting the Holy Grail. *Funct. Ecol.* *16*, 545–556.
- Le Bagousse-Pinguet, Y., De Bello, F., Vandewalle, M., Leps, J., and Sykes, M.T. (2014). Species richness of limestone grasslands increases with trait overlap: Evidence from within- and between-species functional diversity partitioning. *J. Ecol.* *102*, 466–474.
- Lelièvre, F., Seddaiu, G., Ledda, L., Porqueddu, C., and Volaire, F. (2011). Water use efficiency and drought survival in Mediterranean perennial forage grasses. *F. Crop. Res.* *121*, 333–342.
- Li, Y., Shipley, B., Price, J.N., de L. Dantas, V., Tamme, R., Westoby, M., Siefert, A., Schamp, B.S., Spasojevic, M.J., Jung, V., et al. (2017) Habitat filtering determines the functional niche occupancy of plant communities worldwide. *J. Ecol.* *In press*.
- Lortie, C.J., Brooker, R.W., Choler, P., Kikvidze, Z., Michalet, R., Pugnaire, F.I., and Callaway, R.M. (2004). Rethinking plant community theory. *Oikos* *107*, 433–438.
- Lu, J., Sun, G., McNulty, S.G., and Amatya, D.M. (2005). A Comparison of Six Potential Evapotranspiration Methods for Regional Use in the Southeastern United States. *J. Am. Water Resour. Assoc.* *41*, 621–633.
- Lu, Y., Alejandra Equiza, M., Deng, X., and Tyree, M.T. (2010). Recovery of *Populus tremuloides* seedlings following severe drought causing total leaf mortality and extreme stem embolism. *Physiol. Plant.* *140*, 246–257.
- Maestre, F.T., Callaway, R.M., Valladares, F., and Lortie, C.J. (2009). Refining the stress-gradient hypothesis for competition and facilitation in plant communities. *J. Ecol.* *97*, 199–205.
- Maire, V., Gross, N., Börger, L., Proulx, R., Wirth, C., Pontes, L. da S., Soussana, J.F., and Louault, F. (2012). Habitat filtering and niche differentiation jointly explain species relative abundance within grassland communities along fertility and disturbance gradients. *New Phytol.* *196*, 497–509.

- Malladi, A., and Burns, J.K.J. (2007). Communication by Plant Growth Regulators in Roots and Shoots of Horticultural Crops. *HortScience* 42, 1113–1117.
- Marie-Victorin, F., Rouleau, E., and Brouillet, L. (2002). Flore laurentienne 3ème édition (Boucherville, Québec : Gaetan Morin Éditeur).
- Marino, G., Aqil, M., and Shipley, B. (2010). The leaf economics spectrum and the prediction of photosynthetic light-response curves. *Funct. Ecol.* 24, 263–272.
- Markesteyn, L., Poorter, L., Bongers, F., Paz, H., and Sack, L. (2011). Hydraulics and life history of tropical dry forest tree species: Coordination of species' drought and shade tolerance. *New Phytol.* 191, 480–495.
- Martinez-Vilalta, J., and Garcia-Forner, N.N. (2016). Water potential regulation, stomatal behaviour and hydraulic transport under drought: deconstructing the iso/anisohydric concept. *Plant. Cell Environ.* 962–976.
- McCullagh, P. (1980). Regression Models for Ordinal Data. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* 42, 109–142.
- McDowell, N., Pockman, W.T., Allen, C.D., Breshears, D.D., Cobb, N., Kolb, T., Plaut, J., Sperry, J., West, A., Williams, D.G., et al. (2008). Mechanisms of plant survival and mortality during drought: Why do some plants survive while others succumb to drought? *New Phytol.* 178, 719–739.
- McGill, B.J., Enquist, B.J., Weiher, E., and Westoby, M. (2006). Rebuilding community ecology from functional traits. *Trends Ecol. Evol.* 21, 178–185.
- Medrano, H., Escalona, J.M., Bota, J., Gulias, J., and Flexas, J. (2002). Regulation of photosynthesis of C3 plants in response to progressive drought: Stomatal conductance as a reference parameter. *Ann. Bot.* 89, 895–905.
- Mitchell, P.J., Veneklaas, E.J., Lambers, H., and Burgess, S.S.O. (2008a). Leaf water relations during summer water deficit: Differential responses in turgor maintenance and variation in leaf structure among different plant communities in south-western Australia. *Plant, Cell Environ.* 31, 1791–1802.
- Mitchell, P.J., Veneklaas, E.J., Lambers, H., and Burgess, S.S.O. (2008b). Using multiple trait associations to define hydraulic functional types in plant communities of south-western Australia. *Oecologia* 158, 385–397.

- Moles, A.T., Perkins, S.E., Laffan, S.W., Flores-Moreno, H., Awasthy, M., Tindall, M.L., Sack, L., Pitman, A., Kattge, J., Aarssen, L.W., et al. (2014). Which is a better predictor of plant traits: Temperature or precipitation? *J. Veg. Sci.* *25*, 1167–1180.
- Muscarella, R., and Uriarte, M. (2016). Do community-weighted mean functional traits reflect optimal strategies? *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*
- Olano, J.M., Almería, I., Eugenio, M., and von Arx, G. (2013). Under pressure: How a Mediterranean high-mountain forb coordinates growth and hydraulic xylem anatomy in response to temperature and water constraints. *Funct. Ecol.* *27*, 1295–1303.
- Penman, H.L. (1948). Natural Evaporation from Open Water, Bare Soil and Grass. *Proc. R. Soc. London. Ser. A. Math. Phys. Sci.* *193*, 120 LP-145.
- Pérez-Harguindeguy, N., Díaz, S., Garnier, E., Lavorel, S., Poorter, H., Jaureguiberry, P., Bret-Harte, M.S., Cornwell, W.K., Craine, J.M., Gurvich, D.E., et al. (2013). New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. *Aust. J. Bot.* *61*, 167–234.
- Pierce, S., Brusa, G., Vagge, I., and Cerabolini, B.E.L. (2013). Allocating CSR plant functional types: The use of leaf economics and size traits to classify woody and herbaceous vascular plants. *Funct. Ecol.* *27*, 1002–1010.
- Prieto, I., Roumet, C., Cardinael, R., Dupraz, C., Jourdan, C., Kim, J.H., Maeght, J.L., Mao, Z., Pierret, A., Portillo, N., et al. (2015). Root functional parameters along a land-use gradient: Evidence of a community-level economics spectrum. *J. Ecol.* *103*, 361–373.
- Poorter, H., Böhler, J., van Dusschoten, D., Climent, J.J., and Postma, J.A. (2012). Pot size matters: a meta-analysis of the effects of rooting volume on plant growth. *Funct. Plant Biol.* *39*, 839–850.
- R Core team (2015). R Core Team. *R A Lang. Environ. Stat. Comput. R Found. Stat. Comput.*, Vienna, Austria. URL <http://www.R-Project.org/>. *55*, 275–286.
- Raunkiaer, C., Gilbert-Carter, H., Fausboll, A., and Tansley, A.G. (1934). *The life forms of plants and statistical plant geography*; (Oxford, UK :The Clarendon Press).
- Reich, P.B. (2014). The world-wide “fast-slow” plant economics spectrum : A traits manifesto. *J. Ecol.* *102*, 275–301.

- Reich, P.B., Wright, I.J., Cavender-bares, J., Craine, J.M., Oleksyn, J., Westoby, M., and Walters, M.B. (2003). The Evolution of Plant Functional Variation: Traits, Spectra, and Strategies. *Int. J. Plant Sci.* 1643, 143–164.
- Reich, P.B., Wright, I.J., and Lusk, C.H. (2007). Predicting Leaf Physiology from Simple Plant and Climate Attributes : A Global GLOPNET Analysis Linked references are available on JSTOR for this article : *Ecol. Appl.* 17, 1982–1988.
- Reynolds-Henne, C.E., Langenegger, A., Mani, J., Schenk, N., Zumsteg, A., and Feller, U. (2010). Interactions between temperature, drought and stomatal opening in legumes. *Environ. Exp. Bot.* 68, 37–43.
- Ripley, B.S., Pammenter, N.W., and Smith, V.R. (1999). Function of Leaf Hairs Revisited: The Hair Layer on Leaves *Arctotheca populifolia* Reduces Photoinhibition, but Leads to Higher Leaf Temperatures Caused by Lower Transpiration Rates. *J. Plant Physiol.* 155, 78–85.
- Rosenthal, D.M., Stiller, V., Sperry, J.S., and Donovan, L.A. (2010). Contrasting drought tolerance strategies in two desert annuals of hybrid origin. *J. Exp. Bot.* 61, 2769–2778.
- Sack, L., Cowan, P.D., Jaikumar, N., and Holbrook, N.M. (2003). The “hydrology” of leaves: coordination of structure and function in temperate woody species. *Plant, Cell Environ.* 26, 1343–1356.
- Sack, L., and Holbrook, N.M. (2006). Leaf Hydraulics. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 361–381.
- Sack, L., and Tyree, M.T. (2005). Leaf hydraulics and its Implications in Plant Structure and Function. In: *Vascular Transport in Plants*. (Academic Press: Holbrook, N.M., & Zwieniecki, M.A.). pp. 93-114.
- Sala, O.E., Chapin III, F.S., Armesto, J.J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L.F., Jackson, R.B., Kinzig, A., et al. (2000). Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287 (5459), 1170-1774.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–682.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675.

- Schultz, H.R. (2003). Differences in hydraulic architecture account for near- isohydric and anisohydric behaviour of two old-grown. *Plant, Cell Environ.* 26, 1393–1406.
- Schulze, E.D., Kelliher, F.M., Korner, C., Lloyd, J., and Leuning, R. (1994). Relationships among maximal stomatal conductance, carbon assimilation rate, and plant nitrogen nutrition: A global ecology scaling exercise. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 25, 629–660.
- Shepherd, T., and Griffiths, D.W. (2006). The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytol.* 171, 469–499.
- Shipley, B. (2010). *From Plant Traits to Vegetation Structure* (Cambridge, UK: Cambridge University Press).
- Shipley, B., Vile, D., and Garnier, E. (2006). From Plant Traits to Plant Communities: A Statistical Mechanistic Approach to Biodiversity. *Science.* 314(5800), 812–814.
- Silvertown, J., Araya, Y., and Gowing, D. (2015). Hydrological niches in terrestrial plant communities: A review. *J. Ecol.* 103, 93–108.
- Sperry, J.S., Hacke, U.G., Oren, R., and Comstock, J.P. (2002). Water deficits and hydraulic limits to leaf water supply. *Plant, Cell Environ.* 25, 251–263.
- Tardieu, F., Lafarge, T., and Simonneau, T. (1996). Stomatal control by fed or endogenous xylem ABA in sunflower: Interpretation of correlations between leaf water potential and stomatal conductance in anisohydric species. *Plant, Cell Environ.* 19, 75–84.
- Tardieu, F., and Simonneau, T. (1998). Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. *J. Exp. Bot.* 49, 419–432.
- Thornthwaite, C.W. (1948). An Approach toward a Rational Classification of Climate. *Geogr. Rev.* 38, 55–94.
- Ting, Y., and Chen, C. (2012). Improved Calibration of Frequency Domain Reflectometry Probes for Volumetric Water Content Measurements of Three Media. *Trans. Asabe* 55, 51–60.
- Topp, G.C., Davis, J.L., Bailey, W.G., Zebchuk, W.D., Davis, J.L., and Bailey, W.G. (1984). the Measurement of Soil Water Content Using a Portable Tdr Hand Probe. *Can. J. Soil Sci.* 64, 313–321.

- Tyree, M.T., Engelbrecht, B.M.J., Vargas, G., and Kursar, T.A. (2003). Desiccation Tolerance of Five Tropical Seedlings in Panama . Relationship to a Field Assessment of Drought Performance. *Plant Physiol.* *132*, 1439–1447.
- Tyree, M.T., Vargas, G., Engelbrecht, B.M.J., and Kursar, T.A. (2002). Drought until death do us part: A case study of the desiccation-tolerance of a tropical moist forest seedling-tree, *Licania platypus* (Hemsl.) Fritsch. *J. Exp. Bot.* *53*, 2239–2247.
- Tyree, M.T., and Zimmermann, M.H. (2002). *Xylem Structure and the Ascent of Sap*. (Berlin : Springer-Verlag).
- Valladares, F., and Pearcy, R.W. (1997). Interactions between water stress, sun-shade acclimation, heat tolerance and photoinhibition in the sclerophyll *Heteromeles arbutifolia*. *Plant, Cell Environ.* *20*, 25–36.
- Varble, J.L., and Chávez, J.L. (2011). Performance evaluation and calibration of soil water content and potential sensors for agricultural soils in eastern Colorado. *Agric. Water Manag.* *101*, 93–106.
- Vile, D., Pervent, M., Belluau, M., Vasseur, F., Bresson, J., Muller, B., Granier, C., and Simonneau, T. (2012). Arabidopsis growth under prolonged high temperature and water deficit: Independent or interactive effects? *Plant, Cell Environ.* *35*, 702–718.
- Violle, C., Enquist, B.J., McGill, B.J., Jiang, L., Albert, C.H., Hulshof, C., Jung, V., and Messier, J. (2012). The return of the variance: Intraspecific variability in community ecology. *Trends Ecol. Evol.* *27*, 244–252.
- Violle, C., Navas, M.-L., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I., and Garnier, E. (2007). Let the Concept of Trait Be Functional! *Oikos* *116*, 882–892.
- Vitousek, P.M., Mooney, H. A., Lubchenco, J., and Melillo, J.M. (1997). Human Domination of Earth's Ecosystems. *Science.* *277*(5325), 494–499.
- Volaire, F. (2008). Plant traits and functional types to characterise drought survival of pluri-specific perennial herbaceous swards in Mediterranean areas. *Eur. J. Agron.* *29*, 116–124.
- Weihner, E., van der Werf, A., Thompson, K., Roderick, M., Garnier, E., and Eriksson, O. (1999). Challenging Theophrastus: A common core list of plant traits for functional ecology. *J. Veg. Sci.* *10*, 609–620.

- Westoby, M. (1998). A leaf-height-seed (LHS) plant ecology strategy scheme. *Plant Soil* 199, 213–227.
- Westoby, M., and Wright, I.J. (2006). Land-plant ecology on the basis of functional traits. *Trends Ecol. Evol.* 21, 261–268.
- Woodward, F.I., and Diament, A.D. (1991). Functional Approaches to Predicting the Ecological Effects of Global Change. *Funct. Ecol.* 5, 202–212.
- Wright, I.J., Reich, P.B., Cornelissen, J.H.C., Falster, D.S., Hikosaka, K., Lamont, B.B., Lee, W., Oleksyn, J., Osada, N., Poorter, H., et al. (2005). Assessing the generality of leaf trait of global relationships. *New Phytol.* 166, 485–496.
- Wright, I.J., Reich, P.B., Westoby, M., Ackerly, D.D., Baruch, Z., Bongers, F., Cavender-bares, J., Chapin, T., Cornelissen, J.H.C., Diemer, M., et al. (2004). The worldwide leaf economics spectrum. *Nature* 428, 821–827.
- Wright, I.J., and Westoby, M. (1999). Differences in seedling growth behaviour among species : trait correlations across species, and trait shifts along nutrient compared to rainfall gradients. *J. Ecol.* 87, 85–97.
- Zhang, X., Wollenweber, B., Jiang, D., Liu, F., and Zhao, J. (2008). Water deficits and heat shock effects on photosynthesis of a transgenic *Arabidopsis thaliana* constitutively expressing ABP9, a bZIP transcription factor. *J. Exp. Bot.* 59, 839–848.

