

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC EN ABITIBI-TÉMISCAMINGUE

ET

AIX-MARSEILLE UNIVERSITÉ

DÉTERMINANTS ÉCOLOGIQUES ET CHIMIQUES DES GREFFES
RACINAIRES DANS LES PEUPELEMENTS NATURELS DE SAPINS
BAUMIERS (*ABIES BALSAMEA* (L.) MILL.) EN FORÊT BORÉALE AU
QUÉBEC

THÈSE

PRÉSENTÉE

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DU DOCTORAT EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR
ÉLODIE QUER

JANVIER 2022

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements vont à mes directrices de thèse : Annie DesRochers et Virginie Baldy. Je vous remercie pour tout ce que j'ai appris à vos côtés, pour la confiance que vous m'avez accordée, pour votre soutien et pour vos nombreuses corrections du manuscrit. Ce fut un réel plaisir de découvrir le monde des greffes racinaires avec vous et toujours dans la bonne humeur ! Merci de m'avoir permis de m'accomplir dans le domaine de la recherche mais aussi au travers de cette expérience humaine durant laquelle j'ai beaucoup grandi et appris sur moi-même.

Je souhaite remercier Hubert Morin, Philippe Balandier, Apolline Auclerc et Thierry Gauquelin de m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs et examinateurs de ma thèse.

Je tiens à remercier le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG), qui a attribué la subvention à la découverte à Annie DesRochers permettant de financer ce projet.

Je remercie également mon comité de thèse : Frédérique Guibal, Bernard Prévosto, Leslie Weston et Marina Semchenko pour m'avoir encadrée et conseillée pendant mon doctorat.

Une pensée particulière pour tous ceux qui m'ont accompagnée sur le terrain : Philippe Duval, Ludovic Bouliane, Eva Thévenin et Michel Guimond. Un grand merci à Jordane Gavinet et Manon Helluy pour m'avoir aidée dans le traitement de mes données mais aussi pour votre soutien et votre gentillesse. Merci également à Thomas Michel pour son aide dans la partie « chimie » de ma thèse et sa patience.

Je remercie chaleureusement l'ensemble du campus de l'UQAT à Amos de m'avoir accueillie dans votre beau pays ! Merci à Annie DesRochers, Dany Charron, Hélène Lavoie, Elizabeth Turcotte, Linda Lavoie, Olivier Pitre, Magalie Roy, Vincent Cloutier, Eric Rosa et Daniel Blanchette. Merci également à tous les étudiants de l'UQAT d'Amos et de Rouyn de m'avoir accompagnée dans mon expérience

Québécoise ! Merci à Diary Gaspard, Juanita Carolina Rodriguez Rodriguez, Léa Darquié, Myriam Pilliet, Nathalie Rey, Carlos Cerrejon, Mariano Feldman, Simon Nadeau, Jenna Rabley, Ablo Hounzandji, Elyasse El Mrabet, Brahim Maylal, Latifa Al Yacoubi, Nada Aloui, Marwa Kraouaia et Salma Kahlaoui.

Mille mercis à toute l'équipe DFME de Saint Charles : Virginie Baldy, Catherine Fernandez, Anne Bousquet Mélou, Sylvie Dupouyet, Caroline Lecareux, Elena Ormeno, Christine Ballini, Hélène Folzer, Thierry Gauquelin, Mathieu Santonja, Raphaël Gros, Stéphane Greff, Véronique Masotti, Jean-Philippe Mévy et Marie Dominique Salducci. Voilà maintenant 7 ans que j'ai intégré l'équipe pour la première fois ! C'est grâce à vous que j'ai tout appris en écologie, à travers vos enseignements (en L3, M1 et M2), vos encadrements pendant mes différents stages (IUT, L3, M1 et M2) ainsi que vos partages d'expériences et astuces en tout genre au labo, en cours et sur le terrain. Grâce à vous tous, j'ai pu finaliser mon doctorat et accéder au poste d'ATER. Je suis maintenant très fière d'enseigner à mon tour à vos côtés !

Un grand merci aux doctorants et ATER de DFME à Saint Charles. Tout d'abord, un gros bisou à mes coloc's de bureau, Justine Viros et Adriane Aupic-Samain, qui sont maintenant de véritables amies. J'ai passé avec vous et dans ce bureau de supers moments à rire, discuter, travailler (intensément) râler (un peu) et vous me manquez beaucoup. Merci beaucoup à Dounia Dahou et Quentin Lambert pour votre soutien, c'est la dernière ligne droite ! Si j'y suis arrivée vous y arriverez aussi ! Merci à tous les « nouveaux arrivants » : Charlotte Biryol, Justine Laoué et Eliane Schermer, pour vos bonnes ondes et votre énergie positive.

Je remercie mes plus proches amis qui dans « ma vie hors du labo » ont été d'un soutien sans faille. Paupau et Matthias qui sont toujours là pour moi, pour me faire rire, pour refaire le monde et pour partager l'apéro ! Merci mille fois à mes copines de toujours (depuis le collège ou le lycée et pour la vie) : Léa, Méla et Laura. Je n'ai pas toujours été là pour vous pendant la thèse mais je vous promets de me rattraper très vite. A tous, restez comme vous êtes, c'est-à-dire les meilleurs !

Je remercie de tout mon cœur toute ma famille (les Quer et les Bertin). J'ai une pensée affectueuse pour mes grands-parents à qui j'espère venir rendre visite très vite ! Merci à mes deux grands frères (les meilleurs) d'être toujours derrière moi, même si vous ne comprenez pas toujours ce que je fais ! Un énorme merci à mon papa et ma maman, mes modèles dans la vie. Merci de m'avoir permis de faire toutes ces études et d'avoir toujours cru en moi dans le travail comme dans la vie (même à plus de 6000 km). Pour finir le plus grand des remerciements va à Thibault, ma moitié, et mon roc pendant cette aventure, qui m'a toujours soutenue et sans qui cette thèse n'aurait jamais vu le jour !

Merci à tous !

AVANT-PROPOS

Cette thèse de doctorat a été réalisée en co-tutelle entre l'Université du Québec en Abitibi-Témiscamingue et Aix-Marseille Université sous la direction de Annie DesRochers (UQAT) et Virginie Baldy (AMU). Le doctorat s'est déroulé de janvier 2018 à décembre 2021 au sein de l'Institut de Recherche sur les Forêts (IRF) et de l'Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Écologie marine et continentale (IMBE, UMR CNRS 7263, IRD 237) dans l'équipe Diversité et Fonctionnement : des Molécules aux Écosystèmes (DFME). J'étais rattachée au programme de doctorat sciences de l'environnement (358F) à l'UQAT et à l'école doctorale ED 251 à AMU.

Ma bourse de doctorat a été financée par une subvention à la découverte obtenue par Annie DesRochers et délivrée par le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG). L'IMBE a également participé aux frais de recherche et de fonctionnement nécessaires à la réalisation de cette thèse.

Les travaux de recherche sont présentés sous forme de thèse par articles. Elle se compose de trois chapitres ainsi que d'une introduction, d'un matériel et méthodes et d'une discussion générale.

Le premier chapitre fait l'objet d'un article publié dans la revue à comité de lecture *Forest Ecology and Management* : Quer, E., Baldy, V., & DesRochers, A. (2020). Ecological drivers of root grafting in balsam fir natural stands. *Forest Ecology and Management*, 475, 118388. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2020.118388>.

Le second chapitre fait l'objet d'un article soumis dans la revue à comité de lecture *Oikos* en Juillet 2021 : Quer, E., Helluy, M., DesRochers, A., & Baldy, V. (2021). Does natural root grafting make trees better competitors?

Le troisième chapitre fait l'objet d'un article en préparation pour la revue à comité de lecture *Journal of Chemical Ecology* : Quer, E., Michel, T., DesRochers, A., & Baldy, V. (2021). Investigation of a potential chemical determinism of root grafting.

Étant la principale contributrice à la collecte des données, au travail de laboratoire, aux analyses statistiques, à l'interprétation des résultats et à l'écriture des articles, je suis première auteure de tous les articles. Mes directrices de thèse ont contribué à la conception du projet, à la mise en place du plan expérimental, à l'interprétation des résultats et à l'amélioration des articles et de ce manuscrit dans sa globalité. Leurs places dans les listes des auteurs sont fonction de leur implication respective dans la réalisation de chacun des articles. J'ai reçu les conseils avisés de Manon Helluy pour la réalisation des modèles linéaires de croissances du second article et elle a participé à la relecture de celui-ci, c'est pourquoi elle se trouve en deuxième auteure. Thomas Michel a réalisé l'identification des biomarqueurs des greffes racinaires du troisième article et a participé à la relecture de celui-ci, lui attribuant la place de deuxième auteur. Elizabeth Turcotte a mené et supervisé l'excavation hydraulique des peuplements de sapins baumiers pour le premier article. Stéphane Greff a supervisé et réalisé l'acquisition des données MS et MS² par UHPLC ESI QTOF (plateforme MALLABAR, financée par le CNRS, la région PACA, la foundation TOTAL et l'ANR).

J'ai bénéficié des conseils et de l'expertise en écologie forestière de Bernard Prévosto et Frédérique Guibal, membres de mon comité de thèse, lors de la réalisation de ces travaux de recherches.

Dans le cadre de ce doctorat, je me suis impliquée dans la recherche scientifique, l'enseignement et la vulgarisation. Le détail de ces activités est décrit ci-dessous.

Communications à des colloques:

Mai 2021 : Quer, E., DesRochers, A., Baldy, V. Déterminants écologiques des greffes racinaires chez le sapin baumier, présentation orale par visioconférence, Colloque du CEF, Quebec, Canada.

Avril 2021 : Quer, E., DesRochers, A., Baldy, V. Ma thèse en 180 secondes: Déterminants écologiques et chimiques des greffes racinaires chez le sapin baumier, présentation orale par visioconférence, Journée d'échanges interdisciplinaires de l'ISE UQAM, Quebec, Canada.

Décembre 2020 : Quer, E., DesRochers, A., Baldy, V. Ecological drivers of root grafting in balsam fir natural stands, présentation orale par visioconférence, Colloque de la Chaire AFD, Quebec, Canada.

Octobre 2020 : Quer, E., DesRochers, A., Baldy, V. Les drivers écologiques et chimiques des greffes racinaires chez le sapin baumier (*Abies balsamea*) en forêt boréale Québécoise, présentation orale par visioconférence, Journée des doctorants de l'IMBE, Marseille, France.

Octobre 2019 : Quer, E., DesRochers, A., Greff, S., Dupouyet, S., Duval, P., Lecareux, C., Baldy, V. Study of root grafting in balsam fir (*Abies balsamea*), Poster, Journées du GDR MediaTEC, Lille, France.

Octobre 2019 : Quer E., Pereira S., Santonja M., Gauquelin T., Simioni G., Ourcival J.-M., Joffre R., Limousin J.-M., Aupic-Samain A., Greff S., Lecareux C., Dupouyet S., Orts J.-P., Reiter I., Bousquet-Mélou A., Gros R., Sagova-Mareckova M., Fernandez C., Baldy V. 2019. Climate change alters leaf litter chemistry, slowdowns litter decomposition and modifies "Home field advantage" in three Mediterranean forests, Poster, Conférence finale OTMED - what kind of environmental transition for the mediterranean region ? , Marseille, France.

Mars 2019 : Quer, E., DesRochers, A., Greff, S., Dupouyet, S., Duval, P., Lecareux, C., Baldy, V. Etude des greffes racinaires chez le sapin baumier (*Abies balsamea*), présentation orale, Congrès de l'école doctorale ED 251, Marseille, France.

Novembre 2018 : Quer, E., DesRochers, A., Greff, S., Dupouyet, S., Duval, P., Lecareux, C., Baldy, V. Study of root grafting in balsam fir (*Abies balsamea*), présentation orale, Journées du GDR MediaTEC, Rennes, France.

Enseignements :

Octobre 2020/ Août 2021 : Attachée Temporaire à l'Enseignement et à la Recherche en biologie des populations et des écosystèmes. Total de 138h équivalent TD effectuées en Cours Magistraux (CM), Travaux Pratiques (TP), Travaux Dirigés (TD), Pédagogie Active (PA). Niveaux : Master 1, Licence 1, 2 et 3.

Septembre 2021/ Août 2022 : Attachée Temporaire à l'Enseignement et à la Recherche en écologie forestière. Total de 196h équivalent TD effectués en Cours Magistraux (CM), Travaux Pratiques (TP), Travaux Dirigés (TD), Pédagogie Active (PA). Niveaux : Master 1 et 2, Licence 1, 2 et 3.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS.....	v
LISTE DES FIGURES.....	xiii
LISTE DES TABLEAUX.....	xvi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xviii
LISTE DES SYMBOLES ET UNITÉS.....	xx
RÉSUMÉ.....	xxi
ABSTRACT.....	xxii
CHAPITRE I : INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1 Processus de formation des greffes racinaires naturelles.....	4
1.2 Facteurs impliqués dans la formation des greffes racinaires.....	6
1.2.1 Les facteurs associés aux peuplements, aux arbres et à leurs racines.....	6
1.2.2 Les facteurs édaphiques.....	7
1.2.3 Les facteurs génétiques.....	8
1.2.4 Les facteurs chimiques.....	9
1.3 Rôle écologique des greffes racinaires.....	12
1.4 Les greffes racinaires en forêt boréale au Québec.....	15
1.4.1 Etat des connaissances.....	15
1.4.2 Cas du sapin baumier (<i>Abies balsamea</i> (L.) Mill.).....	16
1.5 Objectifs et structure de la thèse.....	17
CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	22
2.1 Contexte écologique.....	22
2.1.1 La forêt boréale au Québec.....	22
2.1.2 La région de l'Abitibi Témiscamingue.....	24
2.2 Espèce étudiée : le sapin baumier (<i>Abies balsamea</i> (L.) Mill.).....	25
2.3 Sites étudiés.....	27

2.4 Caractérisation des peuplements de sapins baumiers et estimation de la fréquence des greffes racinaires.....	29
2.4.1 Mesure <i>in situ</i>	29
2.4.2 Excavation hydraulique des systèmes racinaires.....	29
2.4.3 Détermination de l'âge des arbres, des racines et des greffes racinaires.	31
2.4.4 Mesures du diamètre des racines.....	31
2.5 Influence des greffes racinaires et de la compétition intraspécifique sur la croissance des sapins baumiers.....	32
2.5.1 Mesures de la croissance radiale des arbres.....	32
2.5.2 Modèle de croissance.....	32
2.6 Influence de la chimie des racines et de leurs exsudats sur la formation des greffes racinaires.....	33
2.6.1 Collecte des échantillons de racines fines et extraction.....	33
2.6.2 Collecte des échantillons d'exsudats racinaires et extraction.....	34
2.6.3 Analyses métabolomiques.....	36
2.6.4 Caractéristiques physico chimiques du sol.....	40
CHAPITRE III : FRÉQUENCE ET FACTEURS DE FORMATION DES GREFFES RACINAIRES DANS LES PEUPELEMENTS NATURELS DE SAPINS BAUMIERS.....	41
3.1 Résumé.....	43
3.2 Abstract.....	44
3.3 Introduction.....	45
3.4 Material and methods.....	47
3.4.1 Study sites and stands characterization.....	47
3.4.2 Root systems excavation and root measurements.....	48
3.4.3 Statistical analyses.....	49
3.5 Results.....	50
3.6 Discussion.....	57
3.7 Conclusion.....	63
3.8 Acknowledgements.....	63
CHAPITRE IV : INFLUENCE DES GREFFES RACINAIRES ET DE LA COMPÉTITION INTRASPÉCIFIQUE SUR LA CROISSANCE DES PEUPELEMENTS NATURELS DE SAPINS BAUMIERS.....	64

4.1 Résumé.....	66
4.2 Abstract	68
4.3 Introduction.....	69
4.4 Material and methods.....	71
4.4.1 Study sites.....	71
4.4.2 Tree radial growth analyses by tree ring width series measurement.....	73
4.4.3 Intraspecific competition measurements by using competition indices.....	74
4.4.4 Statistical analyses.....	75
4.5 Results.....	76
4.5.1 Tree growth models selection.....	76
4.5.2 Effects of root grafting, intraspecific competition and tree size on annual tree growth.....	78
4.6 Discussion.....	81
4.7 Conclusion.....	84
4.8 Speculations.....	84
4.9 Acknowledgements.....	85
CHAPITRE V : DÉTERMINISME CHIMIQUE DES GREFFES RACINAIRES CHEZ LE SAPIN BAUMIER.....	86
5.1 Résumé.....	88
5.2 Abstract.....	89
5.3 Introduction.....	90
5.4 Material and methods.....	93
5.4.1 Study sites.....	93
5.4.2 Tree and root selection.....	94
5.4.3 Fine root sampling, preparation and extraction.....	95
5.4.4 Root exudate sampling preparation and extraction.....	95
5.4.5 Fine roots and exudates chemical analysis.....	96
5.4.6 Soil physico-chemical characteristics.....	99
5.4.7 Statistical analysis.....	99
5.5 Results.....	100

5.5.1 Metabolomic analysis.....	100
5.5.2 Soil physico-chemical characteristics.....	117
5.6 Discussion.....	118
5.6.1 PSMs determined root grafting.....	118
5.6.2 Soil characteristics potentially affect roots and exudates metabolomic profiles.....	121
5.7 Conclusion.....	122
5.8 Acknowledgements.....	123
CHAPITRE VI : DISCUSSION GÉNÉRALE.....	124
6.1 La formation des greffes racinaires chez le sapin baumier : un phénomène fréquent principalement médié par la proximité entre les arbres.	125
6.2 Effet d'interaction entre les greffes racinaires et la compétition intraspécifique sur la croissance des arbres.....	127
6.3 Sur la piste d'un déterminisme chimique des greffes racinaires.....	130
6.4 Quelles implications pour l'aménagement forestier ?.....	133
6.5 Conclusion.....	134
ANNEXE A.....	136
ANNEXE B.....	140
ANNEXE C.....	142
RÉFÉRENCES.....	149

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Photographie d'une coupe transversale d'une greffe racinaire de sapin baumier (<i>Abies balsamea</i> (L.) Mill.). Notez la jonction des couches de xylème et de phloème et la zone centrale avec formation de cal. La flèche noire désigne une "poche d'écorce" indiquant une fusion plus ou moins complète des tissus. La flèche blanche montre le premier anneau de croissance commun entre les deux racines greffées.....	5
2.1 Carte simplifiée des zones, sous-zones et domaines bioclimatiques de la forêt boréale au Québec (réalisée d'après Cauboue, 2007; Robitaille et Saucier, 1996; Saucier <i>et al.</i> , 2010).....	24
2.2 Distribution géographique du sapin baumier (<i>Abies balsamea</i> (L.) Mill.) (Cauboue, 2007).....	26
2.3 Localisation des six sites étudiés en Abitibi Témiscamingue, Québec. Les peuplements étudiés dans les Chapitres III et IV sont en blanc et ceux étudiés dans le Chapitre V sont en rouge.	28
2.4 Excavation hydraulique des systèmes racinaires de sapins baumiers (<i>Abies balsamea</i> (L.) Mill.). (a) Décapage du sol à l'aide d'une lance à haute pression. (b) Systèmes racinaires une fois excavés et avant collecte.	30
2.5 Photographie de l'excavation manuelle d'une racine fine de sapin baumier (<i>Abies balsamea</i> (L.) Mill.).	34
2.6 Système de cuvette utilisé pour la collecte des exsudats racinaires de sapin baumier (d'après Michalet <i>et al.</i> (2013) et Phillips <i>et al.</i> (2008)).....	36
2.7 Schéma récapitulatif des différentes étapes réalisées pour l'analyse métabolomique des exsudats racinaires et des racines fines de sapins baumiers (<i>Abies balsamea</i> (L.) Mill.).	40

3.1	Percentage of grafted <i>Abies balsamea</i> trees observed in the 3 sites ($\pm$ SE) in relation to tree age at graft initiation. Differences between classes were tested by using Pearson's χ^2 test (χ^2 value is represented, ns: non-significant, with $P = 0.07$ and $N = 38$).....	52
3.2	Percentage of grafted <i>Abies balsamea</i> roots observed in the 3 sites ($\pm$ SE) in relation to root age (A) and root diameter (B) at graft initiation. Differences between classes were tested by using Pearson's χ^2 test ($a > b > c > d$, different letters indicate significant differences, χ^2 value are represented with *: $P < 0.05$ and $N = 86$, ***: $P < 0.001$ and $N = 81$).	53
3.3	Percentage of root grafts observed in the 3 sites ($\pm$ SE) in relation to distance between grafted trees. Differences between distance classes were tested by using Pearson's χ^2 test (χ^2 value is represented, ns: non-significant with $P = 0.25$ and $N = 58$).....	54
3.4	Model projections and partial residuals of number of grafts per <i>Abies balsamea</i> as a function of distance between trees and number of roots per tree. Number of roots = 2 and Number of roots = 10 correspond to the lower and upper percentiles (e.g. 10 th and 90 th). Point colors are determined by the closest value of the number of roots. (95% confidence intervals are highlighted, $R^2 = 33\%$, $N = 80$).....	56
3.5	Conditional inference tree for number of grafts per tree in relation to number of roots and distance between grafted trees (m). The numbers inside the squares identify the nodes and the order of variable/partition entrances, starting with 1 in the root node. The predicted number of grafts per tree for each node is specified by boxplots in the lower part of the figure ($R^2 = 44\%$, $N = 80$).....	57
4.1	Mean Basal Area Increment (BAI, in mm ²) of <i>Abies balsamea</i> in relation to graft status (BG: Before Grafting, NG: Non-Grafted). Differences between graft status were tested by using One-way ANOVA (Different letters indicate differences with $a > b$, F value is represented with **: $P < 0.01$ and $N = 110$). The first 38 years of tree growth were considered for this analysis corresponding to mean age of trees at graft initiation (Quer <i>et al.</i> 2020)	78
4.2	Predicted effects of: a) Basal Area (BA), b) the interaction between Basal area of the larger tree (BAL) and graft status (Status) on <i>Abies balsamea</i> annual Basal Area Increment	

	(BAI). G: Grafted, NG: Non-grafted. 95% confidence intervals are highlighted in grey. Black straight lines are data and N = 110.	80
5.1	Location of the study sites.....	94
5.2	Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) on fine roots metabolic fingerprints according to the site (a: Site 1, b: Site 2, c: Site 3) and to the root grafting status of the trees (G: grafted, NG: non-grafted). One-way PERMANOVA (10^4 permutations) were performed on fine root metabolomic data to discriminate effects of root grafting status according to the sites. F values were represented with *: $P < 0.05$ and ns: $P > 0.05$	102
5.3	Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) on root exudate metabolic fingerprints according to the site (a: site 1, b: site 2) and to the root grafting status of the trees (G: grafted, NG: non-grafted). One-way PERMANOVA (10^4 permutations) were performed on root exudate metabolomic data to discriminate effects of root grafting status according to the site. F values were represented with **: $P < 0.01$ and ***: $P < 0.001$	103
5.4	The base peak chromatograms of <i>Abies balsamea</i> root (a) and exudate (b) extracts from grafted (in green) and non-grafted trees (in red). The VIPs that we were able to annotate were marked with an *. UHPLC-ESI-QTOF was performed with a Luna® Omega Polar C18 column (2.1 mm× 100 mm, 1.6 µm, Phenomenex®). Experimental spectrums are represented in negative mode (ESI-).	104
5.5	Mean ($\pm$ SE) total phenolic content of fine roots from grafted (G; grey bars) and non-grafted (NG; white bars) balsam firs according to the study sites. Differences between sites and root grafting status of trees were tested by using two ways ANOVA followed by Tukey tests (F values are represented, ns: non-significant with $P > 0.05$, ***: $P < 0.001$ and N = 90). Different letters indicate significant differences between sites with $a < b$	116
5.6	Principal Component Analysis (PCA) based on the 13 soil physico-chemical parameters (arrows) arranged by study sites (colored circles). CEC: cationic exchange capacity, C: Carbon, Ca: Calcium, K: Potassium, Mg: Magnesium, TOM: Total organic matter, N: Nitrogen, Na: Sodium and P: Phosphorous.	117

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
1.1	Tableau récapitulatif des principaux objectifs et hypothèses de la thèse.....	21
3.1	Main characteristics of the three <i>Abies balsamea</i> excavated stands).....	48
3.2	Root systems and grafts characteristics of the three <i>Abies balsamea</i> excavated stands.....	51
3.3	Output of negative binomial generalized linear model (GLM.NB) testing the effects of tree age, DBH, number of roots per tree, mean root diameter and distance between trees on the number of root grafts per tree.....	55
4.1	Root grafting occurrence and site characteristics of the three <i>Abies balsamea</i> excavated stands (according to Quer <i>et al.</i> , 2020).....	72
4.2	Linear mixed-effects models tested to describe the annual Basal Area Increment (BAI) of <i>Abies balsamea</i> according to the competition indexes (HEG and BAL), the Basal Area of the previous year (BA) and the graft presence (Status). Trees, sites and years were set as random effects.	77
4.3	Output of the linear mixed-effects model testing the effect of the Basal Area (BA) and the interaction between competition index (BAL) and graft status (Status) on the annual Basal Area Increment (BAI) of grafted and ungrafted <i>Abies balsamea</i> . Trees, sites and years were fixed as random effects.	79
5.1	Two-way PERMANOVA (10^4 permutations) performed on fine root and root exudate metabolomic data to discriminate effects of the root grafting status, the site and their interaction.	101
5.2	Root grafting biomarkers of <i>Abies balsamea</i> fine roots highlighted through the VIP (Variable Important in Projection), and their annotations. Annotations were performed by using a combination of accurate mass, isotope	

	ratio, MS ² fragmentation and public libraries (i.e. KNapSAcK, Dictionary of Natural Products, HMDB, ChEBI and PubChem). The Bruker Compass DataAnalysis 4.3 software was also used to analyze and identify the compounds using MS and MS ² spectra. RT: retention time (min); G: Grafted; NG: Non-grafted. mSigma is a constructor quality value of the formula determination. The closer the value is to zero more accurate is the result	108
5.3	Root grafting biomarkers of <i>Abies balsamea</i> exudates highlighted through the VIP (Variable Important in Projection), and their annotations. Annotations were performed by using a combination of accurate mass, isotope ratio, MS ² fragmentation and public libraries (i.e. KNapSAcK, Dictionary of Natural Products, ChEBI, HMDB and PubChem). The Bruker Compass DataAnalysis 4.3 software was also used to analyze and identify the compounds by using MS and MS ² spectra. RT: retention time (min); G: Grafted; NG: Non-grafted. mSigma is a constructor quality value of the formula determination. The closer the value is to zero more accurate is the result	112

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AIC : Akaike Information Criterion / Critère d'information d'Akaike

ANOVA : Analysis of variance / Analyse de variance

AT : Abitibi Témiscamingue

BA : Basal area / Surface basale

BAI : Basal area increment / Incrément de surface basale

BAL : Basal area of the larger tree / Surface basale de l'arbre le plus gros

BG : Before grafting tree / Future arbre greffé

C : Carbone

Ca : Calcium

CEC : Capacité d'échange cationique effective

CI : Competition index / Indice de compétition

DBH : Diameter breast height (130 cm) / DHP Diamètre à hauteur de poitrine (130 cm)

Dist : Distance

Fe : Fer

G : Grafted tree / Arbre greffé

GC-MS : Gaz chromatography-mass spectrométrie/ Chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse

GLM NB : General linear model with negative binomial family / Modèle linéaire généralisé avec famille négative binomiale

H : Hydrogène

HEG : Hegyi competition index / indice de compétition d'Hegyi

K : Potassium

LC-MS : Liquid chromatography-mass spectrométrie/ Chromatographie liquide-spectrométrie de masse

LMER : Linear mixed effects model / Modèle linéaire à effets mixtes

m/z : masse/charge

MADD : Modèle arbre dépendant la distance

Mg : Magnésium

MPM : Most parcimonious model / Modèle le plus parcimonieux

MS : Mass spectrometer / Spectrométrie de masse

N : Azote

NA : Not available / Non disponible

Na : Sodium

NG : Non-grafted tree / Arbre non-greffé

No : Numéro

O : Oxygène

P : Phosphore

PERMANOVA : Permutational analyse of variance / Analyse de la variance avec permutation

PES : Polyester

pH : potentiel d'hydrogène

PLSDA : Partial least squares discriminant analysis / Analyse discriminante des moindres carrés partiels

PSMs : Plant secondary metabolisms / Métabolites secondaires des végétaux

PTFE : Polytetrafluoroéthylène (teflon)

RT : Retention time / Rétention time

S/N : Signal/Noise / Signal/Bruit

SE : Standard error / ES Erreur standard

TOM : Total organic matter / Matière organique totale

UHPLC-ESI-QTOF : Ultra high performance liquid chromatography-Electrospray ionization-Quadrupole time of flight / Chromatography liquide à haute performance-Ionisation par électronébuliseur-Quadripôle à temps de vol

UV : Ultra Violet

VIP : Variable importance in projection / Variable d'importance pour la projection

LISTE DES SYMBOLES ET UNITÉS

% : percent / pourcentage

°C : Celsius degree / degré Celsius

°N : north latitude degree / degré de latitude Nord

μL : microliter / microlitre

cm : centimeter / centimètre

ha : hectare

km : kilometer / kilomètre

m : meter/mètre

min : minute

mg : milligram / milligramme

mm : millimeter / millimètre

sec : seconde

Da : Dalton

amu : atomic mass unit / unité de masse atomique

RÉSUMÉ

Les greffes racinaires naturelles résultent de la fusion des tissus vasculaires de deux racines provenant d'arbres distincts. Elles permettent la redistribution d'eau, de nutriments et de produits de la photosynthèse entre les arbres affectant leur croissance et leur physiologie. Bien que des greffes aient été observées chez plus de 200 espèces d'arbres, leur processus de formation et leur rôle écologique dans les interactions entre arbres restent mal connus. Dans ce contexte, trois peuplements de sapins baumiers (*Abies balsamea* (L.) Mill.) en forêt boréale au Québec ont été excavés hydrauliquement afin de déterminer la fréquence des greffes et de caractériser leurs facteurs de formation. Dans un second temps, l'effet d'interaction entre la compétition intraspécifique et les greffes racinaires sur la croissance des sapins a été évalué en utilisant des modèles linéaires de croissance. Enfin, l'hypothèse selon laquelle les arbres pourraient libérer des composés allélopathiques dans le sol pouvant stimuler ou inhiber la formation des greffes a été testée. Pour cela, les profils métabolomiques d'exsudats et de racines fines d'arbres greffés et non-greffés ont été comparés. Nous avons démontré que : i) en moyenne 36 % des arbres étaient greffés au sein des peuplements et que la proximité entre les arbres était le meilleur prédicteur de la formation des greffes; ii) une fois les arbres greffés, leur croissance était fortement réduite lors de l'augmentation de la compétition intraspécifique; iii) les stilbènes et flavonoïdes libérés dans le sol par les racines de sapins seraient de potentiels inhibiteurs de la formation des greffes. Les greffes pourraient donc jouer un rôle clé dans la dynamique des peuplements en rendant les arbres plus sensibles à la compétition intraspécifique et potentiellement en accélérant la phase d'auto-éclaircie. Les profils métabolomiques différents entre les racines et exsudats d'arbres greffés ou non constituent une première évidence d'un déterminisme chimique des greffes.

Mots clés : *Abies balsamea*, Greffes racinaires, Forêt boréale, Compétition, Ecologie chimique

ABSTRACT

Natural root grafts (i.e. anastomosis) result from the fusion of the vascular systems of two roots from different trees. They allow trees to reallocate water, nutrients and photosynthates affecting tree growth and physiology. Although, root grafting was reported within more than 200 tree species, little is known about their formation process and ecological role in tree interactions. In this context, three natural balsam firs (*Abies balsamea* (L.) Mill.) stands of the boreal forest of Quebec (Canada) were hydraulically excavated to assess root grafting frequency and their formation factors. Then, the interaction effect between intraspecific competition and root grafting on balsam fir growth was evaluated by using linear growth models. Finally, the hypothesis that trees could release allelopathic compounds into the soil that could stimulate or inhibit root graft formation was tested. Thus, metabolomic profiles of roots and exudates from grafted and non-grafted trees were compared. We demonstrated that: i) on average, 36% of trees were grafted within the stands and tree proximity was the best predictor of root grafting followed by number of roots per tree; ii) once trees were grafted, their growth was strongly reduced with intraspecific competition; iii) stilbenes and flavonoids released in the soil by balsam fir roots could be putative inhibitors of root grafting. Root grafting could therefore play a key role in stand dynamics by making trees more sensitive to intraspecific competition and potentially accelerating the self-thinning phase. The different metabolomic profiles between roots and exudates of grafted and non-grafted trees provided the first evidence for chemical determinism of root grafting.

Key words: *Abies balsamea*, Root grafting, Boreal forest, Competition, Chemical ecology

CHAPITRE I

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le système racinaire, souvent considéré comme la "moitié cachée" d'un arbre (Eshel et Beeckman, 2013) est composé d'organes souterrains linéaires possédant des modèles complexes d'architecture et de croissance (Berntson, 1994; Bertin *et al.*, 2003; Spek, 1997; Thaler et Pages, 1998). Bien que le système racinaire d'un arbre puisse représenter jusqu'à un tiers de sa biomasse totale, son accessibilité réduite limite nos connaissances des processus physiologiques impliqués dans son développement contrairement à celles de la partie aérienne qui est apparente (Raven *et al.*, 2000). Les racines des arbres ne participant pas à la photosynthèse, leurs principales fonctions ont longtemps été résumées à l'ancrage et à l'acquisition passive d'eau et de nutriments contenus dans le sol (De Kroon, 2007). Plus tard, le stockage, la synthèse de régulateurs de croissance, la propagation et la dispersion, ont été considérés comme des fonctions secondaires (Mommer *et al.*, 2016). Il émerge aujourd'hui une prise de conscience commune de la complexité du système racinaire et de son importance en écologie végétale et forestière (Körner, 2011). Il devient notamment de plus en plus évident que des mécanismes élaborés d'interactions entre les racines peuvent se mettre en place (Callaway et Mahall, 2007; De Kroon, 2007; Mommer *et al.*, 2016).

En écologie forestière, il est classiquement admis que les interactions entre arbres sont dominées par la compétition indirecte pour les ressources. Elle est définie comme une interaction négative entre les arbres, inter- ou intraspécifique, par interférence indirecte pour l'exploitation de ressources communes (i.e. la lumière, l'eau et les nutriments) (Connell, 1990). Entre racines, le principal moteur de la

compétition est la capacité d'absorption des ressources par la plante (Schenk, 2006; Tilman, 1982). Les individus capables d'acquérir la plus grande part d'eau et de nutriments provenant du sol gagnent la compétition au détriment des autres individus (Lamb *et al.*, 2009).

Cependant, les interactions entre racines semblent plus spécifiques que la simple compétition indirecte pour les ressources (Callaway et Mahall, 2007; De Kroon, 2007; Mommer *et al.*, 2016). C'est au niveau de la rhizosphère, c'est-à-dire à l'interface entre les racines et le sol, que des interactions complexes entre les composés chimiques excrétés par les racines (i.e. les exsudats racinaires), la communauté microbienne du sol (i.e. le rhizobiome) et les racines elles-mêmes vont se mettre en place (Bais *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2021). Par exemple, il est reconnu que les métabolites secondaires contenus dans les exsudats racinaires et sécrétés par les racines peuvent directement inhiber la croissance des racines des arbres environnants ou indirectement en modifiant la composition et la structure du sol (i.e. allélopathie) (Rice, 2012).

Plus récemment, les interactions positives entre arbres – la facilitation – ont été mises en avant comme un processus essentiel à la meilleure compréhension de la dynamique des écosystèmes forestiers (Cavard *et al.*, 2011; McIntire et Fajardo, 2014). La facilitation entraîne la modération des stress biotiques et abiotiques, un enrichissement en ressource ou bien une facilitation de l'accès aux ressources du milieu (Pommerening et Sánchez Meador, 2018). Par exemple, au niveau racinaire, il est aujourd'hui bien connu que les réseaux mycéliens formés entre les racines des arbres par les mycorhizes leur permettent d'améliorer indirectement leur croissance en permettant le transfert d'eau, de carbone et de nutriments (Leake *et al.*, 2004; Simard *et al.*, 2012; Simard et Durall, 2004).

Il est cependant bien souvent négligé que les arbres sont capables d'interagir entre eux de manière directe par des « connections racinaires ». Il est communément admis que les espèces capables de se régénérer de manière asexuée par drageonnement, peuvent former de vastes réseaux d'arbres interconnectés par les

racines parentales (DeWoody *et al.*, 2008). Ces réseaux racinaires permettent aux arbres d'interagir directement entre eux *via* la translocation de ressources modifiant ainsi leur croissance et la dynamique des peuplements forestiers (Alpert et Mooney, 1986; Stueffer *et al.*, 1996).

De plus, la rencontre de plusieurs racines peut provoquer la formation de « greffes racinaires naturelles » (i.e. anastomoses) résultant de la fusion de leurs tissus vasculaires (Bormann, 1966; Mudge *et al.*, 2009). Les greffes racinaires peuvent se former entre les racines d'un même arbre (i.e. autogreffe), entre arbres de la même espèce (i.e. greffe intraspécifique) (Basnet *et al.*, 1993; Bormann et Graham, 1966; Saunier et Wagle, 1965) ou, plus rarement, entre arbres de différentes espèces (i.e. greffe interspécifique) (Bormann et Graham, 1966). L'établissement de la continuité des tissus vasculaires va permettre la redistribution de ressources à travers la mise en place d'un système racinaire commun entre les arbres interconnectés (Bader et Leuzinger, 2019; Fraser *et al.*, 2006; Tarroux et DesRochers, 2011). Ainsi, les greffes racinaires constituent une voie de transfert directe de substances, pouvant être bénéfiques ou néfastes pour les arbres interconnectés, et pouvant influencer leur croissance ainsi que la dynamique de leurs peuplements (Bormann et Graham, 1960; Jelinkova *et al.*, 2012; Tarroux et DesRochers, 2011). Bien que méconnue, la formation de greffes racinaires a été observée chez environ 200 espèces (Bormann et Graham, 1966; Larue, 1952) et il est suggéré qu'elles n'ont probablement pas encore été découvertes chez des milliers d'autres en raison de la problématique de « la moitié cachée » (Lev-Yadun, 2011). Les études plus récentes reportent leur présence aussi bien chez des espèces boréales (*Populus balsamifera* L. x *Populus trichocarpa* Torrey & A. Gray et *Populus maximowiczii* A. Henry x *Populus balsamifera* L.) (Gaspard et DesRochers, 2020), que tropicales (*Avicennia germinans* L.) (Vovides *et al.*, 2021). De plus, les greffes racinaires ont été observées aussi bien dans les plantations forestières que dans des forêts naturelles (Tarroux et DesRochers, 2010).

Ainsi, la formation de greffes racinaires remet en question de nombreux concepts traditionnels en écologie forestière. Les racines ne peuvent plus être réduites à leur

fonction première d'acquisition de ressources. Les arbres peuvent interagir directement les uns avec les autres *via* le transfert de substances au travers des greffes racinaires. Les racines et les arbres greffés ne sont pas indépendants les uns des autres et peuvent non seulement interagir par des relations de compétition mais aussi potentiellement de facilitation *via* le transfert de ressources (Keeley, 1988; Loehle et Jones, 1990; Tarroux *et al.*, 2010). Enfin, la formation de greffes racinaires est un processus souterrain pouvant affecter la croissance et la physiologie de l'arbre dans son ensemble (Tarroux *et al.*, 2010). Il devient donc nécessaire de mieux comprendre le rôle des greffes racinaires dans le fonctionnement des écosystèmes forestiers. Nous rappelons brièvement ci-dessous l'état des connaissances sur les processus et les facteurs déterminants la formation des greffes racinaires ainsi que sur leur rôle écologique. Nous faisons un focus sur les greffes racinaires en forêt boréale et plus spécifiquement pour le sapin baumier qui fait l'objet de ces travaux. Ce cadre nous permet par la suite d'introduire les objectifs de la thèse.

1.1 Processus de formation des greffes racinaires naturelles

Jusque dans les années 60, les greffes racinaires ont été décrites comme une curiosité botanique, puis de nombreuses études ont tenté d'expliquer les processus impliqués dans leur formation (Bormann et Graham, 1960). Généralement, les greffes racinaires naturelles sont résumées comme : « une union morphologique du cambium, du phloème et du xylème de deux ou plusieurs racines précédemment distinctes » (Bormann, 1966). Plus précisément, la formation d'une greffe racinaire a été décrite en 5 étapes : i) la rencontre de deux ou plusieurs racines crée un point de contact, ii) le maintien de la croissance radiale et sa stimulation autour de ce point créent une pression, iii) la formation d'un « cal » ajouté à l'abrasion de l'écorce provoque sa rupture, iv) la décomposition de l'écorce permet la fusion des tissus vasculaires, v) la cicatrisation et les réponses immunitaires liées à ce processus permet d'éviter les maladies et de maintenir la greffe (Bormann et Graham, 1966, 1959; Eis, 1972; Loehle et Jones, 1990).

Au niveau anatomique, la coupe transversale d'une greffe racinaire fait apparaître un anneau de croissance commun indiquant une fusion des tissus vasculaires. Très souvent, la fusion plus ou moins complète des tissus entraîne la formation d'une « poche d'écorce » à partir de l'écorce restante qui est caractéristique de ce type de formation (Figure 1.1) (Bormann, 1966; Eis, 1972).



Figure 1.1 : Photographie d'une coupe transversale d'une greffe racinaire de sapin baumier (*Abies balsamea* (L.) Mill.). Notez la jonction des couches de xylème et de phloème et la zone centrale avec formation de cal. La flèche noire désigne une "poche d'écorce" indiquant une fusion plus ou moins complète des tissus. La flèche blanche montre le premier anneau de croissance commun entre les deux racines greffées.

Autour du point de fusion des racines se forme une callosité (Melnik et Meyerowitz, 2015; Mudge *et al.*, 2009). D'un point de vue histologique, la structure du bois la composant est plus complexe que celle des racines ordinaires car des trachéides sont produites le long de deux axes, permettant des transferts de

substances entre les racines greffées (Bormann, 1966). Ainsi, cette callosité pourrait être une réponse à une blessure causée par l'abrasion et la rupture de l'écorce et sa protubérance pourrait être due au réarrangement de ses trachéides (Tarroux *et al.*, 2014). Afin d'étudier comment le bois est produit lors de la formation des greffes, Tarroux *et al.* (2014) ont prélevé des échantillons de cambium sur différentes greffes et ont comparé leurs génotypes à celui des deux arbres greffés dont elles étaient chacune issues. Globalement, les profils génétiques des greffes étaient une combinaison des allèles trouvés dans les deux arbres greffés. Le bois produit autour des racines greffées semble donc synthétisé par les deux arbres. Les auteurs suggèrent que cela pourrait être considéré comme un exemple de mosaïque génétique ou de chimérisme (Pineda-Krch et Lehtila, 2004).

1.2 Facteurs impliqués dans la formation des greffes racinaires

1.2.1 Les facteurs associés aux peuplements, aux arbres et à leurs racines

De nombreuses études suggèrent que la formation de greffes racinaires est le résultat d'une coïncidence et de la rencontre aléatoire de deux ou plusieurs racines (Loehle et Jones, 1990). Ainsi, une des hypothèses la plus explorées est que la proximité entre les arbres, la densité du peuplement et la densité des racines favorisent la formation des greffes racinaires (Adonsou *et al.*, 2016b; Bormann et Graham, 1959; Fraser *et al.*, 2005; Külla et Lõhmus, 1999; Schultz, 1972). En effet, les racines ont plus de chance d'être greffées si elles sont proches. De même, une racine a plus de chance d'être en contact avec celle d'un arbre voisin si la densité d'arbres au sein du peuplement ainsi que la densité de leurs racines sont élevées (Bormann, 1961). Il a cependant été démontré que la proximité des arbres est un meilleur prédicteur de la formation des greffes racinaires que la densité du peuplement ou des racines car elle représente mieux l'organisation spatiale des arbres (Tarroux et DesRochers, 2010).

Outre la densité et la proximité, de nombreux facteurs propres aux arbres ont été étudiés pour expliquer la formation des greffes racinaires. La morphologie des

racines et la structure des systèmes racinaires sont des facteurs importants pour expliquer la formation des greffes. Elles se forment plus souvent entre des racines horizontales (i.e. racines latérales) que des racines verticales (i.e. racines pivotantes et des racines plongeantes) qui ont une probabilité limitée d'entrer en contact avec d'autres racines (Küllä et Löhmnus, 1999; Larue, 1952). La taille des racines influence également la formation des greffes racinaires. De manière générale, les greffes racinaires s'initient lorsque les racines ont une écorce fine et facile à rompre, tout en conservant un diamètre suffisant pour permettre un bon ancrage dans le sol. Par exemple, 81% et 63% des greffes racinaires se formaient lorsque les racines ont respectivement un diamètre < 3 cm dans des peuplements d'épicéas de Norvège (*Picea abies* (L.) H. Karst.) et de pins tordus (*Pinus contorta* Douglas ex J.W.Loudon) (Fraser *et al.*, 2005; Küllä et Löhmnus, 1999). Plusieurs études ont été réalisées dans le but d'établir un lien entre l'âge des racines et celui des arbres au moment de l'initiation des greffes racinaires et la formation de greffes. Cependant, ceux-ci sont très variables en fonction des espèces et au sein des peuplements. En effet, les greffes peuvent apparaître tôt ou tard dans la vie de l'arbre et il semble difficile de déterminer une tendance générale (Fraser *et al.*, 2005; Tarroux et DesRochers, 2010). Par exemple, les greffes racinaires sont formées au niveau de racines âgées de 18 à 55 ans et pour des arbres âgés de 1 à 90 ans dans les peuplements de pins gris (Tarroux *et al.*, 2010; Tarroux et DesRochers, 2011). De même, dans des peuplements de pins tordus (*Pinus contorta* Douglas ex J.W.Loudon) les greffes racinaires se formaient entre racines âgées de 1 à 30 ans et pour des arbres âgés de 1 à 50 ans (Fraser *et al.*, 2005).

1.2.2 Les facteurs édaphiques.

La texture du sol, son humidité et la position de la pente peuvent modifier l'architecture du système racinaire en limitant : (i) la profondeur verticale d'enracinement, (ii) la propagation horizontale et (iii) le contact entre les racines (Bormann et Graham, 1959). Dans les sols humides, peu profonds et pierreux, les racines sont contraintes à une fine couche de sol et n'ont pas besoin de se développer

en profondeur pour trouver de l'eau. Il semble donc que ce soient les meilleures conditions pour que les racines entrent en contact et forment des greffes (Eis, 1972). En ce sens, il a été démontré que les sols peu profonds (< 30 cm) et pierreux (25-75% de pierres) favorisaient la fréquence des greffes pour le sapin Douglas (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) (Eis, 1972). De manière générale, les sols les plus abrasifs et à texture grossière facilitent la rupture de l'écorce des racines afin que leurs cambiums entrent en contact et fusionnent pour former des greffes racinaires (Bormann et Graham, 1959; Cook et Welch, 1957). Ainsi, il a été établi que pour le pin gris (*Pinus banksiana* Lamb.), le pourcentage d'arbres greffés était plus élevé dans les sols sableux par rapport aux sols argileux (Tarroux et DesRochers, 2010).

1.2.3 Les facteurs génétiques

Les études plus anciennes rapportent qu'un plus grand degré de similarité génétique entre les arbres favorise la formation de greffes racinaires. Cette hypothèse se base sur le constat que les autogreffes (impliquant un seul génotype) sont plus fréquentes que les greffes intraspécifiques (impliquant deux génotypes) et d'autant plus que les greffes interspécifiques (Loehle et Jones, 1990). De plus, les greffes racinaires semblent se produire plus fréquemment pour les espèces d'arbres présentant une grande uniformité génétique comme le pin rouge (*Pinus resinosa* Aiton) (Boys *et al.*, 2005).

Plus récemment, deux études ont combiné des analyses dendrochronologiques et moléculaires afin de reconstruire le développement du système racinaire et d'étudier le lien entre la proximité génétique et l'occurrence des greffes racinaires. Jelinkova *et al.* (2009) ont analysé les systèmes racinaires de trois peuplements monospécifiques de peupliers faux-tremble où différents clones avaient été identifiés à l'aide de marqueurs moléculaires. Les greffes racinaires observées se formaient entre des racines de génotypes identiques ou différents, formant respectivement des greffes intra ou inter-clonales. Le nombre de greffes intra-clonales n'était pas significativement plus élevé que celui des greffes inter-clonales.

La proximité génétique n'était donc pas un bon prédicteur de la formation des greffes racinaires pour cette espèce. Tarroux *et al.* (2014) ont étudié les effets de la proximité spatiale et génétique entre les arbres sur l'occurrence des greffes racinaires dans quatre peuplements de pins gris. La formation des greffes racinaires dépendait principalement de la distance spatiale entre les arbres et, de manière moins importante, de la distance génétique entre les individus (Tarroux *et al.*, 2014). Il a été suggéré que la proximité génétique entre les arbres pourrait expliquer les différences observées dans la fréquence de greffage des racines entre les espèces (Loehle et Jones, 1990) mais pas nécessairement entre les arbres (Tarroux *et al.*, 2014).

1.2.4 Les facteurs chimiques

Il est encore difficile d'expliquer pourquoi certaines espèces comme le pin rouge forment beaucoup de greffes alors que d'autres comme le mélèze laricin (*Larix laricina* (Du Roi) K.Koch) en forment peu ou pas (Larue, 1952). De même, il a déjà été constaté que toutes les racines qui entrent en contact ne forment pas forcément des greffes. Eis (1972) et Tarroux et DesRochers (2010) ont d'ailleurs observé que des racines d'arbres pouvaient passer sur le système racinaire d'un ou de plusieurs arbres voisins pour finalement aller se greffer à un autre arbre beaucoup plus distant. De manière anecdotique, il a été suggéré qu'un mode de communication chimique entre les racines des arbres pourrait stimuler ou inhiber la formation de greffes. Reinartz et Popp (1987) ont émis l'hypothèse que certaines essences forestières comme le noyer noir (*Juglans nigra* L.) et le clavalier d'Amérique (*Zanthoxylum americanum* Mill.) ne forment pas de greffes car elles produiraient un inhibiteur chimique dans le sol limitant les contacts racinaires.

En effet, en plus d'accumuler des composés chimiques biologiquement actifs, les racines produisent et exsudent continuellement des composés dans la rhizosphère (Bais *et al.*, 2004, 2001). Au travers de ces exsudats, les racines communiquent en continu avec les systèmes racinaires environnants des plantes voisines. C'est au niveau des poils absorbants ainsi que des racines primaires et secondaires en

croissance active, que sont libérés de grandes quantités d'exsudats racinaires (Bertin *et al.*, 2003). Les exsudats racinaires sont libérés par au moins trois mécanismes potentiels : la sécrétion active, la diffusion passive et la desquamation de cellules de la coiffe lors de la croissance des racines (Badri et Vivanco, 2009; Neumann et Römheld 2000). Une fois exsudés dans la rhizosphère, les composés chimiques peuvent se disperser à plusieurs décimètres de leur source (Badri et Vivanco, 2009; Bais *et al.*, 2001; Inderjit et Weston, 2003; Vives-Peris *et al.*, 2020). Les exsudats racinaires sont souvent divisés en deux classes de composés chimiques. D'une part, il y a les composés de poids moléculaire élevé, tels que les mucilages (i.e. polysaccharides) et les protéines. Ils sont peu diversifiés et constituent souvent une plus grande proportion des exsudats racinaires (i.e. en termes de masse). D'autre part, il y a les composés de faible poids moléculaire tels que les acides aminés, les acides organiques, les sucres et les métabolites secondaires qui représentent une grande partie de la diversité des exsudats racinaires (Badri et Vivanco, 2009; Pinton *et al.*, 2007, Uren 2000). Les métabolites secondaires (i.e. composés phénoliques, terpénoïdes et alcaloïdes) sont produits par des voies métaboliques autres que les voies primaires impliquées dans la production des sucres, des protéines, de la lignine, des lipides et d'énergie (Hartmann, 2007). Ils sont responsables d'une grande partie de la diversité chimique des exsudats racinaires (Perry *et al.*, 2007). Plus de 100 000 métabolites secondaires ont été identifiés chez les plantes (Dixon, 2001). Dans les exsudats racinaires, ont été identifiés des acides organiques, des flavonoïdes, des tannins, des terpènes, des alcaloïdes, des polyacétylènes et d'autres phénols (Bais *et al.*, 2001; Flores, 1999).

L'ensemble de ces composés, présents en mélange dans les exsudats racinaires sont reconnus comme des médiateurs chimiques des interactions (directes ou indirectes) entre racines, entre racines et microorganismes (i.e. bactéries et champignons symbiotiques) ou encore entre les racines et la faune du sol (i.e. mésofaune et macrofaune du sol) (Bais *et al.*, 2006, 2004; Haichar *et al.*, 2014; Mommer *et al.*, 2016). Dans ces travaux, nous nous focaliserons sur les interactions négatives ou positives entre racines pouvant favoriser ou limiter les contacts racinaires et donc

la formation de greffes. L'allélopathie est un mécanisme d'inhibition ou de stimulation de la croissance et de la survie d'une espèce végétale par le biais de composés chimiques (i.e. allélochimiques) libérés dans l'environnement par une autre espèce végétale (Rice, 2012; Weir *et al.*, 2004). Dans les cas où les interactions sont négatives, les plantes produisent et libèrent des métabolites secondaires phytotoxiques pouvant réduire l'établissement, la croissance ou la survie des racines voisines (Inderjit *et al.*, 1994). Ces allélochimiques peuvent être libérés par exsudation mais aussi par décomposition des racines et par lixiviation des tissus racinaires (Macias *et al.*, 2003). En plus de réguler des interactions racinaires interspécifiques, les allélochimiques peuvent réguler des interactions intraspécifiques. Dans ce cas, l'autotoxicité et l'auto-inhibition peuvent entraîner une inhibition de la croissance des racines chez des individus de la même espèce et notamment la descendance (Falik *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2008). Différentes essences forestières ont été identifiées comme produisant des phytotoxines inhibant la croissance des racines des arbres avoisinants. Par exemple, l'épicéa (*Picea abies* (L.) H.Karst.) libère par ses racines de nombreux acides phénoliques et tannins aux propriétés phytotoxiques (Gallet et Pellissier, 1997). De même, pour le pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.), l'autotoxicité est induite par des composés phénoliques mais aussi des terpénoïdes pouvant être libérés par les tissus des racines en décomposition et par les lixiviats des tissus racinaires (Chomel *et al.*, 2014; Fernandez *et al.*, 2008).

Des interactions positives entre racines favorisant leur croissance et donc potentiellement leurs contacts et la formation de greffes racinaires peuvent également être médiées par les exsudats racinaires. De manière générale, ces interactions positives entre les racines impliquent des métabolites secondaires favorisant la formation d'associations symbiotiques avec des micro-organismes tels que des rhizobactéries ou des mycorhizes favorisant la croissance des racines (Mommer *et al.*, 2016). Il a également été suggéré que des interactions positives médiées par les exsudats racinaires peuvent se mettre en place directement *via* la libération des composés facilitateurs de croissance et/ou des composés imitant

l'action de régulateurs de croissance (Bais *et al.*, 2006). Cependant, les mécanismes et les composés chimiques impliqués sont encore mal connus (Bais *et al.*, 2006 ; Vives-Peris *et al.*, 2020).

1.3 Rôle écologique des greffes racinaires

Le rôle écologique des greffes racinaires reste très peu étudié. Même si leur formation pourrait simplement être issue de la rencontre au hasard des racines (Loehle et Jones, 1990), plusieurs études suggèrent qu'il pourrait s'agir d'une stratégie d'adaptation des arbres, bénéfique pour leur croissance et leur survie dans des conditions difficiles (Basnet *et al.*, 1993; Salomón *et al.*, 2016; Tarroux et DesRochers, 2011; Vovides *et al.*, 2021). Il est donc suggéré que les greffes racinaires apportent des bénéfices physiologiques et écologiques pour les communautés d'arbres.

Le premier rôle écologique attribué aux greffes racinaires était tout d'abord mécanique. Il a été prouvé que les greffes racinaires améliorent l'ancrage et la stabilité des arbres dans les environnements venteux et les sols instables, limitant ainsi le risque de chute d'arbres et la formation de chablis (Basnet *et al.*, 1993; Keeley, 1988; Rigg et Harrar, 1931). D'ailleurs, pour les mêmes espèces (e.g. *Nyssa sylvatica* Marsh., *Pinus concorta* Douglas ex J.W. Loudon, *Tsuga heterophylla* (Raf.) Sarg.), le nombre de greffes racinaires était plus important lorsqu'elles se développaient en tourbière ou marais plutôt qu'en plaine (Keeley, 1988; Rigg et Harrar, 1931). De même, des peuplements éclaircis de pin rouge présentaient plus de greffes que des peuplements non éclaircis (Dosen et Iyer, 1979). L'ensemble de ces observations suggère que les greffes racinaires seraient une réponse adaptative au stress mécanique induit par les sols instables et/ou par le vent.

Les autres rôles associés aux greffes racinaires sont liés à leurs fonctions dans l'acquisition et l'assimilation des ressources. Grâce à la mise en place d'un système racinaire commun, les arbres interconnectés peuvent prospecter une plus grande surface de sol pour acquérir les ressources et peuvent aussi se les transférer. Les

arbres greffés sont capables de se transférer des composés antibiotiques, de l'auxine, des sucres, des herbicides, des minéraux, des microorganismes pathogènes et de l'eau (Bader et Leuzinger, 2019; Bormann et Graham, 1966; Epstein, 1978; Fraser *et al.*, 2006; O'Neal et Davis, 2015; Stone et Stone, 1975). La quantité de ressources transférée entre les arbres greffés est proportionnelle à la taille de la greffe (Fraser *et al.*, 2006). Il a notamment été démontré que plus le diamètre de la greffe était grand plus la quantité de sucres transférées entre deux arbres était importante (Fraser *et al.*, 2006). Les ressources peuvent être aussi bien partagées entre des arbres sur pieds (dominants, co-dominants ou dominés) qu'entre un arbre vivant et une souche (Lanner, 1961; Tarroux et DesRochers, 2010). Dans le cas d'un arbre vivant greffé à une souche, des sucres et des phytohormones peuvent être transférés en quantité suffisante pour maintenir en vie les tissus de la souche et assurer sa croissance pendant plusieurs années (Bormann, 1961; Fraser *et al.*, 2006; Lanner, 1961).

Ainsi, ces 20 dernières années, les greffes racinaires ont suscité l'intérêt en tant que « mécanisme de partage des ressources » entre arbres (McIntire et Fajardo, 2014, 2011; Valladares *et al.*, 2015). La mise en place d'un système racinaire commun améliore l'accès, la redistribution et l'utilisation des ressources du sol parmi les arbres greffés, ce qui entraînerait une meilleure croissance et une meilleure survie des arbres au sein du peuplement (Tarroux et DesRochers, 2011). Cela implique que les arbres greffés ne sont pas seulement en compétition pour les ressources mais peuvent aussi faciliter directement la croissance de leurs voisins (Eis, 1972; Keeley, 1988; Loehle et Jones, 1990; McIntire et Fajardo, 2011). Il a donc été proposé de repenser les écosystèmes forestiers non plus comme un regroupement d'entités individuelles mais plutôt une communauté ou encore un « super organisme » (McIntire et Fajardo, 2014, 2011; Valladares *et al.*, 2015).

Toutefois, il est encore difficile d'évaluer le rôle des greffes racinaires sur la croissance des arbres. Tarroux et DesRochers (2011) ont démontré que la croissance radiale du pin gris était augmentée par la formation de greffes racinaires intraspécifiques. De plus, il a été montré que la croissance radiale des arbres greffés,

en cas d'épidémies d'insectes ou de conditions climatiques défavorables (i.e. sécheresse), était améliorée par rapport à la croissance d'arbres non greffés, ce qui suggère que les greffes racinaires pourraient constituer un avantage écologique pour les arbres soumis à des stress environnementaux (Adonsou *et al.*, 2016c; Salomón *et al.*, 2016; Vovides *et al.*, 2021). Cependant, les greffes racinaires sont également considérées comme un vecteur de maladies car des microorganismes pathogènes (e.g. bactéries et champignons) sont transférés entre les arbres greffés par la circulation de la sève et/ou les contacts racinaires (Baric *et al.*, 2008; Epstein, 1978). De plus, la formation des greffes racinaires est un processus coûteux en énergie pouvant réduire la croissance des arbres pendant plusieurs années après leur formation (Tarroux et DesRochers 2011). Enfin, Tarroux *et al.* 2010 ont mis en évidence que lorsqu'un arbre greffé hérite du système racinaire d'un arbre coupé, cela peut créer un déséquilibre du ratio biomasse racinaire/biomasse foliaire (i.e. biomasse photosynthétiquement active) pouvant négativement impacter la croissance dans les peuplements éclaircis commercialement (Tarroux *et al.* 2010). Ainsi, soutenir le système racinaire d'une souche ou d'un arbre supprimé pourrait négativement impacter la croissance des arbres sur pieds greffés.

Plusieurs autres avantages associés au fait d'être greffé à un arbre voisin ou à une souche voisine ont été évoqués tels que i) éviter l'établissement d'arbre d'une autre espèce et ainsi limiter la compétition interspécifique, ii) maintenir une banque de gènes, iii) permettre le transfert de métabolites secondaires de défense, iv) sélectionner et soutenir la croissance d'un arbre voisin en bonne santé permettant ainsi de limiter la propagation de maladies mais aussi d'assurer une descendance viable (Lev-Yadun, 2011). Cependant l'ensemble de ces avantages reste à l'état d'hypothèses et n'ont pas encore été testés scientifiquement.

1.4 Les greffes racinaires en forêt boréale au Québec

1.4.1 Etat des connaissances

Ces 20 dernières années, c'est en forêt boréale Québécoise qu'a été réalisée la majorité des études sur les greffes racinaires. Ce phénomène a été observé pour la plupart des espèces dominantes incluant des conifères (*Pinus banksiana* Lamb., *Pinus resinosa* Aiton, *Picea mariana* Mill.) mais aussi des angiospermes (*Populus tremuloides* Michx. et *Populus balsamifera* L.). Ces études avaient pour but de déterminer les facteurs favorisant la formation des greffes racinaires et leur fréquence chez ces espèces importantes sur le plan économique et géographique. La forêt boréale apporte de nombreux bénéfices économiques, culturels et environnementaux au Québec (Gauthier *et al.*, 2015). Elle constitue une ressource naturelle majeure, occupant environ le tiers de la superficie des unités d'aménagement forestier destinées à la production forestière (MRNF, 2009). L'industrie forestière québécoise, particulièrement les usines de sciage et de pâtes et papier, repose sur ce territoire pour s'approvisionner en matière première (Pothier, 2003). En 2010, la commission Coulombe a imposé un aménagement forestier durable des forêts publiques Québécoises, comprenant des zones d'aménagement écosystémique des forêts naturelles, des zones de protection et des zones d'aménagement intensif. Ce contexte a suscité un intérêt particulier pour des modes de gestion irrégulière favorisant un couvert continu et proches de la dynamique naturelle des écosystèmes forestiers. Ainsi, les éclaircies commerciales visant à régulariser la taille et la croissance d'une forêt en réduisant la compétition pour maintenir sa productivité tout au long de son cycle de vie ont été couramment employées. Dans ce contexte, les greffes racinaires ont été étudiées car elles pourraient expliquer les résultats mitigés de certains traitements d'éclaircie (Makinen, 2004; Skovsgaard, 2009; Vincent *et al.*, 2009). Tarroux *et al.* (2010) ont démontré que les arbres résiduels greffés ne bénéficient pas de la réduction de la compétition pour les ressources résultant de l'éclaircie car le maintien des souches des arbres coupés est couteux en énergie.

En dehors de l'aménagement forestier, les greffes racinaires ont été étudiées en forêt boréale pour leur intérêt écologique. La dynamique forestière au Québec est naturellement conduite par les incendies (Bergeron *et al.*, 2004), les épidémies d'insectes (e.g. la tordeuse d'épinette (*Choristoneura fumiferana* Clem.) (Lavoie *et al.*, 2019; Morin, 1994) et de manière plus générale, par le climat (Brandt *et al.*, 2013). Il a été démontré que les greffes racinaires limitaient les effets négatifs de la défoliation sur la croissance de l'épinette noire pendant et immédiatement après l'apparition de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (Salomón *et al.*, 2016). Ainsi, les arbres greffés seraient plus résilients aux épidémies d'insectes. Enfin au Québec, les sols sont pauvres en nutriments sous forme minérale (Brandt *et al.*, 2013). Ceci est lié au fait que les sols boréaux se développent sous de faibles températures, limitant l'activité des microorganismes du sol dont dépend la minéralisation (Pregitzer et King, 2005). De plus, la température hivernale des sols en forêt boréale tourne autour du point de congélation, ce qui réduit la disponibilité en eau ainsi qu'en nutriments pour les arbres et simultanément affecte la capacité d'absorption de leurs racines et leur croissance (Bergh et Linder, 1999; Havranek et Tranquillini, 1995; Pregitzer *et al.*, 2008; Yuan et Chen, 2010). Dans cet environnement où les ressources peuvent être inégalement réparties et limitées, les greffes racinaires peuvent représenter un avantage écologique majeur en permettant une meilleure assimilation et la redistribution des ressources entre les arbres greffés. En ce sens, il a été démontré un effet bénéfique des greffes racinaires sur la croissance du pin gris (Tarroux et DesRochers, 2011).

1.4.2 Cas du sapin baumier (*Abies balsamea* (L.) Mill.)

Le sapin baumier (*Abies balsamea* (L.) Mill.) est l'une des essences principales de la forêt boréale au Québec mais aussi, une des plus récoltées (MRNF, 2009). Il a été observé que des champignons responsables du pourrissement des souches se répandaient rapidement dans les peuplements de cette espèce (Redmond, 1957). Ainsi, il a été suggéré que des greffes pouvaient se former au niveau du système racinaire de cette espèce et favoriser leur prolifération (Basham *et al.*, 1953).

Cependant, la formation de greffes racinaires n'a pas été démontrée pour le sapin baumier et leur fréquence n'a encore jamais été évaluée. Pourtant, plusieurs caractéristiques du système racinaire du sapin baumier seraient propices à leur formation. Tout d'abord, le sapin baumier est reconnu pour développer des racines superficielles (Burns et Honkala, 1990) qui sont favorables à l'établissement de greffes (Graham et Bormann 1966). De plus, le sapin baumier possède une bonne capacité d'adaptation aux nouvelles conditions de croissance suivant une perturbation (hormis les feux) et répond rapidement en allouant plus de biomasse à son système racinaire (Ruel, 2003; Sullivan et Peterson, 1994), démontrant une certaine plasticité de celui-ci (Coutts *et al.*, 1999). Enfin, le sapin baumier possède une forte capacité de régénération après perturbation provenant de banques de semis abondantes en sous-bois capables de se développer rapidement après ouverture de la canopée (Martin *et al.*, 2019; Morin et Laprise, 1997; Prévost et Dumais, 2018). Cette régénération conduit à la formation de peuplements très denses (Ruel *et al.*, 2003). Or, il a été prouvé qu'une forte proximité entre les arbres pouvait favoriser les contacts entre racines et l'établissement de greffes (Tarroux et DesRochers, 2010). Le sapin baumier est reconnu pour être une espèce tolérante à l'ombre se développant pendant de longues périodes sous son propre couvert, en ralentissant sa croissance (Burns et Honkala, 1990; Martin *et al.*, 2019; Ruel *et al.*, 2003). Dans ces conditions de forte compétition intraspécifique pour les ressources du sol et la lumière, la formation des greffes racinaires pourrait atténuer les effets de la compétition en favorisant la croissance des arbres par le partage et la translocation des ressources (Lev-Yadun, 2011; Loehle et Jones 1990).

1.5 Objectifs et structure de la thèse

Le sapin baumier étant l'une des essences principales de la forêt boréale au Québec, il devient nécessaire de mettre en évidence la présence de greffes chez cette espèce et de mieux appréhender comment et pourquoi elles se forment. Non seulement pour mieux comprendre leur importance écologique sur les interactions entre arbres

et la dynamique des peuplements mais aussi parce que leurs effets pourraient être pris en compte dans la gestion forestière.

L'état des connaissances dressé dans le chapitre précédent nous a permis de mettre en évidence que :

- Les greffes racinaires ont été observées pour une grande diversité d'espèces en forêt boréale Québécoise mais n'ont encore jamais été mises en évidence pour le sapin baumier dont l'écologie semble pourtant favorable à leur formation.
- La littérature récente soutient le caractère bénéfique des greffes racinaires sur la physiologie et l'écologie des arbres, cependant leur influence sur la compétition intraspécifique n'a jamais été testée.
- Les processus impliqués dans la formation des greffes racinaires restent peu connus mais l'hypothèse d'un déterminisme chimique de la formation des greffes a été émise.

Afin de mieux comprendre les processus impliqués dans la formation des greffes racinaires et leur rôle écologique sur les interactions entre arbres pendant l'évolution des peuplements de sapin baumier, cette thèse s'organisera autour de trois questionnements principaux (Table 1.1) :

- Est-ce que des greffes racinaires se forment chez le sapin baumier, et si oui, à quelle fréquence et selon quels déterminants écologiques ?
- Quel est le rôle des greffes racinaires dans la compétition intraspécifique ?
- Existe-t-il un déterminisme chimique de la formation des greffes racinaires ?

Le Chapitre III de cette thèse consiste donc, dans un premier temps, à déterminer la présence et la fréquence de formation des greffes chez le sapin baumier. Dans un second temps nous avons étudié les facteurs écologiques favorisant la formation des greffes racinaires pour cette espèce. Nous souhaitons dresser « une carte d'identité » des potentiels sapins greffés en répondant aux questions suivantes : A quel stade de développement se forment les greffes ? Quels arbres/racines se greffent entre eux/elles ? Les objectifs de ce chapitre étaient (i) d'estimer la fréquence des greffes racinaires chez le sapin baumier dans la forêt boréale au Québec, (ii) de décrire les distributions d'âge et de taille des racines et des arbres au

moment de l'initiation de la greffe, (iii) d'étudier l'effet de la proximité des arbres, de la taille des tiges, du nombre et de la taille des racines sur le nombre de greffes par arbre. Nous avons émis les hypothèses que la formation de greffes racinaires est commune chez le sapin baumier et que sa fréquence dépendait de l'âge et de la taille des arbres et de leurs racines ainsi que de la distance entre les arbres.

Pour tester ces hypothèses, nous avons caractérisé trois peuplements naturels de sapins baumiers en réalisant différentes mesures *in situ*, puis excavés hydrauliquement leurs systèmes racinaires avant de les soumettre à différentes analyses dendrochronologiques.

L'ensemble du Chapitre III fait l'objet de l'article : « Ecological drivers of root grafting in balsam fir natural stands » publié dans *Forest Ecology and Management* en juillet 2020 (<https://doi.org/10.1016/j.foreco.2020.118388>).

Les greffes racinaires pourraient avoir un impact à long terme sur la stabilité des peuplements de sapin baumier en modifiant les relations entre arbres. Le Chapitre IV était donc consacré à déterminer si les arbres greffés sont de meilleurs compétiteurs que les arbres non-greffés. Cela pourrait expliquer comment le sapin baumier réussit à s'établir et à se maintenir pendant plusieurs années en sous-bois denses où la compétition intraspécifique est forte (Burns et Honkala, 1990 ; Morin et Laprise, 1997). Nos principaux objectifs étaient de : (i) déterminer l'effet des greffes racinaires sur la croissance des sapins baumiers, (ii) déterminer l'effet de la compétition intraspécifique sur la croissance des sapins baumiers greffés ; (iii) déterminer si les greffes racinaires atténuent les effets négatifs de la compétition intraspécifique sur la croissance des sapins baumiers.

Nos hypothèses étaient les suivantes :

- Les greffes racinaires améliorent la croissance des sapins baumiers greffés.
- La compétition intraspécifique réduit la croissance des sapins baumiers greffés.
- Les greffes racinaires atténuent les effets négatifs de la compétition intraspécifique sur la croissance des sapins baumiers.

Afin de tester ces hypothèses, nous avons réalisé une modélisation individuelle de l'accroissement radial des sapins baumiers en fonction de différents indices de compétition intraspécifique et le statut de greffage des arbres. Ces modèles ont été construits à partir de séries de largeurs de cernes mesurés sur les arbres étudiés dans le Chapitre II.

L'ensemble du Chapitre IV fait l'objet de l'article : « Does root grafting makes trees better competitors ? » soumis à la revue *Oikos* en Juillet 2021.

En plus de mieux comprendre l'importance écologique des greffes racinaires chez le sapin baumier, il devient également important d'expliquer les processus liés à leur formation. Dans le Chapitre V, nous avons étudié la chimie des racines fines de sapins baumiers et de leurs exsudats afin de déterminer si elle influence la formation des greffes racinaires. Nos principaux objectifs étaient : i) de déterminer si la diversité chimique des racines et des exsudats d'arbres greffés différait de celle des arbres non greffés, ii) d'annoter les molécules impliquées dans cette différence et déterminer si elles possèdent de potentielles propriétés allélopathiques pouvant inhiber ou stimuler la formation de greffes.

Nos hypothèses étaient les suivantes :

- La diversité chimique des racines et des exsudats de sapins baumiers diffère entre les arbres greffés et non greffés.
- Les racines et exsudats de sapins baumiers contiennent des composés allélopathiques pouvant inhiber ou stimuler la formation des greffes racinaires.

Afin de répondre à ces hypothèses, nous avons caractérisé la diversité chimique des racines et des exsudats de sapin baumier grâce à des analyses métabolomiques. La métabolomique permet l'analyse complète et non ciblée de la majorité des métabolites présents dans les tissus et les exsudats racinaires. Ces analyses ont été réalisées sur des échantillons de racines fines excavées et collectées manuellement dans trois peuplements naturels de sapin baumier. Elles ont été réalisées sur des exsudats collectés à partir d'une méthode de collecte *in situ* développée au cours de cette thèse.

L'ensemble du Chapitre V fait l'objet d'un article en préparation pour *Journal of Chemical ecology*.

Table 1.1 : Tableau récapitulatif des principaux objectifs et hypothèses de la thèse

Objectifs	Hypothèses
Général : Quel sont la fréquence, le rôle écologique et les facteurs de formation des greffes racinaires dans les peuplements de sapins baumiers ?	
Chapitre III. Quels sont la fréquence et les facteurs favorisant la formation des greffes racinaires chez le sapin baumier ?	
Déterminer si des greffes racinaires se forment chez le sapin baumier ainsi que leur fréquence de formation.	La formation de greffes racinaires est un phénomène répandu dans les peuplements de sapins baumiers.
Identifier les facteurs favorisant la formation des greffes racinaires chez le sapin baumier.	La fréquence des greffes serait plus répandue chez certaines classes d'arbres et de racines (e.g. stade de développement, âge, taille) et dépend de la distance entre ces arbres.
Chapitre IV. Quel est le rôle des greffes dans la compétition intraspécifique ?	
Evaluer le rôle des greffes racinaires dans la compétition intraspécifique.	Les arbres greffés sont de meilleurs compétiteurs que les arbres non greffés.
Chapitre V. Existe-t-il un déterminisme chimique de la formation des greffes racinaires ?	
Déterminer si les signatures chimiques des racines et de leurs exsudats influencent la formation des greffes racinaires.	La diversité chimique des racines et de leurs exsudats diffère entre les arbres greffés et non greffés. Les racines et les exsudats de sapins baumiers contiennent des métabolites secondaires pouvant favoriser ou inhiber la formation de greffes.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Contexte écologique

2.1.1 La forêt boréale au Québec

La forêt boréale s'étend de manière discontinue sur de vastes zones de la région circumpolaire nord caractérisée par des hivers longs, froids et enneigés ainsi que des étés courts (Chapin et Dannell, 2001). Elle est dominée par des conifères résistants au froid tels que *Picea mariana* Mill., *Picea glauca* (Moench) Voss, *Larix laricina* (Du Roi) K.Koch, *Abies balsamea* (L.) Mill. et *Pinus banksiana* Lamb. De vastes zones sont également couvertes de feuillus héliophiles tels que *Populus tremuloides* Michx., *Populus balsamifera* L. et *Betula papyrifera* Marsh., soit en peuplements purs, soit, plus fréquemment, mélangés à des conifères (Brandt *et al.*, 2013). En forêt boréale, le sol est à tendance acide, humide et pauvre en nutriments sous forme minérale.

La forêt boréale (ou zone boréale) du Québec est subdivisée en 4 domaines bioclimatiques (Figure 2.1) (Cauboue, 2007; Robitaille et Saucier, 1996; Saucier *et al.*, 2010). Du 55°N parallèle jusqu'à la zone arctique, s'étend la sous-zone de la toundra forestière (correspondant au domaine du même nom). La température moyenne annuelle est de -7.5°C à -5°C. Le paysage est une mosaïque constituée de landes arbustives dominantes et de forêts dans les sites abrités. Cette formation résulte des feux et du climat nordique, attesté par la présence de pergélisol discontinu. On y trouve surtout des peuplements d'épinettes noires qui ne mesurent pas plus de trois mètres de hauteur. Du 52° au 55°N parallèle est implantée la

pessière à lichens qui est le seul domaine appartenant à la sous zone de la taïga. La densité du couvert forestier est faible. Il est dominé par l'épinette noire du fait des faibles précipitations et du climat froid (température moyenne annuelle de -5°C à -2.5°C) et ponctué de tapis de lichens. Le sapin baumier et le pin gris y atteignent leur limite nordique. Le domaine de la pessière à mousses succède à celui de la pessière à lichens vers le sud (du 49°N jusqu'au 52°N parallèle). Il appartient à la sous-zone de la forêt boréale continue. La température moyenne annuelle est de -2.5°C à 0°C . Ce domaine est également dominé par l'épinette noire accompagnée du pin gris et du sapin baumier. Le sous-bois est constitué d'une couche épaisse de mousse et d'arbustes de la famille des *Ericaceae*. Plus au Sud s'étend la sapinière à bouleaux blancs également sous forme de forêt continue (du Sud du Québec jusqu'au 49°N parallèle). La température moyenne annuelle varie de 0°C à 1°C . Elle est dominée par un mélange de sapins baumiers, d'épinettes blanches et de bouleaux blancs sur les sites mésiques. Sur les sites moins favorables (e.g. sols moins bien drainés), on observe l'épinette noire, le pin gris et le mélèze souvent accompagnés de bouleau blanc ou du peuplier faux-tremble. Le bouleau jaune et l'érable rouge ne subsistent qu'à la marge sud du domaine bioclimatique. Le sous-bois de la sapinière à bouleaux est très diversifié, comprenant des bryophytes, mais surtout des arbustes appartenant aux familles des *Betulaceae* et *Ericaceae*.

L'ensemble de ces travaux de thèse a été réalisé dans le domaine de la sapinière à bouleaux blancs, plus particulièrement dans la région de l'Abitibi-Témiscamingue (Figure 2.1).

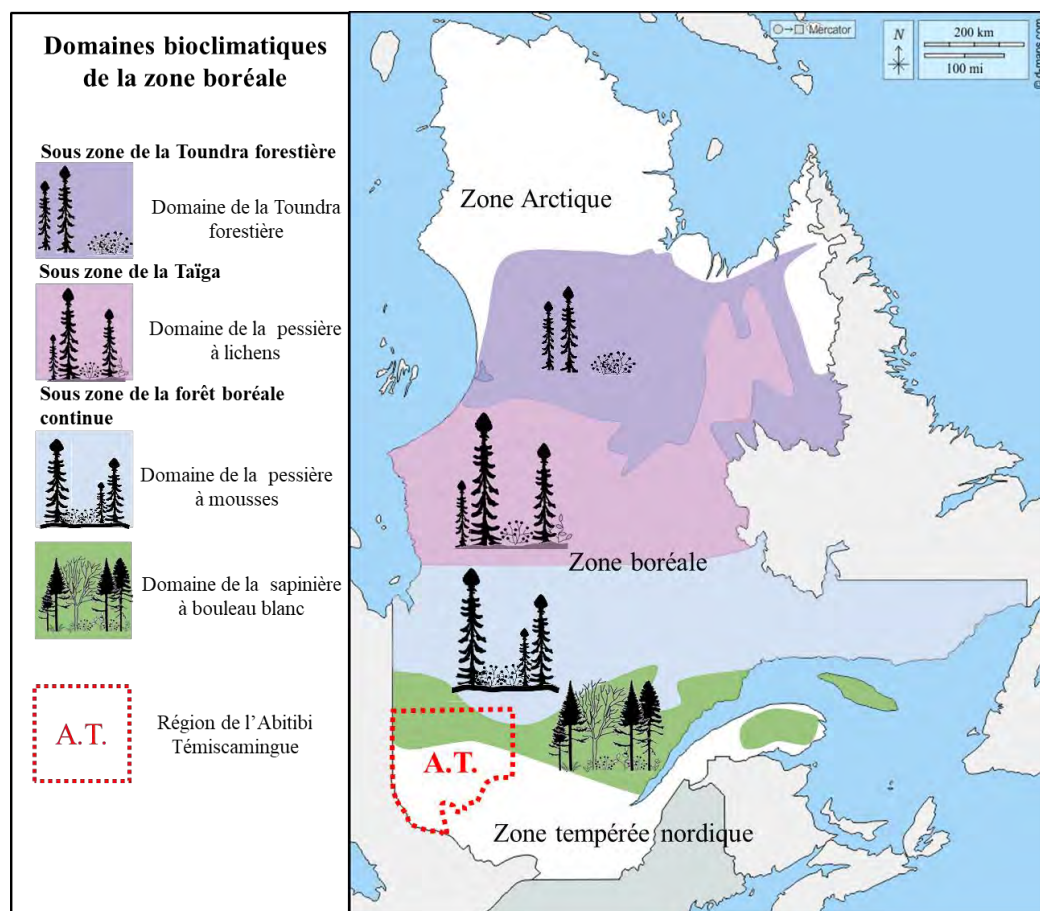


Figure 2.1 : Carte simplifiée des zones, sous-zones et domaines bioclimatiques de la forêt boréale au Québec (réalisée d'après Cauboue, 2007; Robitaille et Saucier, 1996; Saucier *et al.*, 2010)

2.1.2 La région de l'Abitibi Témiscamingue

L'Abitibi-Témiscamingue est une région située à l'extrémité ouest du Québec entre les basses terres de la baie James et le bassin de l'Outaouais. Cette région est composée d'une vaste plaine d'argile située à environ 300 m d'altitude et s'inclinant vers la baie James. La région est également parsemée de petites collines rocheuses et traversée par la ligne des partages des eaux séparant les bassins de la baie James et du Saint Laurent (Bergeron *et al.*, 2007).

Le climat régional est caractérisé par des températures froides en hiver et un été relativement court et humide. Les précipitations annuelles pour la région sont en

moyenne 929 mm (253 mm de neige et 675 mm de pluie) avec une température journalière moyenne de 1.5°C et 2366 degrés jours au-dessus 0 °C (Normales climatiques 1981-2010, Environnement Canada 2018).

Au quaternaire, la région fut recouverte par des glaciers. Ils ont déposé des tills, des sédiments fluvioglaciaires et des formations lacustres mises en place dans les lacs proglaciaires Barlow et Ojibway (Vincent et Hardy, 1977). L'épisode lacustre a mis en place des argiles, des limons, des sables et, aux flancs de collines, des graviers. Plus récemment, des formations alluvionnaires et organiques se sont accumulées. Les sols de l'Abitibi sont majoritairement des podzols humo-ferriques. Ils se développent dans des matériaux acides à texture plutôt grossière, sous un climat où les précipitations sont abondantes. On retrouve également des luvisols gris issus du lessivage des argiles et sporadiquement des gleysols et des sols organiques favorisés par les dépôts de surface peu perméables (Bergeron *et al.*, 2007).

La végétation de la région se compose principalement de pessières et de sapinières. Brièvement, du Nord au Sud se succèdent : la pessière à mousse, la sapinière à bouleau blanc dans la zone boréale puis la sapinière à bouleau jaune et l'érablière à bouleau jaune dans la zone tempérée nordique (Cauboue, 2007; Robitaille et Saucier, 1996; Saucier *et al.*, 2010). Au cours des derniers siècles, la forêt a été façonnée par de nombreux feux et a fait l'objet de coupes de bois importantes, ce qui a contribué à l'établissement de forêts de successions secondaires dominées principalement par le pin gris sur les sites xériques, le tremble et le bouleau à papier sur les sites mésiques et le peuplier baumier sur les sites hydriques (Bergeron *et al.*, 2004; Bonan et Shugart, 1989; Cyr *et al.*, 2009; Lavoie *et al.*, 2019; Martin *et al.*, 2019)

2.2 Espèce étudiée : le sapin baumier (*Abies balsamea* (L.) Mill.)

L'aire de distribution du sapin baumier s'étend majoritairement entre le 45°N et 50°N parallèle et couvre le territoire de Terre-Neuve jusqu'aux Rocheuses (Cauboue, 2007). Sa distribution géographique est limitée à l'ouest et s'élargit à

l'est notamment au Québec où le sapin baumier domine dans la partie sud de la forêt boréale (Figure 2.2).



Figure 2.2 : Distribution géographique du sapin baumier (*Abies balsamea* (L.) Mill.) (Cauboue, 2007)

Cette espèce apprécie les climats frais et humides. Le sapin baumier est un arbre de taille moyenne (entre 12 et 18 m de haut) pouvant vivre jusqu'à 200 ans (Andersson et Goodall, 2005). Cependant, il est très sensible aux épidémies d'insectes et à la pourriture des souches (Basham *et al.*, 1953; MacLean, 1984). Ainsi, l'âge des arbres n'excède généralement pas les 50 à 70 ans (Rossi et Morin, 2011). Cet arbre a une grande amplitude écologique, particulièrement dans la sapinière à bouleau blanc où le sapin colonise une grande variété de sites allant des sites bien drainés à des sites humides. Le sapin baumier ayant la capacité de coloniser des sites variés, on peut l'observer dans des peuplements presque purs et d'autres très diversifiés, aussi bien en espèces feuillues que résineuses. On le rencontre en combinaison avec

le bouleau blanc, mais aussi l'épinette noire, l'épinette blanche et le peuplier faux-tremble (Andersson and Goodall, 2005). La strate arborescente est dense, le plus souvent supérieure à 70 % du recouvrement. Le sapin baumier est généralement largement dominant. Le sapin peut être accompagné de diverses espèces arbustives comme l'érable à épis (*Acer spicatum* Lam.), le gadelier glanduleux (*Ribes glandulosum* Grauer.) et le framboisier (*Rubus idaeus* L.). La strate herbacée est plutôt diversifiée et occupée par l'oxalide de montagne (*Oxalis montana* Raf.), la clintonie boréale (*Clintonia borealis* Ait. (Raf.)), le dryoptéris des Chartreux (*Dryopteris spinulosa* (Vill.) H.P.Fuchs.), le quatre-temps (*Cornus canadensis* L.), le maïanthème du Canada (*Maianthemum canadense* Desf.), la trientale boréale (*Trientalis borealis* L.) et la linnée boréale (*Linnaea borealis* L.). Les mousses sont représentées par la pleurozie dorée (*Pleurozium schreberi* (Willd. ex Brid.) Mitt.), l'hylocomie brillante (*Hylocomium splendens* (Hedw.) Schimp.) et l'hypne plumeuse (*Ptilium crista-castrensis* (Hedw.) De Not.).

2.3 Sites étudiés

Dans le cadre de cette thèse, six peuplements de sapins baumiers localisés en Abitibi Témiscamingue, dans le domaine bioclimatique de sapinière à bouleau blanc ont été étudiés. Nous avons sélectionné des peuplements monospécifiques, sains et naturellement régénérés après feu (Figure 2.3). L'âge des peuplements sélectionnés était supérieur à 20 ans car même si les greffes peuvent apparaître tôt ou tard dans la vie de l'arbre, la majorité des greffes racinaires observées dans la littérature récente se formaient dans des peuplements âgés d'au moins 20 ans (Fraser *et al.*, 2005; Tarroux et DesRochers, 2010).

Pour la réalisation des Chapitres III et IV, trois peuplements ont été sélectionnés (Figure 2.3). Le premier site (III.1) était situé à la forêt d'enseignement et de recherche du lac Duparquet (48°52'21.6"N, 79°46'53.0"W), le deuxième site (III.2) était situé à la forêt d'enseignement de Kinojévis (48°18'26.1"N, 78°84'63.7"W) et le troisième site (III.3) au centre de formation de la forêt d'enseignement d'Harricana (48°76'27.8"N, 77°77'93.3"W). Ces peuplements ont été choisis en

fonction de leur proximité d'une source d'eau et d'une pente douce afin de pouvoir réaliser l'excavation hydraulique des systèmes racinaires. Les zones d'excavation ont été délimitées sur une superficie d'environ 50 m² pour comprendre un minimum de 15 arbres vivants par zone, ce qui correspondait à des peuplements ayant une densité minimale de 3000 tiges ha⁻¹.

Pour la réalisation du Chapitre V, trois autres peuplements ont également été sélectionnés à proximité de la forêt d'enseignement et de recherche du lac Duparquet : V.1 (48°31'19.56"N, 79°27'54.00"O), V.2 (48°31'8.40"N, 79°25'1.20"O) et V.3 (48°26'7.80"N, 79°25'33.60"O). Les zones de collecte des racines et des exsudats couvraient une surface moyenne de 0.55 ha pour chaque site.

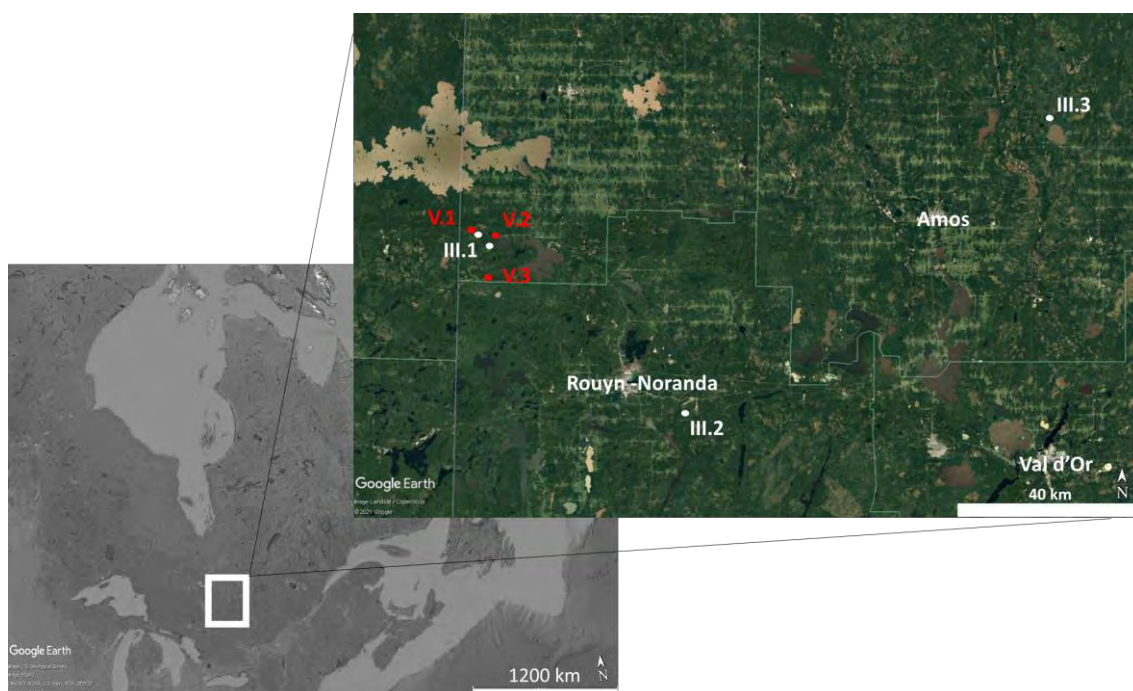


Figure 2.3 : Localisation des six sites étudiés en Abitibi Témiscamingue, Québec. Les peuplements étudiés dans les Chapitres III et IV sont en blanc et ceux étudiés dans le Chapitre V sont en rouge.

2.4 Caractérisation des peuplements de sapins baumiers et estimation de la fréquence des greffes racinaires

2.4.1 Mesure *in situ*

Ces travaux de terrain ont été réalisés en Juillet 2017. Pour les sites III.1, III.2 et III.3, dans les trois zones d'excavation de 50 m², le diamètre de chacun des arbres à hauteur de poitrine (DHP, i.e. 1,30 m) a été mesuré ainsi que la distance entre chacun des arbres. Les arbres ont ensuite été abattus à l'aide d'une scie mécanique puis des galettes (i.e. disques transversaux) de chacun des troncs ont été collectées au niveau du sol (0 m) pour estimer leur âge. Au total, 125 arbres ont été mesurés.

2.4.2 Excavation hydraulique des systèmes racinaires

Divers colorants, isotopes radioactifs et herbicides peuvent être utilisés comme traceurs pour mettre en évidence la présence de greffes racinaires au sein des peuplements forestiers (Baric *et al.*, 2008; Bormann, 1966; Bormann et Graham, 1960; Kuntz et Riker, 1956). Cependant, ces méthodes ont tendance à sous-estimer la présence de greffes (Bormann et Graham, 1959). Nous avons utilisé une méthode d'excavation complète et hydraulique des systèmes racinaires, développée par Tarroux et DesRochers (2010) permettant d'estimer la fréquence réelle des greffes racinaires.

Le système racinaire de chaque arbre a été excavé hydrauliquement à l'aide d'une lance de pompier couplée à une pompe à eau à haute pression (Mark III, Wajax, Lachine, Québec). La pompe a été placée dans un point d'eau et le sol a été décapé grâce à la pression pour découvrir toutes les racines (Figure 2.4). La profondeur d'excavation était comprise entre 30 et 60 cm. L'excavation complète des systèmes racinaires a pris environ trois semaines par site. Chacune des racines (diamètre > 1,5 cm) et des greffes ont été comptées et cartographiées à la main. Des galettes de chacune des racines (diamètre > 1,5 cm) et toutes les greffes observées ont ensuite

été ramenées au laboratoire pour analyses dendrochronologiques. Au total 698 galettes de racines et 58 greffes ont été collectées.

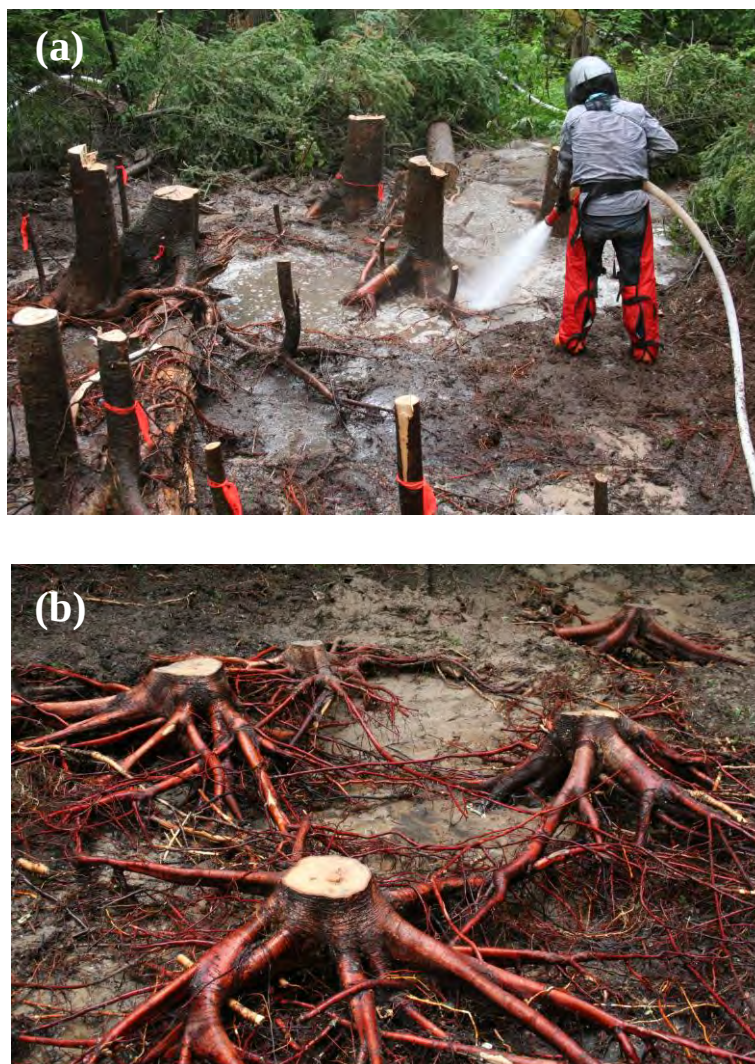


Figure 2.4 : Excavation hydraulique des systèmes racinaires de sapins baumiers (*Abies balsamea* (L.) Mill.). (a) Décapage du sol à l'aide d'une lance à haute pression. (b) Systèmes racinaires une fois excavés et avant collecte.

2.4.3 Détermination de l'âge des arbres, des racines et des greffes racinaires

Les galettes de troncs et de racines ont été séchées à l'air puis poncées (grain 80-400) pour révéler les anneaux de croissance. L'âge des arbres a été estimé en comptant les anneaux de croissance et en interdatant visuellement les chronologies de tous les arbres à l'aide des années caractéristiques comme des anneaux étroits ou larges (Parent *et al.*, 2002, Schweingruber, 1989). L'âge des racines et des greffes racinaires a été déterminé en comptant les anneaux de croissance et en interdatant les galettes de racines avec celles des troncs correspondants (Tarroux et DesRochers, 2010). Pour déterminer si les greffes formaient une union morphologique complète, des coupes transversales sur toute leur longueur ont été réalisées pour confirmer la présence d'un anneau de croissance commun (Graham et Bormann, 1966). L'âge des greffes a été déterminé en comptant le nombre d'anneaux de croissance communs entre les racines greffées. L'âge des arbres au moment de l'initiation de la greffe a été déterminé en calculant la différence entre l'âge de l'arbre et l'âge de la greffe associée.

2.4.4 Mesures du diamètre des racines

Le diamètre de chacune des racines a été mesuré afin de déterminer leur influence sur la formation des greffes. En raison de leur croissance non concentrique, le diamètre de chaque racine a été calculé en moyennant le plus petit et le plus grand diamètre de chacune des racines mesurées à la perpendiculaire (Adonsou *et al.*, 2016b). Le diamètre des racines au moment de l'initiation de la greffe a été mesuré de la même manière mais à partir des sections de greffes, avant le premier anneau de croissance commun entre deux racines.

2.5 Influence des greffes racinaires et de la compétition intraspécifique sur la croissance des sapins baumiers

2.5.1 Mesures de la croissance radiale des arbres

Pour estimer la croissance annuelle des arbres, les séries de largeurs de cernes ont été mesurées sur les galettes de troncs à l'aide d'un système de mesure Velmex "TA Unislide" (équipé d'un codeur linéaire ACU-Rite et d'un dispositif de lecture numérique QC10V, Velmex, Inc., Bloomfield, New York) interfacé avec le logiciel de lecture des cernes : Measure J2X (Version 5.0x) (Projet J2X, Voortech Consulting, Holderness, NH). Les séries de largeur de cernes ont été mesurées avec une précision de 0.001 mm le long de deux rayons par galette de troncs et ont été visuellement interdatées. Les séries chronologiques ont ensuite été moyennées par individu. Au total, 110 séries de largeur de cernes ont été obtenues. Les séries de largeur de cernes ont ensuite été converties en incréments de surface basale (i.e. BAI) (Biondi et Qeadan 2008) pour calculer la croissance annuelle des arbres.

2.5.2 Modèle de croissance

Nous avons construit un modèle évaluant l'influence conjointe de la présence de greffes et de la compétition intraspécifique sur la croissance radiale annuelle individuelle des sapins baumiers. Ce modèle est un modèle « arbre » c'est-à-dire un modèle individu-centré où le peuplement est décrit par des caractéristiques concernant tous les arbres du peuplement (dans notre cas les séries de largeur de cernes). Plus spécifiquement il s'agit d'un Modèle Arbre Dépendant des Distances (MADD) qui utilise la position spatiale de chaque arbre dans le peuplement. Ce type de modèle a déjà montré son efficacité pour modéliser la croissance des arbres dans des peuplements naturels et irréguliers (Pérot *et al.*, 2008). Plus spécifiquement nous avons utilisé et sélectionné un modèle linéaire mixte ayant pour variable à expliquer la croissance radiale des arbres (i.e. BAI) et comme variables explicatives un indice de compétition, le statut de greffage et la taille des

arbres. Les sites et années ont été choisis comme effets aléatoires. Plus de détails sur les paramètres de la modélisation sont donnés dans le Chapitre IV.

2.6 Influence de la chimie des racines et de leurs exsudats sur la formation des greffes racinaires

2.6.1 Collecte des échantillons de racines fines et extraction

Les travaux de terrain nécessaires à la réalisation du Chapitre V ont eu lieu en Juillet 2019. La collecte de racines fines a été effectuée sur 10 paires d'arbres greffés (i.e. 20 arbres) et 10 arbres non greffés dans chacun des trois sites sélectionnés (V.1., V.2., V.3., Figure 2.3). Les arbres greffés ont été sélectionnés en fonction des critères déterminés dans le Chapitre III.

Au total, 90 échantillons de 100 g de racines fines (diamètre < 1 cm) ont été soigneusement excavés, puis rincés à l'eau distillée pour éliminer la terre adhérente et collectés à la main (i.e. 3 sites x (20 arbres greffés + 10 arbres non-greffés)) (Figure 2.5). Chaque échantillon a été congelé à -80°C, lyophilisé (Lyovac GT2) et réduit en poudre (30 s à température ambiante, MM 400, Retsch, Allemagne) pour analyses chimiques. Deux cents milligrammes de poudre de racine de chaque échantillon ont été extrait dans 4 mL de MeOH (100%), suivi d'un bain à ultrasons (3 min à température ambiante). L'extrait obtenu a ensuite été filtré pour les analyses métabolomiques (PTFE, 13 mm, 0,22 µm, Restek®, USA).



Figure 2.5 : Photographie de l'excavation manuelle d'une racine fine de sapin baumier (*Abies balsamea* (L.) Mill.).

2.6.2 Collecte des échantillons d'exsudats racinaires et extraction

La collecte des exsudats racinaires a été conduite sur 3 paires d'arbres greffés (i.e. 6 arbres) et 6 arbres non greffés. Au total 108 échantillons d'exsudats racinaires ont été collectés (i.e., 3 sites x 3 réplicats x (6 arbres greffés + 6 arbres non-greffés) en utilisant un système de cuvette développé pour les prélèvements *in situ* par Phillips *et al.* (2008). Trois racines fines et terminales (diamètre < 2 mm incluant les racines latérales et de 10 à 15 cm de longueur) par arbre ont été délicatement excavées (entre 0 et 30 cm de profondeur), puis rincées à l'eau distillée pour éliminer le sol résiduel (Figure 2.6). Chaque racine a ensuite été placée dans un papier humide (Kimwipe®) entourée de terre tamisée et recouverte de litière pendant 24 heures, afin que les racines soient facilement accessibles pour la collecte des exsudats et puissent récupérer des stress potentiels induits par l'excavation. Un jour plus tard, après avoir été rincées à l'eau distillée, les racines ont été placées dans des cartouches (cartouches d'extraction en phase solide vides de 50 mL, équipées d'un

filtre 20 μm , Agilent®) remplies de billes de verre stérilisées (diamètre = 1 mm, masse par cartouche ~ 125 g) pour simuler le sol et d'eau distillée (25 mL) pour maintenir l'humidité (Figure 2.6). Les cartouches ont ensuite été fermées en utilisant du Parafilm® autour de la racine. Le système a été enveloppé de papier aluminium, réenterré et recouvert de litière. Après la période d'exsudation de 72 h, les exsudats ont été collectés à l'aide d'une seringue et filtrés à 20 μm puis congelés à -80°C . Des témoins négatifs (3 par sites) utilisant le même protocole mais sans racines à l'intérieur de la cartouche ont également été réalisés. Les exsudats ont été collectés à l'aide d'une seringue (60 mL) puis placés dans des fioles en verre brun (60 mL). Les exsudats ont été congelés à -80°C et lyophilisés (Lyovac GT2). Six milligrammes de poudre d'exsudat de chaque échantillon ont été extraits dans 1 mL d'eau (100%), suivi d'un bain à ultrasons (3 min à température ambiante). Les extraits d'exsudat ont été ultracentrifugés (14000 g, à température ambiante pendant 5 min) et le surnageant a été collecté et filtré pour analyses métabolomiques (PES, 13 mm, 0,22 μm , Restek®, USA).

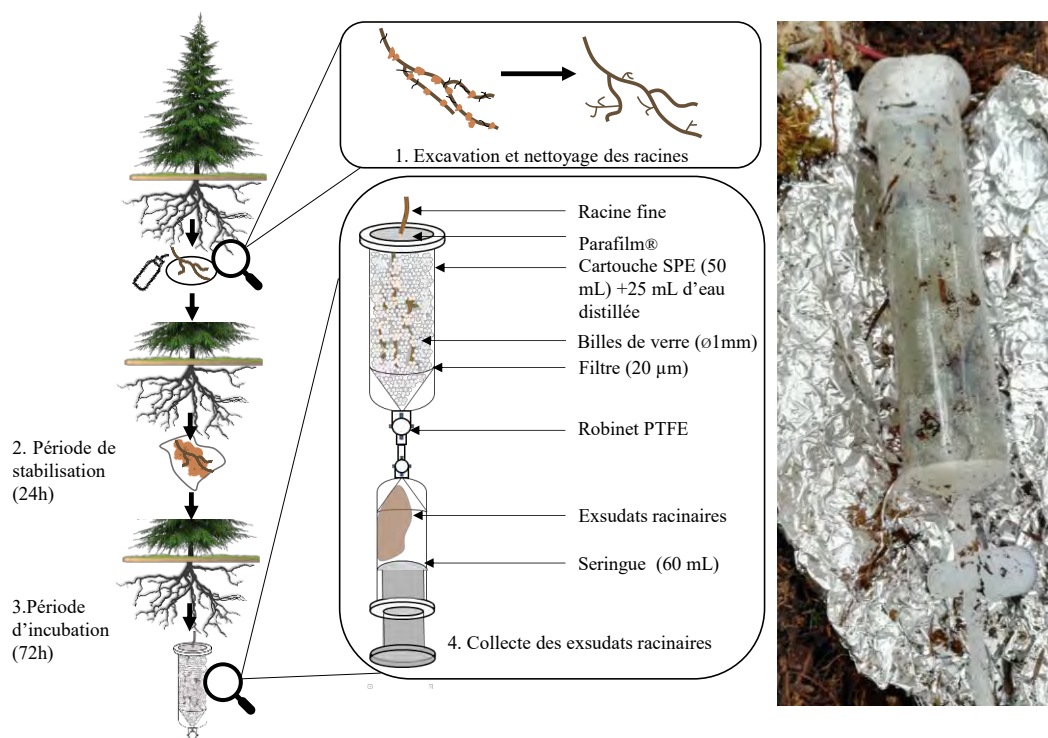


Figure 2.6 : Système de cuvette utilisé pour la collecte des exsudats racinaires de sapin baumier (d'après Michalet *et al.* (2013) et Phillips *et al.* (2008)).

2.6.3 Analyses métabolomiques

2.6.3.1 Acquisition des données par UHPLC ESI QTOF

La métabolomique permet l'analyse non ciblée d'autant de métabolites que possible dans un échantillon. Elle permet de dresser une « empreinte ou profil chimique » unique pour chaque échantillon et l'identification d'un ensemble diversifié de métabolites primaires ou secondaires dans les extraits de plantes. Ce type d'analyse comprend fréquemment la séparation, la détection et l'identification de tous les métabolites dans un échantillon par des techniques analytiques impliquant la chromatographie en phase gazeuse et/ou liquide (i.e. GC ou LC) couplée à la spectrométrie de masse (MS) (Figure 2.7).

Au cours de cette thèse, les analyses métabolomiques ont été réalisées sur la plateforme MALLABAR à Marseille (financée par le CNRS, la Région Provence

Alpes Côte d'Azur, la Fondation TOTAL et l'ANR). Elles ont été réalisées avec un instrument UHPLC (Dionex Ultimate 3000, Thermo Scientific®, USA) équipé d'une pompe RS, d'un échantillonneur automatique, d'un compartiment colonne thermostaté et d'un réseau de diodes UV associé à un spectromètre de masse (i.e. MS, quadripôle à temps de vol, QTOF) équipé d'une source d'ionisation Electrospray (ESI ; Impact II, Bruker Daltonics®, Allemagne) (Figure 2.7).

Après injection, les analytes contenus dans les extraits de racines et exsudats ont été soumis à séparation par « Ultra High Performance Liquide Chromatography » (UHPLC) à l'aide d'une colonne C18 Luna® Omega Polar (2,1 mm× 100 mm, 1,6 µm, Phenomenex®). Ce type de chromatographie liquide permet de séparer efficacement les composés de faible poids moléculaires (< 1500 Da) polaires et semi polaires et non volatiles (e.g. les flavonoïdes, les alcaloïdes et d'autres composés phénoliques).

Le taux d'élution a été réglé à 0.5 mL/min à 45°C. Les solvants chromatographiques étaient composés d'eau + 0,1 % d'acide formique et d'acétonitrile + 0,1 % d'acide formique (voir Annexe C, Table C.1. pour les paramètres chromatographiques). Pour les analyses d'extraits de racines, la détection MS a été effectuée en mode d'ionisation négative et positive. Le mode négatif offrant une meilleure sensibilité pour les analyses d'exsudats racinaires, les spectres de masses ont été enregistrés dans ce mode d'ionisation. Les paramètres MS ont été détaillés dans le matériel supplémentaire du Chapitre V (Annexe C, Table C.1.).

Un échantillon composite constitué d'un mélange de chaque échantillon a été utilisé comme échantillon de contrôle de la qualité analytique ainsi que pour déterminer la méthode chromatographique et le volume d'injection. Les échantillons ont été injectés de manière aléatoire, ainsi qu'un échantillon composite tous les six échantillons, ce qui a permis d'évaluer le décalage du MS dans le temps et de normaliser les données. Des blancs ont également été injectés pour éliminer les métabolites associés au bruit de fond. Le volume d'injection pour les extraits de racines était de 0,05 µl (mode négatif) et de 0,5 µl (mode positif). Le volume

d'injection pour les extraits d'exsudat était de 5 μ l (mode négatif). Les analyses ont été enregistrées à une fréquence d'acquisition de 2 Hz pour les extraits de racines et de 4 Hz pour les exsudats. La gamme de masse (m/z) a été fixée de 50 à 1200.

Les données MS² ont été acquises selon les mêmes paramètres mais le volume d'injection pour les extraits de racines était fixé à 0,5 μ L (mode négatif) et 2 μ L (mode positif). L'énergie de collision était fixée à 40 eV pour les analyses MS².

2.6.3.2 Analyses des données

Les analyses ont été calibrées automatiquement par calibrage interne avec une solution de formate/acétate (voir Annexe C, Table C.1. pour la composition de la solution de calibrage) avant d'exporter les données dans des fichiers netCDF (mode centroïde) en utilisant Bruker Compass DataAnalysis 4.3.

Les données ont ensuite été traitées par le logiciel XCMS (Smith *et al.*, 2006) sous le logiciel R version 3.5.1 (R core team, 2019), en suivant différentes étapes pour générer la matrice de données finale : (1) la détection des pics ; (2) l'alignement des échantillons, (3) le regroupement des pics, (4) l'intégration des pics, puis (5) la génération du rapport de la matrice de données à transférer sur Excel. Pour assurer la qualité des données et éliminer les signaux redondants, trois étapes de filtrage successives ont été appliquées aux données prétraitées à l'aide d'un script interne sur R. La première étape était basée sur le rapport signal/bruit (S/N) afin d'éliminer les éléments de la matrice observés dans les blancs (S/N fixé à 10 en comparant les échantillons pool et les blancs). La seconde étape a permis de supprimer les éléments de la matrice qui présentaient une intensité variable dans les échantillons pool (seuil à 0,3). La dernière étape a consisté à supprimer tous les éléments de la matrice qui étaient auto-corrélés (seuil à 0,8) pour éliminer les isotopes et les adduits. L'ensemble de ces étapes permet d'acquérir des matrices de données intégrant chacun des ions détectés par MS dans chaque échantillon en fonction de leurs rapports m/z et de leurs temps de rétention (RT) ainsi que leur intensité.

2.6.3.3 Analyses chimiométriques

Des analyses multivariées telles que des « Partial Least Squares Discriminant Analysis » (PLSDA), ainsi que des analyses de types « Permutational Multivariate Analysis of Variance » (PERMANOVA) ont été réalisées pour discriminer les signatures chimiques des racines fines et des exsudats d'arbres greffés et non greffés selon les sites. Toutes les analyses multivariées ont été réalisées avec le logiciel R version 3.5.1 (R core team, 2019) et représentées graphiquement à l'aide de MetaboAnalyst 4.0 (www.metaboanalyst.ca, Chong *et al.*, 2018). Les métabolites les plus discriminants ont ensuite été mis en évidence en calculant les scores « Variable Importance in Projection » (VIP) estimant l'importance de chacune des variables.

2.6.3.4 Annotation des métabolites

L'annotation des composés identifiés comme distinguant les métabolomes des racines fines et d'exsudats d'arbres greffés et non greffés a été réalisée en utilisant une stratégie de déréplication (Brakni *et al.*, 2018 ; Michel *et al.*, 2015). Brièvement, le logiciel Bruker Compass DataAnalysis 4.3 a été utilisé pour associer des formules chimiques possibles aux ions détectés dans les spectres MS. Pour réduire le nombre de propositions possibles, C, H et O ont été sélectionnés pour les calculs de composition élémentaire et seules les faibles valeurs de précision de masse (erreur en ppm) et de qualité du modèle isotopique (valeur mSigma) ont été considérées. Les ions spécifiques $[M+HCOO]^-$, $[M-2H]^{2-}$ et $[M+Na]^+$ observés respectivement en mode négatif et positif, ont permis de confirmer les formules chimiques de l'ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ ou $[M+H]^+$. Les formules moléculaires possibles pour chaque pic sélectionné ont ensuite été recherchées dans des bases de données publiques, à savoir KNapSAcK, Dictionary of Natural Products, HMDB, ChEBI et PubChem (Wolfender *et al.*, 2015) pour signaler les produits naturels connus et/ou éliminer les formules non référencées. En outre, le temps de rétention (RT), les données MS² ainsi que les informations bibliographiques et chimiotaxonomiques ont été utilisées pour l'annotation.

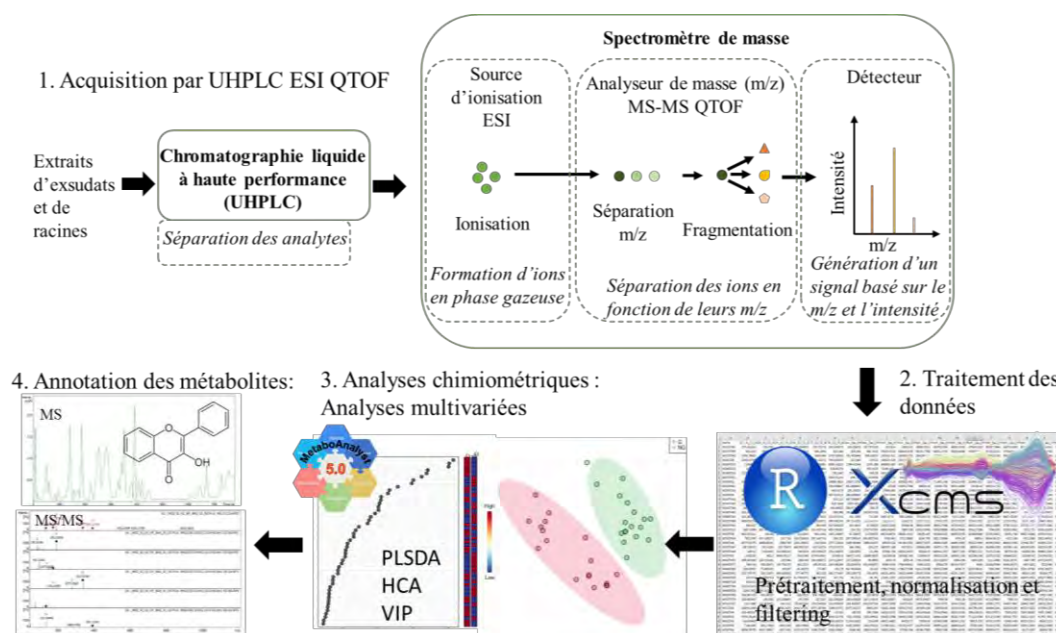


Figure 2.7: Schéma récapitulatif des différentes étapes réalisées pour l'analyse métabolomique des exsudats racinaires et des racines fines de sapins baumiers.

2.6.3.5 Phénols totaux

Les composés phénoliques étant reconnus pour avoir de fortes propriétés allélopathiques, la teneur en phénols totaux des échantillons de racines fines ont été estimées. L'ensemble des échantillons a été analysé en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu (Folin et Denis, 1915).

2.6.4 Caractéristiques physico chimiques du sol

Les sols des sites où ont été collectés les racines fines et exsudats ont été caractérisés. Pour cela, des échantillons de sol ont été prélevés au pied de chaque arbre échantillonné puis lyophilisés (Lyovac GT2®) pendant 72h et enfin broyés pour être soumis aux analyses physico-chimiques suivantes :

- Estimation de la teneur en matière organique et C ;
- Estimation de la teneur en nutriments (N, P, Na, Ca, K, Mg) ;
- Evaluation de la capacité d'échange cationique (CEC) ;
- Evaluation de texture du sol (% de sables, d'argiles et de limons).

CHAPITRE III

FRÉQUENCE ET FACTEURS DE FORMATION DES GREFFES RACINAIRES DANS LES PEUPLEMENTS NATURELS DE SAPINS BAUMIERS

Ce chapitre fait l'objet d'une publication dans *Forest Ecology and Management* :
Quer, E., Baldy, V., & DesRochers, A. (2020). Ecological drivers of root grafting
in balsam fir natural stands. *Forest Ecology and Management*, 475, 118388.

Ecological drivers of root grafting in balsam fir natural stands

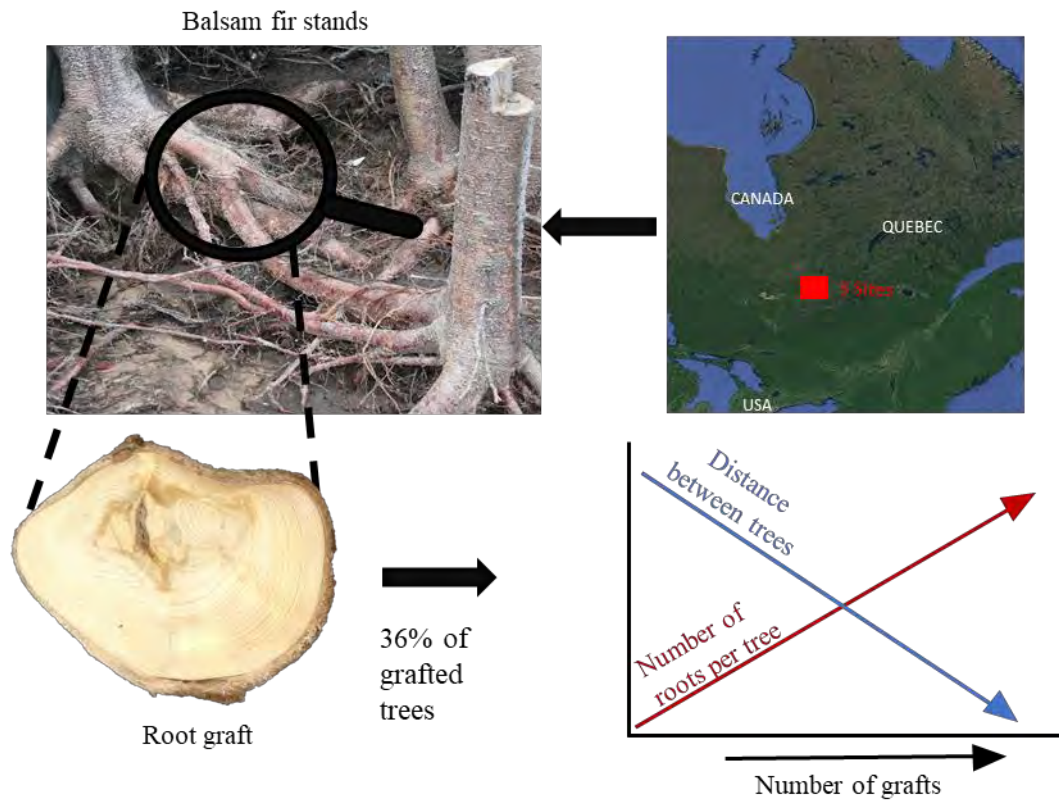
E. Quer^{ab*}, V. Baldy^a, A. DesRochers^b

(a) Aix Marseille Université, IMBE, Avignon Université, CNRS, IRD, 3 place
Victor Hugo 13331, Marseille, France.

(b) Université du Québec en Abitibi-Témiscamingue, IRF, 341 rue Principale Nord,
J9T 2L8, Amos, Québec, Canada.

*Elodie Quer corresponding author: elodie.quer@imbe.fr

Graphical abstract



Highlights

- Root systems of 3 balsam fir stands were excavated in the boreal forest of Quebec.
- Frequency and conditions conducive to natural root grafting were characterized.
- 36% of trees were grafted with another tree, corresponding to 1.3 grafts per tree.
- Tree proximity and number of roots per tree increased root grafting frequency.
- Grafts formed between trees from 12 to 106 years old.

3.1 Résumé

Les greffes racinaires naturelles (anastomoses) résultent de la fusion des tissus vasculaires de deux racines. Elles permettent le transfert d'eau, de nutriments et de produits issus de la photosynthèse entre les arbres greffés affectant leur croissance et leur physiologie. L'objectif de cette étude était de déterminer la fréquence des greffes racinaires chez le sapin baumier (*Abies balsamea* (L.) Mill) en forêt boréale au Québec (Canada) et d'identifier les déterminants écologiques de la formation des greffes racinaires tels que la proximité entre les arbres ou la taille des arbres et des racines. Une aire de 50 m² a été excavée hydrauliquement dans trois peuplements de sapins baumiers différents en termes d'âge, de diamètre des arbres et de densité. Pour chaque aire excavée, nous avons mesuré le nombre de racines et de greffes par arbre ainsi que les diamètres et les âges de chacun des arbres, racines et greffes en réalisant des analyses dendrochronologiques. Le pourcentage d'arbres greffés et le nombre de greffes par arbre étaient similaires au sein des peuplements, correspondant respectivement à 36% ($\pm 2,86$ ES) et 1.30 % ($\pm 0,03$ ES). Les greffes racinaires se forment chez des arbres âgés de 12 à 106 ans. La distance moyenne entre les arbres greffés était de 47,91 cm ($\pm 5,10$ ES) et aucune greffe n'a été observée au-delà de 2 m de distance entre deux arbres. Le nombre de greffes par arbre augmentait avec le nombre de racines par arbre et la proximité entre les arbres. Des greffes racinaires ont été observées pour des racines âgées de 5 à 64 ans. Cependant, la majorité des greffes se forment lorsque les racines sont de faible diamètre (en moyenne 3,94 cm $\pm 0,33$ ES). Les résultats obtenus démontrent que les peuplements de sapins baumiers sont fortement interconnectés par les greffes racinaires. Les greffes racinaires peuvent se former tôt dans la vie des peuplements et se maintenir tout au long de celle-ci. Le nombre de racines par arbre et la proximité entre les arbres étaient les meilleurs prédicteurs de la formation des greffes racinaires.

Mots clés : Greffe racinaire, anastomose, *Abies balsamea*, Forêt boréale.

3.2 Abstract

Natural root grafts (anastomoses) result from the fusion of the vascular systems of two roots and allow trees to share water, nutrients and photosynthesis products, affecting tree growth and physiology. The aim of this study was to investigate the frequency of root grafting in balsam fir (*Abies balsamea* (L.) Mill) of the boreal forest of Quebec (Canada), and to identify ecological drivers such as tree proximity or size of stems and roots. One 50 m² area was hydraulically excavated in each of three natural balsam fir stands of various ages, tree diameters and densities. For each area, we measured the number of roots and grafts per tree, and the diameter and age of all stems, roots and grafts using dendrochronology techniques. Percentages of grafted trees and number of grafts per tree were similar between stands, corresponding to 36% (± 2.86 SE) and 1.30 (± 0.03 SE), respectively. Root grafting occurred at a wide range of tree ages from 12 to 106 years old. Mean distance between grafted trees was 47.91 cm (± 5.10 SE) and we did not observe any graft beyond a 2 m distance between trees. The number of grafts per tree increased with number of roots per tree and decreased with distance between trees. Root grafting also occurred at a wide range of root ages, from 5 to 64 years old. However, roots were relatively small at graft initiation, with an average root diameter of 3.94 cm (± 0.33 SE). These results demonstrate that balsam fir stands are highly connected through root grafting, occurring early in stand development and continuing throughout the life of the stands. The number of roots per tree and distance between trees were the best predictors for root grafting.

Key words: Root grafting, Anastomosis, *Abies balsamea*, Boreal forest.

3.3 Introduction

Although competition for resources is commonly considered as the main tree interaction in forest ecosystems, it is increasingly understood that trees may interact in more complex ways via “root connections” (Klein *et al.*, 2016; Lortie *et al.*, 2004; McIntire and Fajardo, 2011). Mycorrhizal and suckering networks interconnecting indirectly root systems through fungal hyphae or directly through parental roots have been highlighted to alter forest stand dynamics by allowing exchanges of resources between trees (Adonsou *et al.*, 2016a; Baret and DesRochers, 2011; Leake *et al.*, 2004; Simard and Durall, 2004). However, root grafting, i.e. the fusion of the vascular system of two or more roots generally from the same species but also rarely between different species, constitutes another underestimated pathway for resource exchanges (Graham and Bormann, 1966; Lev-Yadun, 2011; Mudge *et al.*, 2009). This phenomenon has been reported in nearly 200 perennial woody species in diverse habitats worldwide (Graham and Bormann, 1966; Larue, 1952). Grafted trees, through an extended common root system, have reinforced mechanical support and are able to exchange water, nutrients, photosynthates but also pathogens (Bader and Leuzinger, 2019; Fraser *et al.*, 2006; O’Neal and Davis, 2015). Grafted trees are thus not only in competition for resources but also in cooperation or facilitation (Eis, 1972; Keeley, 1988; Loehle and Jones, 1990; McIntire and Fajardo, 2011). It has been shown that the redistribution of resources between trees by a common root system can lead to increased tree growth and to delayed tree mortality (Adonsou *et al.*, 2016b; Tarroux and DesRochers, 2011). Root grafting could thus be considered as an adaptive strategy to cope with environmental heterogeneity and disturbances, or as an adaptation to intense tree competition leading to a complex community structure and competitive ability (Adonsou *et al.*, 2016b; Baret and DesRochers, 2011; Jelinkova *et al.*, 2012; Salomón *et al.*, 2016).

In order to better understand the mechanisms determining root grafting and its influence on forest stands dynamics, several studies have tried to describe tree and

stand characteristics leading to root grafting (Fraser *et al.*, 2005; Külla and Lõhmus, 1999; Tarroux and DesRochers, 2010). Proximity and high density of trees and roots have been shown to increase the probability of root contacts leading to root graft formation (Fraser *et al.*, 2005; Gaspard and DesRochers, 2020; Tarroux and DesRochers, 2010). Moreover, soil properties that determine root system architecture can also increase root density in particular soil areas leading to root grafting. For instance in shallow or stoney soils, roots are constrained to a thin layer of soil promoting root encounter (Bormann and Graham, 1959; Eis, 1972; Tarroux and DesRochers, 2010). Finally, mechanical abrasion of root bark by trees swaying in the wind, greater in sandy soils, promotes the fusion of root's vascular tissues and then graft formation (Basnet *et al.*, 1993; Eis, 1972; Tarroux *et al.*, 2010).

Balsam fir (*Abies balsamea* (L.) Mill) is a common tree species of the boreal forest in Quebec that can grow for prolonged periods of time in dense understory environments (Burns and Honkala, 1990; Ruel *et al.*, 2003). It has shallow rooting and maintains an abundant seedling bank on the ground leading to the formation of very dense stands after disturbances remove canopy trees (Morin and Laprise, 1997). These conditions seem conducive of root grafting and could explain how balsam fir can survive for such prolonged periods in the understory. However, there is no recent work on root grafting in balsam fir and only anecdotal observations of possible root grafts have been made when studying butt-rotting fungi (Redmond, 1957). In order to better understand the ecological significance of root grafting in balsam fir it is necessary to investigate the occurrence of root grafts, their frequency and the timing of their initiation. We make the hypothesis that root grafts formation is common in balsam fir and that their frequency depends on age and size of trees and roots and on the distance between trees. Aims of this study were: (i) to estimate the frequency of root grafting in balsam fir stands of the boreal forest in Quebec, (ii) to describe age and size distributions of roots and trees at graft initiation, (iii) to investigate the effect of the tree proximity, the size of stems, the number and the size of roots on the number of grafts per tree.

3.4 Material and methods

3.4.1 Study sites and stands characterization

Study sites were located in Abitibi-Témiscamingue in the balsam fir-white birch (*Betula papyrifera* Marsh.) bioclimatic domain of Quebec boreal forest (Grondin *et al.*, 1996). Annual total precipitation for the region averaged 929 mm (253 mm of snow and 675 mm of rain) with a daily temperature of 1.5 °C and an average of 2366 degree-days above 0 °C (Climate normal 1981-2010, Environment and Natural Resources Canada, 2018). The three sites were located on the Ontario-Quebec clay belt characterized by post-Wisconsinian lacustrine deposits forming heavy clay soils (at least 60% clay), offering a large physiographic unit with very similar soil conditions over the landscape (Canadian Agricultural Services Coordinating Committee, 1998; Vincent and Hardy, 1977). The first site (S1) was located near the Lake Duparquet Research and Teaching Forest (48°52'21.6"N, 79°46'53.0"W), the second site (S2) was located near Kinojévis teaching forest (48°18'26.1"N, 78°84'63.7"W) and the third site (S3) was located near the Harricana teaching forest training center (48°76'27.8"N, 77°77'93.3"W). We selected monospecific, healthy, naturally regenerated and mature stands (> 30 years old) based on their proximity to a water source and a gentle slope in order to be able to carry out the hydraulic excavation of the root systems. Excavated areas were approximately 50 m² and included a minimum of 15 living trees per area, corresponding to stands with a minimum density of 3000 stems ha⁻¹ (Table 3.1). Before excavation, distance between trees and DBH of each tree were measured. Trees were then cut down with a chainsaw and cross-sectional disks were collected at ground level (0 m). Disks of stems were air dried and sanded (80-400 grit) to reveal growth rings. As balsam fir is known to often present missing growth rings at the trunk base, the age of trees was estimated by counting growth rings and visually cross-dating chronologies of all trees using pointer years such as narrow or wide rings (Parent *et al.*, 2002, Schweingruber, 1988). A total of 125 stem disks were analyzed. Excavated area stand density ranged 6000 stems ha⁻¹ to 14200 stems

ha⁻¹. Age and diameter at breast height (DBH, 1.30 m) of trees differed among sites (ANOVA, $F_{\text{age}} = 52.28$, $F_{\text{DBH}} = 18.16$, $P < 0.001$) and ranged 39-74 years old and 7.9-16.5 cm, respectively. Mean age was lowest in S1 and highest in S3 while DBH decreased with increasing density ($S1 < S3 < S2$) (Table 3.1).

Table 3.1: Main characteristics of the three *Abies balsamea* excavated stands.

Site	S1	S2	S3	
				Total
Number of excavated trees	71	24	30	125
Number of excavated roots	352	161	185	698
				Mean
Stand age (years)	36	51	74	54
Density (stems.ha ⁻¹)	14 200	4800	6000	8 333
Mean tree age (years) ± SE	39 ± 15 a	49 ± 10 b	74 ± 14 c	49 ± 1.84
Mean DBH (cm) ± SE	7.9 ± 0.7 a	16.5 ± 1.6 b	11.9 ± 0.8 b	10.5 ± 0.6
Mean distance between trees (m) ± SE	0.46 ± 0.06 a	0.81 ± 0.12 b	0.77 ± 0.06 b	0.65 ± 0.05

Note: Totals and means were calculated including all sites ± Standard Error. DBH: Diameter at Breast High. When $P < 0.05$, different letters indicate significant differences between sites, $a < b < c$.

3.4.2 Root systems excavation and root measurements

The root system of each tree was hydraulically excavated using a firefighter's lance coupled to a high-pressure water pump (Mark III, Wajax, Lachine, Quebec), following Tarroux and DesRochers (2010) (Annexe A, Figure A.1.). To uncover all the roots, the excavation depth was between 30 to 60 cm. Complete excavation of root systems took about three weeks per site. Excavation revealed buried rotted stumps that were not included in the analyses. Standing dead or moribund trees and their associated root systems and grafts were analyzed if their state of decomposition allowed a clear visualization of growth rings. For each site, we counted number of grafts and roots (diameter > 1.5 cm) per tree. Grafts and cross-

sectional disks of each root (> 1.5 cm) were collected for dendrochronological analyses in the laboratory. The age of roots and root grafts were determined by counting and cross-dating the root disks with those of their corresponding stem after they were air-dried and sanded (80-400 grit) (Tarroux and DesRochers, 2010). Root disks were collected nearest to the stump in order to facilitate growth rings analysis and to avoid missing rings that are more common as we move away from the tree stump (Krause and Morin, 1995). The age of roots determined near the stump corresponds to the time when the root was produced by the tree. The grafts then form later in the life of the root, that is why the age of root grafts needs to be determined directly on the graft itself to identify the year when the two roots start producing a single and common wood layer. Root grafts are thus always “younger” than the root itself.

To determine if grafts formed a complete morphological union, they were cut into cross-sectional disks throughout their length to confirm if grafted roots shared common growth rings (Figure 1.1) (Graham and Bormann, 1966). Few very intertwined roots were rejected in the lab as they were not grafted and did not share a common wood layer after being cut. Age of grafts was determined by counting the number of common growth rings between the two grafted roots. Age of trees at graft initiation was determined by calculating the difference between the age of tree and the age of the associated graft. Due to the eccentric root growth, root diameter was calculated by averaging perpendicular measurements of the longest and the shortest diameters of the root (Adonsou *et al.*, 2016b). Root diameter at graft initiation was calculated by using the same method but measurements were realized on graft sections, before the first common growth ring between two roots (Figure 1.1). A total of 698 root disks and 58 grafts were analyzed.

3.4.3 Statistical analyses

Statistical analyses were done using R software version 3.5.1 (R core team, 2019). Differences in mean DBH, age of trees and root diameter between the three sites (S1, S2 and S3) were tested by one-factor ANOVAs, followed by post-hoc Tukey

tests. Because of violation of ANOVA assumptions, differences in mean distances, number of roots and graft age were analyzed using Kruskal Wallis test followed by post hoc Wilcoxon tests. The effect of sites on percentage of grafted trees was tested by using Pearson's Chi-squared test. Number of grafted roots and trees according to their diameter, age at graft initiation and distance between trees were also tested using Pearson's Chi-squared test. We developed a generalized linear model with a negative binomial function (GLM.NB.) to identify which predictors between tree age (years), DBH (cm), number of roots, mean root diameter (cm) and distance (m) were the best predictors to explain the number of grafts per tree.

We included mean distance between trees and distance to the nearest tree as predictors; however, after preliminary analysis we only used distance to the nearest tree as it performed better. Full data set were used for this model independently of site because the response variable variance (number of grafts per tree) was similar across sites. Only distance to the nearest tree was considered to calculate the model. The full model (including all the predictors) was simplified in order to determine the most parsimonious model using the function StepAIC (package "MASS", Venables and Ripley, 2013). StepAIC performs stepwise variable selection that adds or removes predictors to produce a model that minimizes Akaike's Information Criterion (AIC). Predictions of the most parsimonious model were represented graphically using "visreg" function (package "visreg", Breheny and Burchett, 2017). We used conditional inference tree (function "Ctree" in package "partykit") to help interpret the results. It estimates a regression relationship by binary recursive partitioning in a conditional inference framework that is based on maximally selected rank statistics (Hothorn *et al.*, 2021). Conditional inference tree was realized by using the variables of the best model fitted using GLM.NB.

3.5 Results

Root grafting was observed in the three excavated stands for a total of 58 grafts per 45 grafted trees corresponding to 1.3 grafts per grafted tree on average (Table 3.2). In total, 698 roots were excavated and 87 of them were grafted to roots of another

tree. Percentage of grafted trees was similar between sites, corresponding to 36% on average (Pearson's χ^2 test, $\chi^2 = 0.94$, $P > 0.05$) even if tree and root diameters, mean distance between trees, tree and graft ages were different (ANOVAs, $F_{\text{Root_diameter}} = 7.09$, Kruskal Wallis test, $\chi^2_{\text{min_distance}} = 13.73$, $\chi^2_{\text{Graft_age}} = 8.31$, $P < 0.05$, Tables 3.1 and 3.2). Mean graft age was 13.57 years (± 0.98 SE), with the youngest graft being 2 years old and the oldest graft 39 years old.

Table 3.2: Root systems and grafts characteristics of the three *Abies balsamea* excavated stands.

Site	S1	S2	S3	
				Total
Number of grafts	30	12	16	58
Number of grafted trees	23	10	12	45
Number of grafted roots	47	18	22	87
				Mean
Percentage of grafted trees (%) $\pm$ SE	32.4 a	41.7 a	40.0 a	36.0 ± 2.86
Mean number of grafts per grafted tree	1.3	1.2	1.3	1.3 ± 0.03
Mean graft age (years) $\pm$ SE	11.66 ± 1.06 a	11.54 ± 1.32 a	19.43 ± 2.51 b	13.57 ± 0.98
Mean diameter of roots (cm) $\pm$ SE	6.93 ± 0.27 a	8.27 ± 0.42 a	10.28 ± 0.46 b	8.12 ± 0.21
Mean number of roots per tree $\pm$ SE	5.97 ± 0.26 a	6.71 ± 0.30 a	6.61 ± 0.21 a	6.29 ± 0.16

Note: Totals and means were calculated including all sites $\pm$ Standard Error. When $P < 0.05$, different letters indicate significant differences between sites, $a < b < c$.

Root grafting occurred mainly between healthy trees of the same diameter class (Annexe A., Table A.1.). The difference in diameter between two grafted trees generally did not exceed 10 cm. Only 7 grafts were between two dead trees or between a healthy and a dead/moribund tree. Most of grafts were formed near the stumps (< 30 cm). During root graft formation, a callus formed around the fusion

point of the vascular tissues deforming the roots making it difficult to estimate one dominant root over the other (Annexe A., Figure A.1.). However, most of grafts were constituted by similarly-sized roots (Annexe A., Table A.1.). Grafts between two roots occurred from every angle but most of the grafts were formed when two main lateral roots encountered (Annexe A., Figure A.2.). Other dominant types of grafts were formed when a root touched the stump of a neighboring tree, generally involving a dominant and a smaller tree (Annexe A., Figure A.2.). Age of grafted trees at graft initiation ranged 12-106 years old across the sites and averaged 38 years old (± 3.0 SE). Relative distribution of grafted trees did not vary significantly among age classes at graft initiation but 71% of trees were grafted before 45 years old (Figure 3.1). Mean DBH of grafted trees was 14.1 cm (± 1.8 SE) across sites and it ranged 1.30 - 77 cm. Proportion of grafted trees was similar across tree DBH classes (Pearson's χ^2 test, $\chi^2 = 2.36$, $P > 0.05$, results not shown).

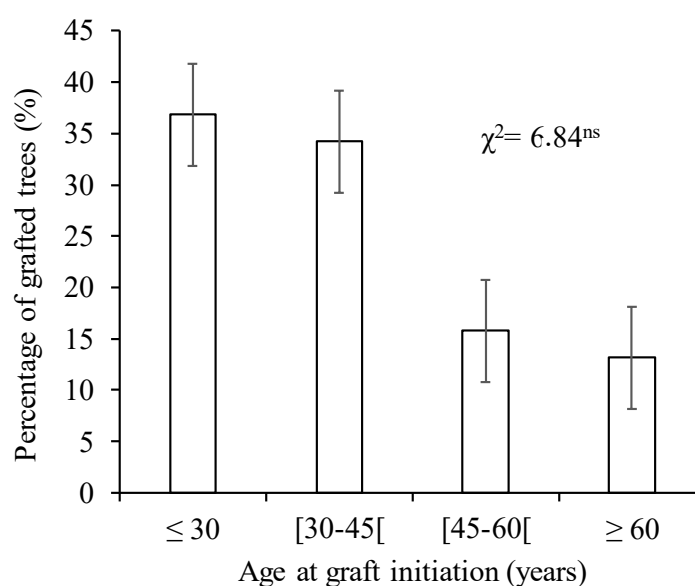


Figure 3.1: Percentage of grafted *Abies balsamea* trees observed in the 3 sites ($\pm$ SE) in relation to tree age at graft initiation. Differences between classes were tested by using Pearson's χ^2 test (χ^2 value is represented, ns: non-significant, with $P = 0.07$ and $N = 38$).

Root grafting occurred in roots as young as 5 years old and as old as 64 years old. Sixty-five percent of roots were grafted before 30 years old and mean root age at graft initiation was 26.48 years (± 1.35 SE) (Figure 3.2A). Mean root diameter at graft initiation was 3.94 cm (± 0.33 SE) and 63% of roots were grafted at a diameter less than 4 cm (Figure 3.2B). We found no graft from roots smaller than 0.40 cm in diameter or larger than 14.94 cm.

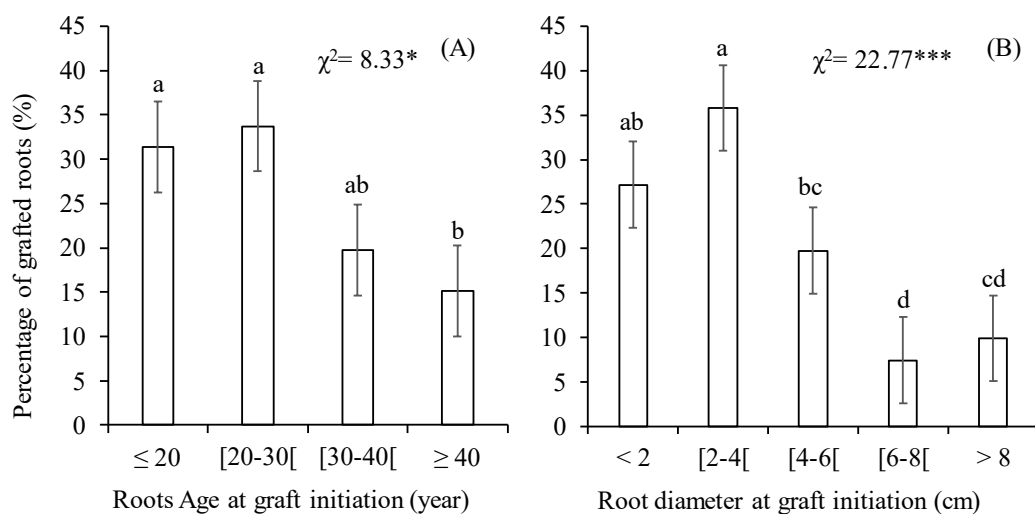


Figure 3.2: Percentage of grafted *Abies balsamea* roots observed in the 3 sites ($\pm$ SE) in relation to root age (A) and root diameter (B) at graft initiation. Differences between classes were tested by using Pearson's χ^2 test ($a > b > c > d$, different letters indicate significant differences, χ^2 value are represented with *: $P < 0.05$ and $N = 86$, ***: $P < 0.001$ and $N = 81$).

Mean distance between grafted trees was 47.91 cm (± 5.10 SE) and we did not observe any graft beyond a 181 cm distance. Percentages of root grafts did not significantly differ between our 25 cm distance classes but tended to decrease with increasing distance (Figure 3.3). We showed that 84% of all root grafts occurred between trees < 75 cm apart and that the majority (62%) of grafts formed between trees distant 4-50 cm (Figure 3.3).

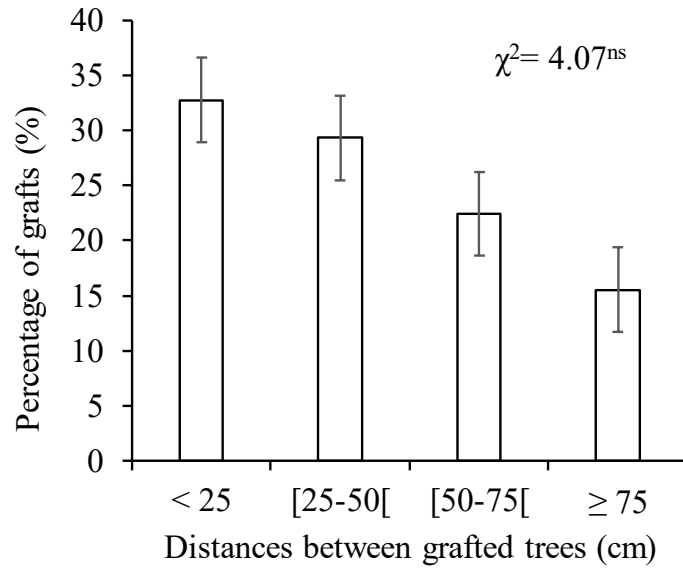


Figure 3.3: Percentage of root grafts observed in the 3 sites ($\pm$ SE) in relation to distance between grafted trees. Differences between distance classes were tested by using Pearson's χ^2 test (χ^2 value is represented, ns: non-significant with $P = 0.25$ and $N = 58$).

Age of trees, DBH and mean root diameter were not significant predictors of the number of root grafts per tree (GLM.NB, $P > 0.05$) (Table 3.3). However, the number of grafts per tree increased with number of roots per tree (GLM.NB, $P < 0.05$) and decreased with distance between trees (GLM.NB, $P < 0.001$) (Table 3.3, Figure 3.4). The following equation (1) predicted the number of root grafts per tree according to the number of roots and the distance between trees (Figure 3.4):

(1) $\text{Log (Number of grafts per tree)} = 0.61 + (0.11 \times \text{number of roots}) - 2.33 \text{ minimal distance between trees.}$

Table 3.3: Output of negative binomial generalized linear model (GLM.NB) testing the effects of tree age, DBH, number of roots per tree, mean root diameter and distance between trees on the number of root grafts per tree.

	Number of grafts per tree		
	d.f.	Z value	<i>P</i> value
(Intercept)	1	0.413	ns
Age (year)	1	0.492	ns
DBH (cm)	1	0.207	ns
Number of roots	1	2.582	*
Mean root diameter (cm)	1	0.597	ns
Distance (m)	1	-5.411	***
All R^2 (AIC)		0.16 (232.95)	
MPM R^2 (AIC)		0.33 (230.4)	

Note: Values of R^2 and AIC of the general model including all factors (All) and of the most parsimonious model (MPM) are shown. Variables retained in the most parsimonious models are reported in bold (d.f.= degree of freedom, *P* values = ns: non-significant with $P > 0.05$, *: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$, $N = 80$).

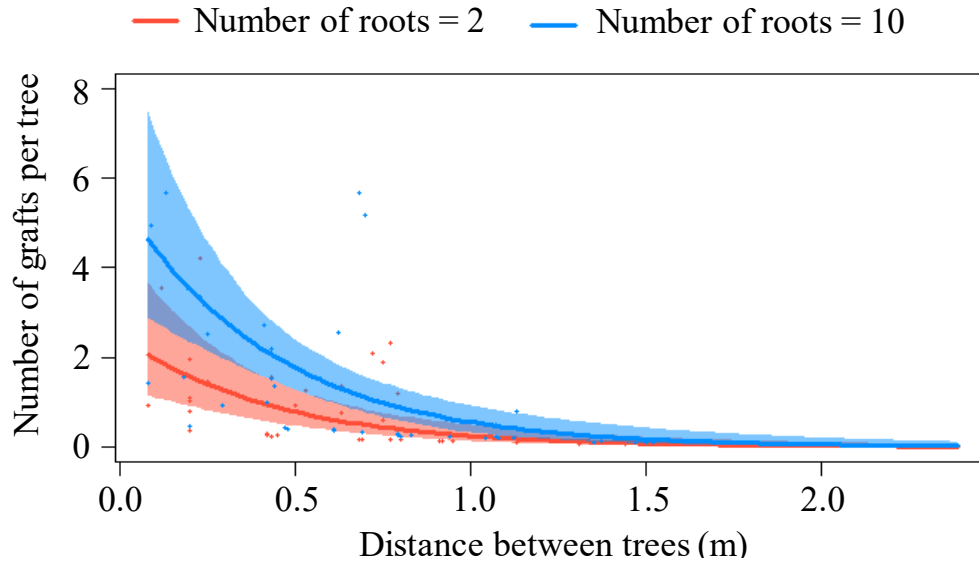


Figure 3.4: Model projections and partial residuals of number of grafts per *Abies balsamea* as a function of distance between trees and number of roots per tree. Number of roots = 2 and Number of roots = 10 correspond to the lower and upper percentiles (e.g. 10th and 90th). Point colors are determined by the closest value of the number of roots. (95% confidence intervals are highlighted, $R^2 = 33\%$, $N = 80$).

The conditional inference tree model showed the same significant predictors as the MPM selected and both models had similar R^2 (33% and 44% respectively). When distance between trees was less than 0.13 m, predicted number of root grafts was the highest, around 5 grafts. When distance between trees was above 0.77 m, trees were generally not grafted. If distance was between 0.13 and 0.77 m and if trees had 10 or less than 10 roots, number of root grafts predicted was around 1. However, for similar distances, trees that had more than 10 roots had predicted numbers of root grafts around 4 grafts (Figure 3.5).

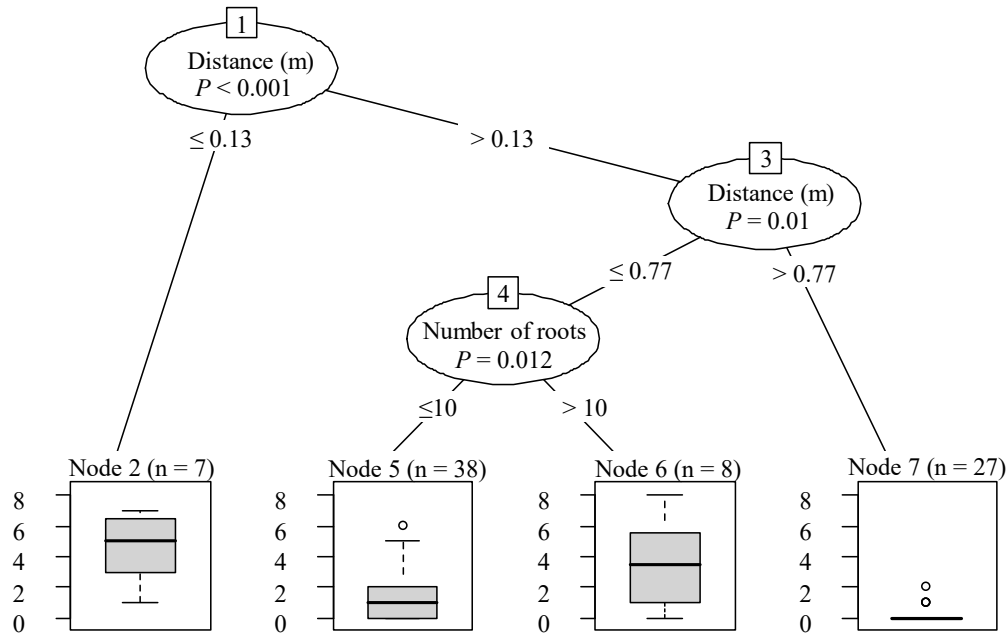


Figure 3.5: Conditional inference tree for number of grafts per tree in relation to number of roots and distance between grafted trees (m). The numbers inside the squares identify the nodes and the order of variable/partition entrances, starting with 1 in the root node. The predicted number of grafts per tree for each node is specified by boxplots in the lower part of the figure ($R^2 = 44\%$, $N = 80$).

3.6 Discussion

We confirmed here for the first time the occurrence of root grafting in balsam fir. Root grafting has been reported in several fir species such as silver fir (*Abies alba* Mill.; Elwes and Henry, 1909), white fir (*Abies concolor* (Gordon and Glend.) Lindl. ex Hildebr.; Jepson, 1909) and grand fir (*Abies grandis* (Douglas ex D. Don) Lindl.; Graham and Bormann, 1966), suggesting that most species of this genus could form root grafts. Excavated stands were highly interconnected with on average 36% of grafted trees indicating that root grafting is a common occurrence in balsam fir (Table 3.2). This percentage is lower than in pine stands, usually recognized to have strong root grafting propensity (up to 90% in *Pinus resinosa* Sol. ex Aiton or to 50% in *Pinus strobus* L.) (Bormann, 1966). Root grafting

occurrence in balsam fir was however similar to other natural stands of boreal forest species such as Norway spruce (33%) (Küllä and Löhmnus, 1999) and balsam poplar (48%) (Adonsou *et al.*, 2016a).

Tree proximity was the most important driver for root grafting as the number of grafts per tree decreased with increasing distance between trees (Table 3.3, Figure 3.4). These results confirm the postulate that distance between trees is the main predictor of root grafting beyond stand density, age or size of trees and roots (Gaspard and DesRochers, 2020; Küllä and Löhmnus, 1999; Tarroux and DesRochers, 2010). This could be explained by (i) a shorter time for roots of close trees to meet and a greater probability to cross, (ii) the fact that tree proximity promotes mechanical abrasion and root friction caused by wind swaying and thus root grafting (Cook and Welch, 1957; Küllä and Löhmnus, 1999). Proximity is a better predictor of root grafting than stand density because the latter does not reflect spatial arrangement of trees (Tarroux and DesRochers, 2010). Our results confirmed this assumption, as tree density was three times higher in S1 than in S3 but percentages of grafted trees were similar (Tables 3.1 and 3.2). Distance between grafted trees averaged 50 cm, as was found for lodgepole pine and Norway spruce, suggesting that close proximity between trees is necessary for root grafting (Figure 3.3) (Fraser *et al.*, 2005; Küllä and Löhmnus, 1999). In our three stands, 80% of grafted trees were linked to their closest neighbor and thus grafted trees were mostly observed between trees in clusters, which is not well reflected by stand density. Dense tree clusters are very common in balsam fir stands that can maintain an abundant seedling bank on the ground conducive to closely growing tree formations (Morin and Laprise, 1997; Ruel *et al.*, 2003).

The number of grafts per tree increased with the number of roots per tree (Table 3.3, Figure 3.4). As it was reported in Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) and hybrid poplar (*Populus maximowiczii* × *Populus balsamifera*), positive correlation between root grafting and number of roots per tree is probably due to the higher probability of intertree root contacts (Gaspard and DesRochers, 2020; Reynolds, 1982). This effect was particularly important when distance between

trees was between 0.13 and 0.77 m; At these distances, the predicted number of grafts for trees with less than 10 roots was around 1 and around 4 if trees had more than 10 roots (Figure 3.5). Since root density decreases with increasing distance from the stem, trees with a greater number of roots increased root grafting probability (Küllä and Löhmnus, 1999). We found two trees that presented an above-average number of grafts (> 1.3 grafts per tree) even if they were distant of more than 50 cm to the closest tree (Figure 3.3). These two trees were larger than the average of grafted trees ($\text{DBH} > 14.1\text{cm}$) and had lots of roots (> 9 roots per tree). The resulting greater probability of forming root grafts could thus be due to the larger area of soil they occupy. However, the percentage of observed trees with more than 10 roots was low (approx. 13%) so this modeling result has to be considered with care (Tables 3.1 and 3.2).

When trees increase in size and age, their roots become larger and have more ability to anchor firmly in the soil. During root grafting formation radial growth of the two roots is maintained at the point of contact, creating a pressure point, stronger for larger roots, can possibly facilitating the fusion of vascular tissues (Reynolds, 1982). In this way, positive correlations are often found between number of grafts per tree, DBH, mean tree age, and mean root diameter (Bormann, 1966; Bormann and Graham, 1959; Fraser *et al.*, 2005; Tarroux and DesRochers, 2010). However, these factors did not explain root grafting in balsam fir (Tables 3.2 and 3.3). Balsam fir growing in close-stems formations responds vigorously to release following disturbances and goes through a self-thinning stage caused by strong competition for light (Bégin *et al.*, 2001). During self-thinning, stands undergo a shift in DBH frequency of live trees and diameter distribution becomes increasingly skewed (McCarthy and Weetman, 2007). These changes in tree size hierarchy could explain why DBH was not a good predictor of root grafting for this species. Self-thinning in balsam fir forests of western Newfoundland begun once stands reached stem densities of approximately $31000 \text{ stems ha}^{-1}$ at around 60-65 years old (McCarthy and Weetman, 2007). Mean tree age was 74 years old in Site 3 with a density of $6000 \text{ stems ha}^{-1}$; Self-thinning stage could thus have been in progress at the time of

excavation. Trees in sites 1 and 2 seemed too young for being in this self-thinning stage. However, the observations of dead trees and stumps during the excavation and the large distribution of tree DBH suggest that stands could undergo the preliminary stage of self-thinning at excavation time.

Moreover, results on balsam fir age determination have to be considered with care because the physiological age of a balsam fir can differ from its chronological age (Bégin *et al.*, 2001; Morris, 1948). Indeed, trees can undergo intermittent radial and height growth interruptions during their understory development leading to absent growth rings at the stem base and consecutively in the root system (DesRochers and Gagnon, 1997; Morin and Laprise, 1997; Parent *et al.*, 2002, 2000). Missing growth rings could be expected to be particularly numerous in the in closed-stems formations leading to underestimation of the true age of trees and their roots (Krause and Morin, 1995).

In our study, natural root grafts were found in a variety of tree ages and sizes, respectively from 12 to 106 years old and from 1.3 to 77 cm in DBH. Similarly, root grafting occurred from 1 to 90 years in jack pine stands (Tarroux and DesRochers, 2010) and from 2 to 46 years in lodgepole pine stands (Fraser *et al.*, 2005). The oldest root graft that we found was 39 years old and belonged to a 77 and a 74 years old trees (in S3). The youngest tree that was grafted was 36 years old at time of excavation and its oldest graft was 24 years old (in S1). This study is limited to the excavation time and we cannot predict the evolution of the grafts or whether grafts will continue to form over time. Though these large variations in the timing of graft formation means that grafting was not restricted to a particular period but could continue throughout the life of stands and that grafts could persist throughout stand development.

According to our results, root grafts also appear to form in roots of any age: root age at graft initiation averaged 26.5 years but varied from 5 to 64 years. Root age at graft initiation averaged 20 years but ranged between 2 and 41 years in trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx; Jelinkova *et al.*, 2009) and begun between 10

and 20 years (46% of cases) but ranged between 7 and 35 years in Norway spruce (Küllä and Löhmnus, 1999). However, root grafting initiated when roots were relatively small: 63% of roots were grafted at a diameter under 4 cm (Figure 3.2). This is probably because small roots have thinner bark, facilitating the fusion of vascular tissues during graft initiation (Eis, 1972).

Balsam fir is shade tolerant and competition for light is a key factor of tree interactions and community structure (Kunstler *et al.*, 2012; Messier *et al.*, 1999). As resources are redistributed among grafted trees, a shaded tree could receive photosynthates from a well-lit grafted neighbor (Fraser *et al.* 2006). Root grafting could thus explain this great shade tolerance in balsam fir, allowing it to survive in the understorey for several decades before release. This notion supports the hypothesis that natural root grafting allows intraspecific cooperative relationships between trees and limits tree competition effects by maintaining tree growth through resources translocation instead of competing for them (Lev-Yadun, 2011; Loehle and Jones, 1990). Our study thus suggests that communal root systems established between grafted trees could sustain tree growth within tree clusters and reduce intraspecific competition for soil resources and light. It could also explain why competition indices are often inconclusive for this species. In their study, Duchesneau *et al.* (2001) found that growth of balsam fir saplings (height < 200 cm) receiving less than 25% of full sunlight was not affected by intraspecific competition. It suggests that root grafts could allow suppressed grafted trees to persist under conditions where un-grafted trees would be removed by competition (Fraser *et al.*, 2006). Root grafting could thus delay self-thinning through greater survival rates of suppressed trees, resulting from carbohydrate and water transfers from vigorous and dominant neighboring trees (Adonsou *et al.*, 2016b; Fraser *et al.*, 2006). During self-thinning stage, tree density decreases leading to an increase of distance between trees and likely to a decrease in the formation of new grafts.

Root grafting should be considered in forest management since it can influence forest dynamics, by modulating competition relationships between trees or constitute a way for diseases to spread. Considering that balsam fir frequently

develops dense tree clusters, pre-commercial or commercial thinning is often prescribed to release growth and reduce competition for resources (Ruel *et al.*, 2003). However, residual grafted trees may not benefit from reduced competition by thinning if roots and stumps of the removed trees keep on living and drain carbohydrates from residual trees, limiting growth of treated stands (Fraser *et al.*, 2007; Tarroux *et al.*, 2010). Vigorous residual grafted trees could benefit from the acquisition of new functional roots from a removed connected neighbor but if the imbalance between residual root biomass and leaf area is too large, growth of residual trees may suffer. In two naturally regenerated stands of *Pinus banksiana*, commercially thinned 5 years prior excavation (46% and 56% of trees removed), dendrochronological analyses showed that radial growth of residual trees grafted to removed trees was lower than that of non-grafted tree after 4 years (Tarroux *et al.*, 2010). The amount of resources translocated between two grafted trees is proportional to the number of grafts per tree (O’Neal and Davis, 2015). Since the number of grafts per tree averaged 1.3 in *Abies balsamea* versus 0.79 in *Pinus banksiana*, a larger negative effect of thinning on fir growth can be expected. This effect should be particularly noticeable during the mortality phase or the self-thinning phase of natural balsam fir stands development, since this is the period when the number of grafted stumps and suppressed trees is likely to be the highest. Lighter thinning and from below is thus advised in such stands in order to reduce the imbalance between live root biomass and residual leaf area after thinning (Eis 1972; Tarroux *et al.*, 2010). Thinning from below only removes the smallest trees, hence creating a smaller imbalance between residual leaf area and the “communal” root biomass of a stand. This smaller imbalance allows stands to increase photosynthetic capacity and maintain growth rather than having to invest photosynthates into the support of too much root biomass when larger trees are removed (i.e. thinning from above) (DesRochers and Lieffers, 2001).

3.7 Conclusion

Although our stand characteristics differed, natural root grafting was found in the three excavated balsam fir stands. Root grafts were formed early or later in tree development (from 12 to 106 years old). Proximity of trees and the number of roots per tree increased the number of root grafts per tree, most likely because these factors are conducive to increased root contacts. These results suggest that studying the spatial arrangement (e.g. local tree and root density near grafted trees) might help to better predict probability of root grafting. Since balsam fir stands were highly connected through root grafts, trees can redistribute resources within the stand, which could explain how balsam fir can survive for such prolonged times in the understory. Root grafting could reduce intraspecific competition for soil resources and light and allow grafted trees to persist under conditions where ungrafted trees would be removed. Integrating root grafting knowledge into silvicultural practices could improve management of balsam fir stands. For instance, limiting the “waste” of photosynthates in the support roots and stumps of thinned grafted trees by using thinning from below could trigger an increase in photosynthetic capacity and growth resulting from the increase in available resources.

3.8 Acknowledgements

The research was funded by a Natural Sciences and Engineering Research Council discovery grant to AD. We are grateful to Elizabeth Turcotte and Etienne Poisson for their assistance with data collection and fieldwork. We also thank Jordane Gavinet, Hermine Nguena, Eric Meneiri and Mathieu Santonja for their technical support in statistical treatment of the data.

CHAPITRE IV

INFLUENCE DES GREFFES RACINAIRES ET DE LA COMPÉTITION INTRASPÉCIFIQUE SUR LA CROISSANCE DES PEUPLEMENTS NATURELS DE SAPINS BAUMIERS.

Ce chapitre a été soumis à la revue *Oikos*.

Does natural root grafting make trees better competitors?

E. Quer^{ac*}, M. Helluy^b, V. Baldy^a A. DesRochers^c

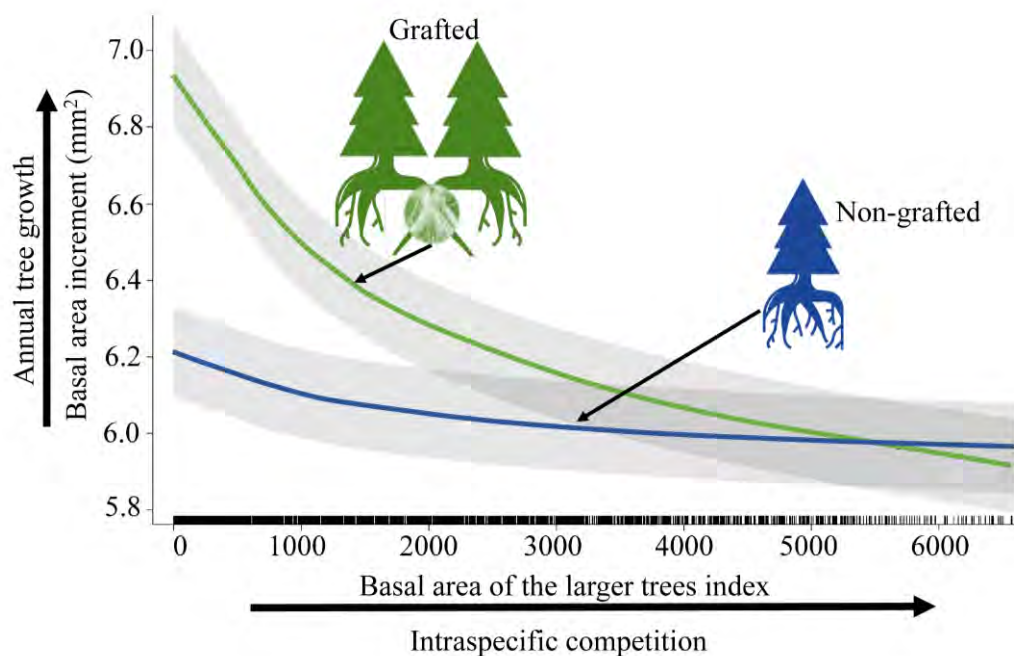
(a) Aix Marseille Université, IMBE, Avignon Université, CNRS, IRD, 3 place Victor Hugo 13331, Marseille, France.

(b) INRAE, Université Aix-Marseille, UMR RECOVER, Aix-en-Provence, France.

(c) Université du Québec en Abitibi-Témiscamingue, IRF, 341 rue Principale Nord, J9T 2L8, Amos, Québec, Canada.

*Corresponding author: elodie.quer@imbe.fr

Graphical abstract



Highlights

- Ring width and basal area of trees were measured using dendrochronology techniques in three natural balsam fir stands of the boreal forest of Quebec (Canada).
- We modelled annual balsam fir growth with tree size, competition index and root grafting status of the trees.
- Trees with higher growth rates formed root grafts, and root grafting decreased tree growth with intraspecific competition.
- Grafted trees cannot be considered as better competitors than non-grafted trees.

4.1 Résumé

Les greffes racinaires naturelles (anastomoses) sont des unions morphologiques formées entre les racines de différents arbres. La mise en place de systèmes racinaires commun permet le transfert d'eau, de nutriments et de produits de la photosynthèse entre les arbres greffés, affectant leur croissance et leur physiologie. Des sucres pouvant être redistribués entre les arbres greffés, la formation d'un système racinaire commun pourrait réduire l'effet négatif de la compétition intraspécifique pour la lumière et les ressources du sol au sein des peuplements. L'objectif de cette étude était de déterminer le rôle des greffes racinaires sur la compétition intraspécifique et la croissance des sapins baumiers (*Abies balsamea* (L.) Mill). Nous avons étudié les interactions entre arbres au sein de trois peuplements naturels de sapins baumiers en forêt boréale au Québec (Canada) contenant en moyenne 36% d'arbres greffés. Pour chaque peuplement, la largeur des cernes et la surface basale des arbres ont été mesurées grâce à la dendrochronologie. Nous avons utilisé des modèles linéaires mixtes pour tester l'effet des greffes racinaires et de la compétition intraspécifique sur la croissance radiale annuelle des arbres. Le meilleur modèle pour expliquer la croissance des arbres (70% de la variance de la croissance expliquée) intègre leur taille, leur statut de greffage et un indice de compétition (Basal Area of the Larger tree). Les années, les sites et les individus ont été fixés comme des effets aléatoires et expliquaient 22% de la variance restante. Les arbres avant la formation des greffes présentaient une meilleure croissance que les arbres non-greffés. Une fois les arbres greffés, leur croissance est fortement réduite lors de l'augmentation de la compétition intraspécifique. Ainsi, les arbres greffés ne peuvent pas être considérés comme de meilleurs compétiteurs que les arbres non-greffés. Ces résultats soutiennent l'idée que la présence de greffes permet aux arbres d'affecter la croissance des autres. Notre étude supporte l'idée que les arbres greffés répondent à la compétition pour la lumière et les ressources du sol, davantage comme une communauté, que comme des entités individuelles.

Mots clés : Greffes racinaires, *Abies balsamea*, Forêt boréale, Compétition, Croissance radiale, Anastomose.

4.2 Abstract

Natural root grafts (anastomosis) are morphological unions formed between roots of different trees. Common root systems allow translocation of water, nutrients and photosynthesis products between grafted trees, affecting their growth and their physiology. As carbohydrates are redistributed among grafted trees, the formation of a common root system could reduce the negative effect of intraspecific competition for light or soil resources within stands. The aim of this study was to investigate the role of root grafting on intraspecific competition and growth of balsam fir (*Abies balsamea* (L.) Mill). We studied inter-tree relationships in three natural balsam fir stands of the boreal forest of Quebec (Canada) that contained an average 36% of grafted trees. At each stand, ring width and basal area of trees were measured using dendrochronology techniques. We used mixed linear models to test the effect of root grafting and intraspecific competition on annual basal area increment of trees. The best model to explain tree growth (70% of the variance in balsam fir growth) included tree size, basal area of the larger tree competition index (BAL) and root grafting status of trees. Years, sites and trees were fixed as random effects and explained 22% of the remaining variance. Trees before grafting had higher growth rates than non-grafted trees. However, when root grafting occurred, tree growth was strongly reduced with increasing intraspecific competition. Thus, grafted trees cannot be considered as better competitors than non-grafted trees. Our study demonstrated that grafted trees acted on each other's growth and provides support for the idea that grafted trees respond to competition for light or soil resources more as a community rather than as individual trees.

Key words: Root grafting, *Abies balsamea*, Boreal forest, Competition, Radial growth, Anastomosis.

4.3 Introduction

When two roots from different trees come into contact, a morphological union can occur by the fusion of their vascular tissues to form a natural root graft (i.e. anastomosis, Graham and Bormann 1966; Mudge *et al.* 2009). In recent decades, underground networks created by root grafting generated interest in forest ecology as mechanisms of “resource sharing” between trees (McIntire and Fajardo 2014, 2011; Valladares *et al.* 2015). In addition to their role in facilitating resource acquisition and assimilation, extended common root systems of grafted trees allow resources exchange such as water, nutrients and photosynthates (Bader and Leuzinger, 2019; Fraser *et al.*, 2006; Klein *et al.*, 2016; O’Neal and Davis, 2015). Since grafted trees may directly share substances and affect each other’s growth, ecological concepts that support the notion of plant individuality and dominance of competition for resources in plant interactions are challenged (Brooker, 2006; Brooker *et al.*, 2008; Lortie *et al.*, 2004).

While root grafts have been observed worldwide in more than 200 tree species, root grafting has long been considered as a rare or random event and little research has focussed on its ecological significance (Graham and Bormann 1966; Larue, 1952). The role of root grafting was first reduced to a mechanism to improve anchorage and stability in windy environments and waterlogged soils (Basnet *et al.*, 1993; Keeley, 1988; Rigg and Harrar, 1931). Root grafting was also considered as a vector for diseases because pathogens translocated between grafted trees through sap flow or contact between roots (Baric *et al.*, 2008; Epstein, 1978). Over the last twenty years, interest in the role of root grafting on tree growth has grown to explain forest dynamics (Adonsou *et al.*, 2016c; McIntire and Fajardo, 2011; Tarroux *et al.*, 2010). On the one hand, Tarroux and DesRochers (2011) showed that *Pinus banksiana* radial growth was increased by intraspecific root grafting. Moreover, it was shown that radial growth of grafted *Picea mariana* or *Populus balsamifera* under insect outbreak or unfavorable climatic conditions was improved compared to growth of non-grafted trees, suggesting that root grafting could be an ecological

advantage for trees under environmental stresses (Adonsou *et al.*, 2016c; Salomón *et al.*, 2016; Vovides *et al.*, 2021). These results promote the idea that common root systems improve access, redistribution and use of soil resources among grafted trees leading to better growth and survival. This implies that grafted trees do not only compete for resources but can also directly facilitate the growth of their grafted neighbors (Eis, 1972; Keeley, 1988; Loehle and Jones, 1990; McIntire and Fajardo, 2011).

Nonetheless, it was also reported that root grafting was an energetically costly process: dendrochronological analyses of root grafts correlated root grafting to a decrease in tree growth during their formation (Tarroux and DesRochers, 2011). The same authors also showed that the inheritance of a root system from a removed tree, creates an imbalance between root biomass and leaf area, and thus could negatively impact growth of residual trees in thinned *Pinus banksiana* stands (Tarroux *et al.*, 2010).

Negative and positive interactions reported between grafted trees support the idea that relationships between grafted trees are non-neutral and can be summarized as: i) facilitation: moderation of biotic and abiotic stress, enrichment of resources or increased access to resources, or ii) parasitism: resources are translocated from the dominant to suppressed trees improving their survival at the expense of the growth of dominant trees.

Competition (i.e. negative interaction between plants through direct interference or indirectly through the exploitation of common resources) is a key process to explain community structure and dynamics in forests worldwide (Kunstler *et al.*, 2016). In forest stands, competition between trees increases with tree size, tree proximity and stand density (Lorimer, 1983). Interestingly, the probability of root graft formation also increases with tree size, proximity of trees and stand density, allowing resources translocation and cooperation relationships (Fraser *et al.*, 2005; Gaspard and DesRochers, 2020; Tarroux and DesRochers, 2010). A relatively high frequency of root grafting in balsam fir (*Abies balsamea* (L.) Mill) stands was

reported (36% of grafted trees in three 50 m² stands), where root grafting increased with tree proximity and number of roots per tree (Quer *et al.*, 2020). Balsam fir is known to be a shade tolerant species, growing for prolonged periods of time in dense understory environments without self-thinning (Burns and Honkala, 1990; Ruel *et al.*, 2003). Moreover, balsam fir maintains an abundant seedling bank on the ground leading to the formation of very dense stands after disturbances remove canopy trees (Morin and Laprise, 1997). Under these conditions of high intraspecific competition for light and soil resources, root grafting might lessen competition effects in dense stands by supporting tree growth through resources sharing and translocation (Lev-Yadun, 2011; Loehle and Jones, 1990). We thus undertook this study in order to better understand the ecological significance of root grafting in balsam fir stands under high intraspecific competition. In order to demonstrate if root grafting could alleviate the negative effects of intraspecific competition on balsam fir tree growth, we developed mixed linear models estimating the role of root grafting and intraspecific competition on balsam fir growth. After selecting the “best” model to predict tree growth, we studied interactions between root grafting and intraspecific competition to further explore their relationships. Our main hypotheses were: (i) intraspecific root grafting improves growth of grafted balsam fir trees; (ii) intraspecific competition reduces growth of grafted balsam firs; (iii) root grafting alleviates the negative effects of intraspecific competition on balsam fir growth.

4.4 Material and methods

4.4.1 Study sites

This study was conducted in Abitibi-Témiscamingue, north-western Quebec, in the balsam fir-white birch (*Betula papyrifera* Marsh.) bioclimatic domain of the boreal forest (Grondin *et al.*, 1996). The first site (S1) was located near the Lake Duparquet Research and Teaching Forest (48°52'21.6"N, 79°46'53.0"W), the second site (S2) was located near Kinojévis teaching forest (48°18'26.1"N, 78°84'63.7"W) and the

third site (S3) was located near the Harricana teaching forest training center (48°76'27.8"N, 77°77'93.3"W). All sites were on heavy clayey soils (at least 60% of clay) associated to post Wisconsinan glaciolacustrine deposits (Vincent and Hardy, 1977; Canadian Agricultural Services Coordinating Committee, 1998). From 1981 to 2010, mean daily temperature in this region was 1.5 °C with a mean of 2366 degree-days above 0 °C and annual total precipitation averaged 929 mm (253 mm of snow and 675 mm of rain) (Environment and Natural Resources Canada, 2018). To be selected, sites had to be monospecific, naturally regenerated, mature (> 30 years old) and healthy balsam fir stands. Site areas were approximately 50 m² and included a minimum of 15 living trees. Stand density ranged from 6000 stems ha⁻¹ to 14200 stems ha⁻¹. Prior to this study, hydraulic excavation and dendrochronological analyses of the root systems of each tree were carried out to determine frequency of root grafting, age of trees and grafts, as well as the distance between trees (see Quer *et al.* 2020 for further details). Stand age ranged from 39 to 74 years old. Percentage of grafted trees and number grafts per tree was similar between stands, corresponding respectively to 36% (± 2.86 SE) and 1.30 (± 0.03 SE). Mean graft age was 13.57 (± 0.98 SE) (Quer *et al.*, 2020) (Table 4.1).

Table 4.1: Root grafting occurrence and site characteristics of the three *Abies balsamea* excavated stands (according to Quer *et al.*, 2020).

Site	S1	S2	S3	Mean	Total
Stand age (years)	36	51	74	54	–
Density (stems ha ⁻¹)	14 200	4800	6000	8 333	–
Number of excavated trees	71	24	30	–	125
Percentage of grafted trees (%) $\pm$ SE	32.4	41.7	40.0	36.0 $\pm$ 2.86	–
Mean number of grafts per grafted tree	1.3	1.2	1.3	1.3 $\pm$ 0.03	–
Mean graft age (years) $\pm$ SE	11.7 $\pm$ 1.1	11.5 $\pm$ 1.3	19.4 $\pm$ 2.5	13.6 $\pm$ 1.0	–
Mean Basal Area of the Larger trees index (BAL)	5691.7 $\pm$ 209.6	3258.7 $\pm$ 235.5	3649.5 $\pm$ 328.8	4659.9 $\pm$ 185.1	–

4.4.2 Tree radial growth analyses by tree ring width series measurement

Field work was performed in summer 2017. At each site, all trees were felled with a chainsaw and cross-sectional disks were collected at ground level (0 m). Cross-sectional disks were air dried and sanded (80-400 grit) to reveal growth rings. Tree ring widths series were measured on cross-sectional disks from the stem base using a Velmex “TA Unislide” measurement system with ACU-Rite linear encoder and QC10V digital readout device (Velmex, Inc., Bloomfield, New York) interfaced with Measure J2X (Version 5.0x) ring-reading software (Project J2X, Voortech Consulting, Holderness, NH). Ring-width series were measured with 0.001 mm precision along two rays per wood disk when possible (i.e. when the rings were clearly visible) and visually cross-dated. To obtain a single series per tree, chronologies were averaged for each tree when two of them were available. A total of 110 tree ring width series were obtained.

Tree age and stem size increasing over time promotes a decline of tree ring width along cross-sectional radius. To avoid this biological trend, we converted tree ring width series into basal area increment (BAI) to calculate annual tree growth (Biondi and Qeadan, 2008) following equation (1):

$$BAI_t = \pi R_t^2 - \pi R_{t-1}^2 \quad (1)$$

Where R_t is the stem radius at year t and R_{t-1} is the stem radius at year $t-1$.

In order to include a minimum of 30 tree ring width measurements per year, we used only the data of tree growth for the last 60 years. Due to the inaccuracy of tree ring width measurement during the first years of growth, we decided to not take into account the first 5 years of growth of each tree in the data analysis.

4.4.3 Intraspecific competition measurements by using competition indices

Intraspecific competition between trees was estimated using distance-independent (BAL: Basal area of the Larger tree) and distance-dependent (HEG: Hegyi competition index) competition indices. The first index (BAL) was developed by Wykoff *et al.* (1982) and corresponds to the sum of the basal area of neighbor trees that are larger than the subject tree:

$$BAL = \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i \\ R_j > R_i}}^n \pi R_j^2 \quad (2)$$

With R_i = Radius of the subject tree i ; R_j = Radius of the competing tree j . The second index (HEG) was developed by Hegyi (1974) and corresponds to the sum of the ratios of diameters of a subject tree and its competitors, weighted by the distance from the subject tree. To integrate tree growth variability over time we replaced tree diameter by tree basal area in the next formula:

$$HEG = \sum_{j=1}^n \frac{BA_j / BA_i}{Dist_{ij}} \quad (3)$$

Where: HEG = Hegyi competition index; BA_i = Basal area of the subject tree i ; BA_j = Basal area of the competing tree j ; $Dist_{ij}$ = distance between trees i and j ; n = total number of competitors. In order to determine the radius around the subject tree in which there are potential competitors, we calculated competition indices (HEG) for 10 trees in each site for 10 years and for different values of radii (from 1 to 9 m). We then considered that each tree found in a radius of 6 m or less around the subject tree was a potential competitor (Annexe B, Figure B.1.). As HEG integrates basal area, it measures symmetric competition (i.e. competitors share resources in proportion to their size) and it is often associated to competition for belowground resources (Pretzsch and Biber, 2010). BAL only integrates basal area of larger neighbor trees and measures symmetric and asymmetric competition (i.e. large competitors capture a disproportionate share of contested resources over smaller

competitors) thus it reflects competition for belowground resources but also for light (Connolly and Wayne, 1996; Freckleton and Watkinson, 2001; Weiner, 1990).

4.4.4 Statistical analyses

Statistical analyses were done using R software version 4.0.3 (R core team, 2019). Considering grafted trees, for a same tree, years of growth were annotated BG for years of growth before grafting and G for years of growth once tree was grafted; for non-grafted trees: years of growth of a non-grafted trees were annotated NG.

Mean BAI of non-grafted trees and trees before grafting (i.e. NG *versus* BG,) were compared using analyses of variance (One-way ANOVA). At graft initiation, balsam fir trees were 38 (± 3.0 SE) years old on average (Quer *et al.*, 2020), thus the first 38 years of tree growth were considered for this analysis. As site effect was non-significant (Two-way ANOVA, $F = 0.10$, $P > 0.05$) data for each site were pooled. Prior to ANOVA, normality and homoscedasticity of the residuals were checked using Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively.

In order to test the effects of intraspecific competition (i.e. HEG and BAL) and root grafting status (i.e. G and NG) on *Abies balsamea* tree growth (i.e. BAI), we developed linear mixed effect models (LMER, packages “lme4” and “lmerTest”, Bates *et al.*, 2020; Kuznetsova *et al.*, 2020). Data were log-transformed to satisfy linearity and normality of the residuals assumptions using the “LogSt” function formulated to taking into account null values (i.e. HEG, BAL, package “DescTools”, Signorell *et al.*, 2021). Site, year and individual (i.e. tree) were considered as random factors for the intercept. The Model equation was as follows:

$$\log(BAI_{i,t}) = \beta_0 + \beta_1 \log(BA_{i,t-1}) + \beta_2 \log(CI_{i,t}) + \beta_3 Status_{i,t} + b_1 + b_2 + b_3 + e \quad (4)$$

with $BAI_{i,t}$ the Basal Area Increment of tree i at year t , $BA_{i,t-1}$ the Basal area of tree i at the previous year ($t-1$), $CI_{i,t}$ the Competition Index (i.e. HEG or BAL) of tree i at year t , the graft Status (i.e. NG, G) of the tree i at the year t , b_1 , b_2 and b_3 the

random effects estimated for the intercept with respectively trees, years and sites as grouping factors and e the residual error. $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3$ were the fixed parameters. As tree growth is strongly influenced by their size (MacFarlane and Kobe, 2006), BA was added to the model in order to integrate the effect of tree size on annual tree growth.

All combinations of random effects (trees, sites and years) on the intercepts were tested by adding or nesting them together but preliminary analysis revealed that the models better performed by integrating the three effects additionally. Ten models were produced for each response variable (CI, Status and BA) and compared based on the second-order Akaike Information Criterion (AIC) using the “aictab” function (package “AICcmodavg”, Mazerolle, 2020). Marginal and conditional r-squared (reporting proportions of variance explained by the fixed factor and by the fixed and the random factors, respectively) were calculated and used to quantify model performance (function “r.squaredGLMM”, package “MuMin”, Barton, 2020). ANOVAs were used on the selected models to test the global effect of the categorical variables on BAI. Interactions between competition index (i.e. HEG or BAL) and root grafting status (i.e. NG or G) were then tested on the best performing model using the same method. Effect plots of the selected model were represented graphically using the R package “effects” (Fox *et al.*, 2020). For each model, normality of the residuals and multicollinearity of the explanatory variables were tested using Shapiro-Wilk test and the Variance Inflation Factor.

4.5 Results

4.5.1 Tree growth models selection

Between the three single variable models tested, the two including competition indices (i.e. HEG or BAL) better explained BAI (i.e. tree growth) than the one including root grafting status (24.9%, 6.3% of variance explained for models including HEG and BAL respectively *versus* 2.9% for model including Status, Table 4.2). Thus, intraspecific competition better predicted BAI than root grafting.

In particular, HEG was a better predictor of BAI than BAL according to AIC (Table 4.2). After the addition of the BA (i.e., tree size) to the three previous models, the percentage of variance explained was similar between models (67.6% on average, Table 4.2). However, when adding BA, the model selected with the AIC included BAL rather than HEG (Table 4.2), showing that a competition index reflecting both symmetric and asymmetric competition (i.e. BAL) better explained BAI than a competition index integrating only symmetric competition (i.e. HEG).

Considering only additive effects, the best model explaining BAI according to AIC included BAL competition index, tree grafting status (Status) and BA (68.7% of the variance was explained, Table 4.2). Year, site and tree random effects explained 23.2% of the remaining variance. After testing the interactions between the selected explanatory variables, we found that the model including an interaction between tree grafting status and BAL was considered as better than the one without interaction according to the AIC (Table 4.2). Fixed effects explained 69.9% of the variance and random effects explained 22.2% of the remaining variance.

Table 4.2: Linear mixed-effects models tested to describe the annual Basal Area Increment (BAI) of *Abies balsamea* according to the competition indexes (HEG and BAL), the Basal Area of the previous year (BA) and the graft presence (Status). Trees, sites and years were set as random effects.

Models tested	Marginal R ²	Conditional R ²	AIC
log(BAI) ~ Status	0.029	0.849	6387.10
log(BAI) ~ log(BAL)	0.063	0.853	6226.78
log(BAI) ~ log(HEG)	0.249	0.839	6060.71
log(BAI) ~ Status + log(BA)	0.677	0.919	4632.29
log(BAI) ~ log(HEG) + log(BA)	0.673	0.916	4631.92
log(BAI) ~ log(BAL) + log(BA)	0.679	0.916	4611.80
log(BAI) ~ log(HEG) + log(BA) + Status	0.681	0.918	4632.71
log(BAI) ~ log(BAL) + log(BA) + Status	0.687	0.919	4612.52
log(BAI) ~ log(HEG) × Status + log(BA)	0.693	0.918	4618.56
log(BAI) ~ log(BAL) × Status + log(BA)	0.699	0.921	4593.91

Note: Best model selected is in bold. Values of marginal R² and conditional R² of the models tested are shown accounting for fixed and random effects.
AIC : Akaike Information Criterion.

4.5.2 Effects of root grafting, intraspecific competition and tree size on annual tree growth

Mean BAI of trees before grafting (i.e. BG) was 2.2 times higher than that of non-grafted trees (i.e. NG, 237.4 ± 47.6 versus 108.6 ± 16.8 mm², ANOVA, $P < 0.01$, Figure 4.1).

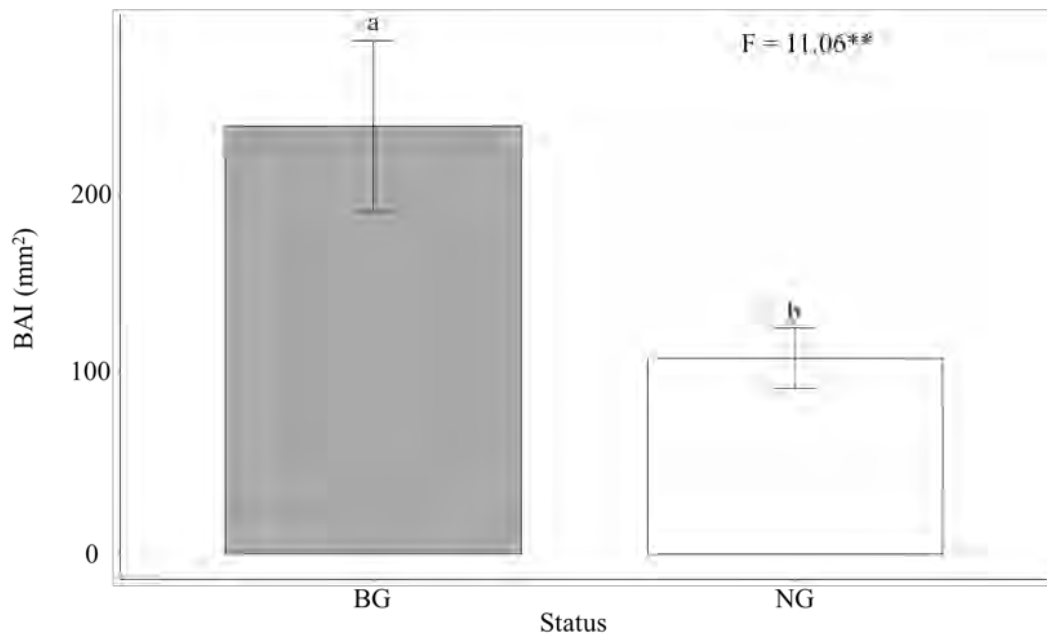


Figure 4.1: Mean Basal Area Increment (BAI, in mm²) of *Abies balsamea* in relation to graft status (BG: Before Grafting, NG: Non-Grafted). Differences between graft status were tested by using One-way ANOVA (Different letters indicate differences with $a > b$, F value is represented with **: $P < 0.01$ and $N = 110$). The first 38 years of tree growth were considered for this analysis corresponding to mean age of trees at graft initiation (Quer *et al.* 2020).

Tree grafting status (i.e. Status), intraspecific competition (i.e. BAL) and tree size (i.e. BA) significantly affected annual radial growth of trees (i.e. BAI, LMER, $P < 0.001$, Table 4.3 and Figure 4.2). Grafted trees (i.e. G) had 1.98 mm² greater BAI than the average BAI of non-grafted trees (Table 4.3 and Figure 4.2b). BAL had a negative effect on BAI (Table 4.3 and Figure 4.2b), where a 1% increase in BAL induced a 0.18% reduction in BAI. Tree growth (i.e. BAI) increased with tree size

(i.e. BA, Table 4.3). From 0 to 400 cm², tree growth (i.e. BAI) strongly increased with size of trees (i.e. BA) but beyond 400 cm² tree growth was only slightly affected by tree size (Table 4.3 and Figure 4.2a). Considering interactions within the model, BAL had a strong negative effect on BAI once trees were grafted (Table 4.3 and Figure 4.2b). BAI of grafted trees was higher than BAI of non-grafted trees (i.e. BAI of G > BAI of NG) for BAL values ranging from 0 to 2000. When BAL was higher than 6000, BAI of grafted trees decreased below that of non-grafted trees (i.e. BAI of G < BAI of NG) meaning that under high BAL, BAI of grafted trees was lower than BAI of non-grafted trees.

Table 4.3: Output of the linear mixed-effects model testing the effect of the Basal Area (BA) and the interaction between competition index (BAL) and graft status (Status) on the annual Basal Area Increment (BAI) of grafted and ungrafted *Abies balsamea*. Trees, sites and years were fixed as random effects.

Parameters	Basal area increment		
	Estimates	Std. Errors	P value
(Intercept)	3.062	0.240	***
Status (G)	1.975	0.430	***
BAL	-0.175	0.042	***
BA	0.802	0.017	***
BAL × Status (G)	-0.529	0.116	***

Note: Parameters, estimated coefficient, standard errors (Std. Errors) and P values of the model are shown. (P values = ***: $P < 0.001$).

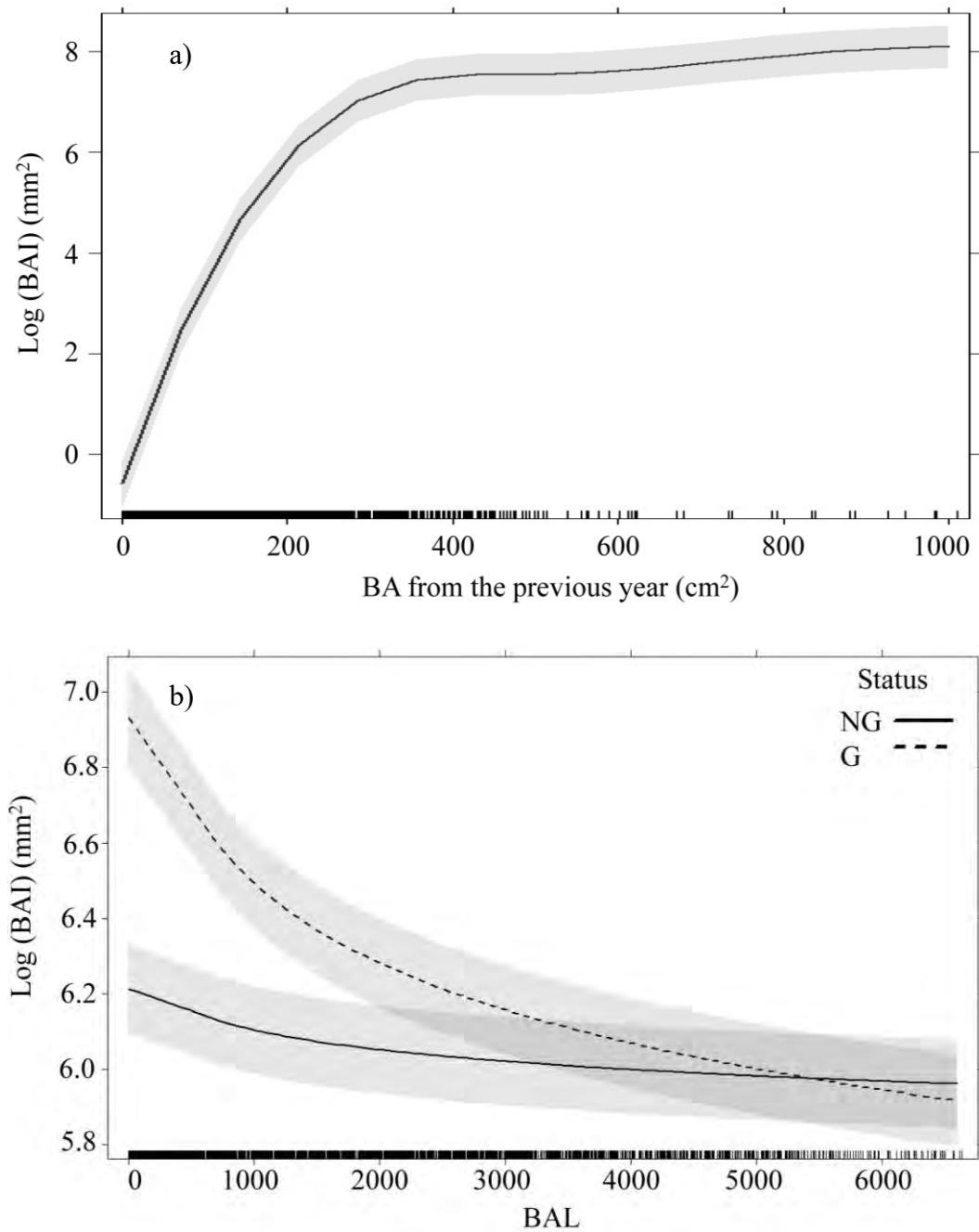


Figure 4.2: Predicted effects of: a) Basal Area (BA), b) the interaction between Basal area of the larger tree (BAL) and graft status (Status) on *Abies balsamea* annual Basal Area Increment (BAI). G: Grafted, NG: Non-grafted. 95% confidence intervals are highlighted in grey. Black straight lines are data and $N = 110$.

4.6 Discussion

This study is the first to evaluate the interaction effect between root grafting and intraspecific competition on tree growth. Our results showed that intraspecific competition decreased tree growth, and that growth reduction was more pronounced for grafted trees. We thus reject our hypothesis that root grafting makes trees better competitors than non-grafted trees.

Future grafted trees had better growth rate than trees that would never form root grafts, suggesting that they were the most productive trees within a stand (Figure 4.1). Several studies have shown that root grafting primarily occurs between larger trees within a stand (Gaspard and DesRochers, 2020; Tarroux and DesRochers, 2010). To explain this effect, it had been suggested that roots of larger trees have more chance to cross and fuse (Armson and Driessche, 1959; Reynolds, 1982). Moreover, common root systems established between grafted trees are known to increase the coverage area of roots, thus increasing stand efficiency to exploit soil resources and increase growth rates of trees (Basnet *et al.*, 1993; Bormann, 1966b; Loehle and Jones, 1990; Tarroux and DesRochers, 2010). However, we showed that once grafted, there was a negative effect of root grafting with intraspecific competition, while non-grafted trees were less affected by intraspecific competition (Figure 4.2b). The better performance of BAL competition index in our model reflected that both asymmetric (i.e. competition for light) and symmetric competition (i.e. competition for soil resources, Schwinning and Weiner, 1998; Wykoff *et al.*, 1982) negatively affected balsam fir growth (Tables 4.2 and 4.3, Figure 4.2a) even if (i) it is a shade tolerant species with a strong crown morphological plasticity adapted to dark environments (Baker, 1949; Duchesneau *et al.*, 2001) and (ii) soil resources could be directly redistributed among trees through root grafting. The Hegyi competition index was nevertheless selected as the best predictor of BAI for the single variable models (Table 4.2). The BAL competition index was then selected as the best predictor of BAI for the two or three variables models (Table 4.2). Once basal area of trees was included into the models,

the BAL competition index performed better than the Hegyi competition index to explain BAI (Table 4.2), suggesting that the part of model variance explained by Hegyi competition index was mainly due to the fact that it integrated tree size. As the Hegyi competition index also includes distance between trees, our results suggest that tree proximity was not an important predictor of tree growth and intraspecific competition. This was confirmed by the fact that the best model selected to explain tree growth included BAL, a distance-independent competition index. This suggests that competition between trees was more driven by tree size than by tree proximity. As distance-dependent indices include spatial arrangement of trees, they are often more efficient for describing the effects of competition on tree growth in natural and heterogenous stands (Contreras, 2011; Prevosto, 2005). However, several studies, including ours, showed that distance-independent indices performed universally better for tree growth modelling (Biging and Dobbertin, 1995; Helluy *et al.*, 2020; Stadt *et al.*, 2007).

The significant interaction between BAL competition index and root grafting status indicates that effect of root grafting on growth was highly related to intraspecific competition. However, predictions of interaction model showed that at low to moderate intraspecific competition, growth of grafted trees was greater than growth of non-grafted trees while it was the reverse at high levels of intraspecific competition (Table 4.3 and Figure 4.2b). Above the value of 5000 BAL corresponding approximatively to a stand density of 12500 stems ha⁻¹, growth of grafted tree was lower than growth of non-grafted trees (Table 4.3 and Figure 4.2b).

Slower growth indicates a reduced vigor and a greater sensitivity to disturbances in grafted trees under high intraspecific competition. Within two grafted trees, the one with the larger crown and higher evapotranspiration rate probably has a greater ability to divert resources from the communal root system; hence under intraspecific competition, the translocation of resources to smaller trees might be very limited or null (Bormann and Graham, 1960; Eis, 1972; Loehle and Jones, 1990). Sharing a common root system may thus be a constraint to tree growth under highly stressful conditions, especially for the smaller members of a union (Eis,

1972). Within grafted trees, when intraspecific competition is low, the smallest trees may benefit from resources through root grafting, but when competition intensifies, these resources are no longer redistributed and this affects growth of the smallest trees. At early stages of balsam fir stand development, tree size and growth are constrained, and they release later when canopy gaps arise (Morin and Laprise, 1997; Ruel *et al.*, 2003). As intraspecific competition among balsam fir stands was mainly driven by tree size, greater competition pressure might occur later when trees are larger. Thus, under moderate intraspecific competition, delayed root grafting might partially explain the delayed self-thinning of balsam fir stands under high-density of trees. Since root grafts allow the translocation of substances through the phloem (Graham, 1960), phytohormones implicated in apical dominance may be translocated between interconnected trees (Schier, 1972). Larger trees may thus send signals to smaller trees, reducing growth and stimulating the self-thinning of stands as the proportion of root-grafted trees increases with stand development. This hypothesis is supported by the fact that when the trees were independent (i.e. BG), their growth was higher but once they were grafted the negative effect of competition on growth was rapid and marked (Figure 4.2b). A parallel can be drawn with trembling aspen (*Populus tremuloides*) stands, that were initially very dense with stems that are closely interconnected through parental roots (DesRochers and Lieffers, 2001; Jelinkova *et al.*, 2009); These stands usually undergo a very rapid and heavy self-thinning (Brown and DeByle, 1987). At graft initiation, balsam fir trees were 38 years old on average (Quer *et al.*, 2020), which might explain why the effect of competition occurred later in stand development compared to aspen stands where trees are interconnected right from stand initiation (Schier, 1972).

In conclusion, this study is the first to demonstrate that root grafting decreased tree growth with increasing intraspecific competition. These results support the idea that root grafting allows trees to respond (and compete) as a group rather than as individual stems and forces us to reconsider traditional forest stand dynamics concepts such as competition, dominance and succession. This is important not only for the fundamental science aspect of it, but also because these findings influence

the way that the forest should be managed. As intraspecific competition was mainly driven by tree size and root grafting that occurred tardily in balsam fir stand development, we suggest that apical dominance may be implicated in this effect and that it could explain the delayed self-thinning of balsam fir stands. Further studies on phytohormone translocation between grafted trees could help us better understand the ecological significance of root grafting in forest stands dynamics.

4.7 Conclusion

In conclusion, this study is the first to demonstrate that root grafting decreased tree growth with increasing intraspecific competition. These results support the idea that root grafting allows trees to respond (and compete) as a group rather than as individual stems and forces us to reconsider traditional forest stand dynamics concepts such as competition, dominance and succession. This is important not only for the fundamental science aspect of it, but also because these findings influence the way that the forest should be managed. As intraspecific competition was mainly driven by tree size and root grafting that occurred tardily in balsam fir stand development, we suggest that apical dominance may be implicated in this effect and that it could explain the delayed self-thinning of balsam fir stands. Further studies on phytohormone translocation between grafted trees could help us better understand the ecological significance of root grafting in forest stands dynamics.

4.8 Speculations

Since root grafting is of common occurrence in balsam fir stands, there are likely other benefits to being grafted to a neighbor, that may not be directly reflected in individual tree growth. These benefits are probably the evolutionary agents that lead to the selection for the enhanced formation of root grafts (Keeley, 1988). We assumed that the ecological significance of root grafting was based on resource translocation between trees but it could also be based on its structural role by improving mechanical support for trees and their root systems (Dosen and Iyer,

1979; Stokes *et al.*, 1995). Balsam fir is the main host of spruce budworm (*Choristoneura fumiferana* Clem.; Morin *et al.*, 1993), and outbreaks promote higher rates of wind-related mortality by increasing wind penetration in the stand (Taylor and MacLean, 2009). Thus, in post outbreak stands root grafting may increase tree stability and constitute a benefit to being grafted to a neighbor.

Root grafting could also help trees indirectly “control” their environment by maintaining neighboring trees through root grafts; when suppressed trees die, canopy gaps occur and other opportunist species could take the available space such as following severe and repeated spruce budworm outbreaks where the canopy becomes sparse. A change in the direction of succession may occur and lead to the dominance of other tree species if they successfully establish in the open spaces left by dead balsam fir trees (Bouchard *et al.*, 2006; Sainte-Marie *et al.*, 2014). However, when dominant trees are grafted to suppressed neighbors or to live stumps, their root systems continue to occupy the soil leaving no space for invasion (Loehle and Jones, 1990). Root grafting may thus reduce inter-specific competition for water, minerals or light if other trees species are not able to establish (Levy-Yadun, 2011). This could be seen as a cooperative relationship to ensure that soil resources of a site remain within the species (Tarroux and DesRochers, 2010).

4.9 Acknowledgements

The research was funded by a Natural Sciences and Engineering Research Council discovery grant to AD. We are grateful to Elizabeth Turcotte and Etienne Poisson for their assistance with data collection and fieldwork. We also thank Hermine Nguena, Philippe Marchand for their technical support in statistical treatment of the data and Bernard Prévosto and Frédéric Guibal for their advice during the writing of the manuscript.

CHAPITRE V

DÉTERMINISME CHIMIQUE DES GREFFES RACINAIRES CHEZ LE SAPIN BAUMIER

Ce chapitre est en préparation pour *Journal of Chemical Ecology*.

Investigation of a potential chemical determinism of root grafting.

E. Quer^{ac*}, T. Michel^b, A. DesRochers^c, V. Baldy^a.

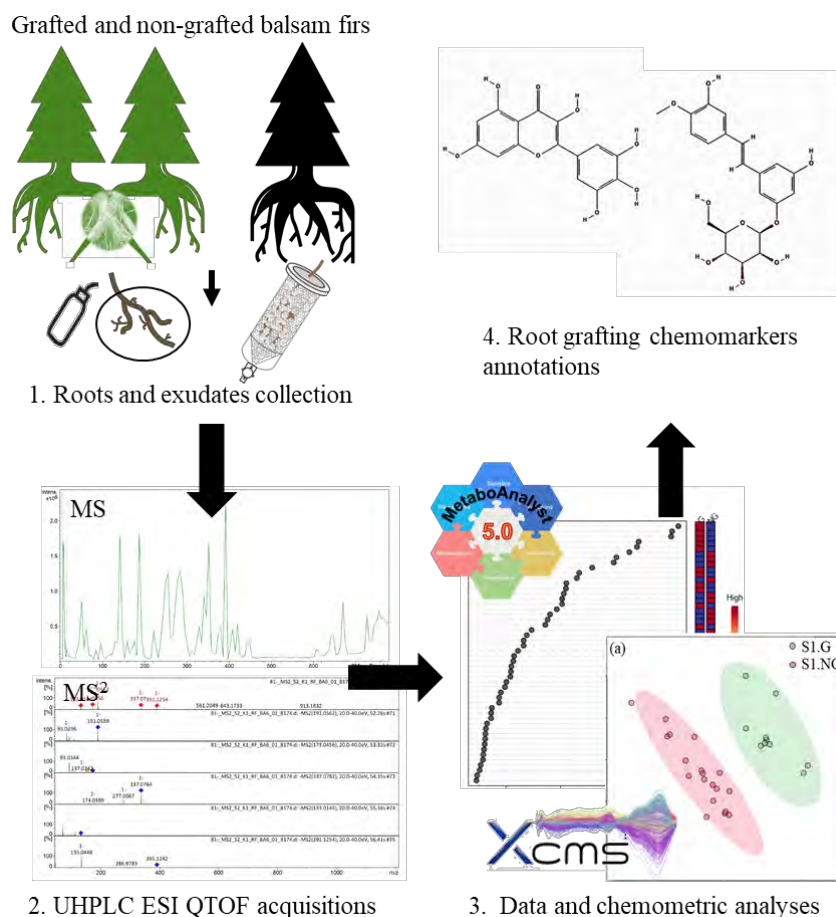
(a) Aix Marseille Université, IMBE, Avignon Université, CNRS, IRD, 3 place Victor Hugo 13331, Marseille, France.

(b) Université Côte d'Azur, CNRS, Institut de Chimie de Nice, UMR 7272, Parc Valrose, 06108 Nice Cedex 2, France

(c) Université du Québec en Abitibi-Témiscamingue, IRF, 341 rue Principale Nord, J9T 2L8, Amos, Québec, Canada.

*Corresponding author: elodie.quer@imbe.fr

Graphical abstract



Highlights

- The chemical composition of roots and exudates from grafted and non-grafted trees were analysed by using untargeted metabolomic (UHPLC-ESI-QTOF).
- Metabolomic profiles of balsam fir roots and exudates differed between grafted and non-grafted trees.
- The main chemomarkers of root grafting were phenols, terpenoids and their derivatives.
- Stilbenoids (e.g. rhaponticin), flavonoids (e.g. prodelphinidins) and their derivatives detected respectively in roots and exudates of non-grafted trees could potentially inhibit root grafting.

5.1 Résumé

Les racines de différentes espèces d'arbres peuvent fusionner pour former des greffes naturelles (i.e. anastomoses) permettant le transfert d'eau, de nutriments et de produits de la photosynthèse entre les individus. Il est encore mal compris pourquoi des greffes racinaires se forment chez certains arbres alors qu'elles sont absentes chez d'autres, malgré leurs racines fortement entremêlées. Notre hypothèse est que les arbres libèrent par leurs racines des composés allélopathiques dans la rhizosphère pouvant faciliter ou inhiber les contacts racinaires et la formation des greffes racinaires. Nous avons étudié la composition chimique des racines et des exsudats issus de sapins baumiers (*Abies balsamea*) greffés et non-greffés en utilisant la métabolomique non ciblée (i.e. chromatographie liquide à haute performance). Un total de 90 échantillons de racines fines (i.e. 3 sites x (20 arbres greffés + 10 arbres non-greffés)) et de 108 échantillons d'exsudats (i.e. 3 sites x 3 réplicats x (6 arbres greffés + arbres non-greffés)) a été collecté et analysé. Nous avons développé et utilisé un système de cuvette pour collecter les exsudats solubles sur le terrain. Les profils métabolomiques des racines et des exsudats étaient différents entre les arbres greffés et non-greffés. Les principaux marqueurs chimiques détectés dans les racines et les exsudats étaient des composés phénoliques, des terpénoïdes et leurs dérivés. Les stilbènes (e.g. rhaponticine), les flavonoïdes (e.g. prodelphinidines) et leurs dérivés, détectés respectivement dans les racines et les exsudats d'arbres non-greffés, pourraient potentiellement inhiber la formation de greffes racinaires. La méthode analytique utilisée n'a pas permis de détecter des composés pouvant stimuler la formation de greffes racinaires. Les métabolomes des racines et des exsudats de sapins baumiers semblaient fortement liés aux caractéristiques physico-chimiques des sols des sites étudiés. Ces résultats reflètent la complexité d'étudier *in situ* la chimie des racines et des exsudats d'arbres matures. Cette étude est la première preuve d'un potentiel déterminisme chimique des greffes racinaires.

Mots clés : Greffes racinaires, Anastomoses, *Abies balsamea*, Forêt boréale, Exsudats racinaires, Eco- métabolomique.

5.2 Abstract

Roots of several tree species can fuse to form natural root grafts (i.e. anastomosis) allowing the redistribution of water, nutrients and photosynthates between individuals. It is poorly understood why some trees form root grafts while others do not, despite their intimately intertwined roots. Our hypothesis is that trees release allelopathic compounds in the rhizosphere limiting or facilitating root contacts and thus root grafting. We analysed the chemical composition of roots and exudates from grafted and non-grafted balsam firs (*Abies balsamea*) by using untargeted metabolomics (i.e. Ultra High Performance Liquid Chromatography). A total of 90 samples of fine roots (i.e. 3 sites x (20 grafted trees + 10 non-grafted trees)) and 108 samples of root exudates (i.e. 3 sites x 3 replicates x (6 grafted trees + 6 non-grafted trees)) was collected and analysed. We developed and used a culture-based cuvette system for root exudation collection in the field. Metabolomic profiles of balsam fir roots and exudates differed between grafted and non-grafted trees. The major chemomarkers detected in roots and exudates were phenols, terpenoids and their derivatives. Stilbenoids (e.g. rhaponticin), flavonoids (e.g. prodelphinidins) and their derivatives detected respectively in roots and exudates of non-grafted trees could potentially inhibit root grafting. The analytical method used did not detect any compounds that could stimulate root graft formation. The metabolomes of balsam fir roots and exudates could be strongly linked to the physico-chemical characteristics of the soils of the sites studied, which reflected the complexity of studying the chemistry of mature and *in situ* tree roots and exudates. This study is the first evidence of a potential chemical determinism of root grafting.

Key words: Root grafting, Anastomosis, *Abies balsamea*, Boreal forest, Root exudates, Plant eco-metabolomic.

5.3 Introduction

A root graft (i.e. anastomose) is a morphological union of cambium, xylem and phloem at the point of contact between two or more roots that were initially distinct (Loehle and Jones, 1990). Intraspecific root grafting is common across tree species (i.e. reported in 150 species, Bormann and Graham, 1966) and can be found in more than 60% of trees in natural stands (Basnet *et al.*, 1993). Ecological importance of root grafting relies on the establishment of common vascular systems enabling the redistribution of water, photosynthates or nutrients between interconnected trees (Bader and Leuzinger, 2019; Fraser *et al.*, 2006; Klein *et al.*, 2016). Recent studies reported probable benefits of root grafts for trees and suggested that evolutionary agents selected for enhanced formation of root grafts (Lev-Yadun, 2011). For instance, it was demonstrated that root grafting, by facilitating resource redistribution within groups of grafted trees, reduced negative effects of environmental stresses on growth (e.g. periodic drought and insect outbreaks) (Adonsou *et al.*, 2016c) and also limited windthrow by increasing mechanical stability of trees (Basnet *et al.*, 1993). Although root grafting is often associated to facilitative interactions, root graft formation is an energetically costly process and can increase the risk of pathogen transmission (Baric *et al.*, 2008; Epstein, 1978; Tarroux and DesRochers, 2010). There are also examples of negative effects of root grafting on tree growth when their partner is removed or dies (Eis, 1972; Tarroux *et al.*, 2010). Thus, it becomes necessary to better understand the processes of root graft formation in order to better predict their influence on forest stand dynamics. Several factors including stand age and density (Fraser *et al.*, 2005), root depth and morphology (Küllä and Löhmnus, 1999), soil properties (Tarroux and DesRochers, 2010), genetic distance (Loehle and Jones, 1990), and tree proximity (Gaspard and DesRochers, 2020; Quer *et al.*, 2020) have been demonstrated to affect root grafting occurrence. However, processes by which some species form many root grafts (e.g. *Pinus resinosa* Ait.) while other species form few or none (e.g. *Larix laricina* (Du Roi) K. Koch) are poorly known (Larue, 1952). Moreover, not all roots that cross from grafts, and Eis (1972) and Tarroux and DesRochers (2011) showed that roots

of a tree could cross the root systems of several neighboring trees before forming root grafts with tree further away. It has been suggested that chemical communication between tree roots could promote or inhibit root contacts and thus root graft formation. For instance, Reinartz and Popp (1987) hypothesized that black walnut (*Juglans nigra* L.) and Northern prickly-ash (*Zanthoxylum Americanum* Mill.) would not form grafts because they produced a chemical inhibitor (e.g. juglone) in the soil that limited root contacts.

Tree roots continuously release chemical compounds into the rhizosphere through exudation, root decomposition processes and leachates (Bais *et al.*, 2004, 2001). Roots and exudates contained a large variety of compounds including low-molecular-weight primary metabolites (e.g. saccharides, amino acids and organic acids) and secondary metabolites (i.e. phenolics, flavonoids and terpenoids) (Flores, 1999; Gargallo-Garriga *et al.*, 2018; Uren, 2000). Each of these chemical compounds, alone or in combination, can mediate various biotic interactions in the rhizosphere including root-root, root-insect, and root-microorganisms interactions (Bertin *et al.*, 2003; Mommer *et al.*, 2016). Root-root interactions in soils mediated by chemical traits generally refer to allelopathy (De Kroon, 2007; Rice, 2012). Allelopathy is defined as “the interactions by plant chemicals between spatially separated plants” (Inderjit *et al.*, 1994). Most of allelopathic interactions rely on the production of Plant Secondary Metabolites (i.e. PSMs) that affect the development of neighboring plants, mainly germination or root and shoot growth (Macias *et al.*, 2003; Nardi *et al.*, 2000; Pavlović *et al.*, 2014). In this study we focus on positive or negative interactions that can promote or inhibit root contacts and therefore root grafting.

In forest stands, autotoxicity and autoinhibition can lead to inhibition of root growth within individuals of the same species (Falik *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2008). For instance, Norway spruce (*Picea abies* K.) releases numerous phenolic acids and tannins with phytotoxic properties through root exudates (Gallet and Pellissier, 1997). Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) autotoxicity is induced by phenolic compounds and terpenoids that can be released from root decomposition and

leachates (Chomel *et al.*, 2014; Fernandez *et al.*, 2008). Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook) exudates contained an allelochemical cyclic dipeptide inducing a strong autoinhibition of roots growth (Chen *et al.*, 2014; Kong *et al.*, 2008). Positive root-root interactions enhancing tree growth often involve PSMs promoting beneficial microbial colonization on root surfaces (Haichar *et al.*, 2014; Mommer *et al.*, 2016). It has also been suggested that positive interactions can occur directly by the release of growth facilitating compounds or compounds simulating the action of growth regulators in the rhizosphere (e.g. biotin, choline and vitamins) (Bais *et al.*, 2006).

In this paper we tried to elucidate if chemical signatures of roots and their exudates influence root graft formation, aims of this study were: (i) to determine if chemical signature of balsam fir roots and exudates differ between grafted and non-grafted trees, (ii) to detect metabolites driving these differences and to investigate if they could promote or inhibit root grafting.

For this purpose, we analyzed the metabolome of *in situ* collected roots and exudates from grafted and non-grafted trees of a dominant coniferous species in the boreal forest of Quebec (Canada), balsam fir (*Abies balsamea* Mill. (L.)). This species is known to produce many root grafts (36% of grafted trees in stands on average; Quer *et al.*, 2020). Metabolomic approach allows: i) to obtain a global overview of the chemical compounds (i.e. metabolites) contained in a sample (i.e. fingerprinting), ii) to point out metabolomic differences among a large number of observed metabolites, iii) to detect metabolites (i.e. chemomarkers) responsible for these differences (van Dam and Bouwmeester, 2016; van Dam and van der Meijden, 2011). Metabolomic techniques have recently been used to investigate the composition of exudates in great detail and important compounds mediating plant-microorganism, plant-insect and plant-plant interactions but also plant responses to stress (Gargallo-Garriga *et al.*, 2018; van Dam and Bouwmeester, 2016; Walker *et al.*, 2003). However, very little is known about root exudates metabolites involved in root-root interactions and even less about metabolites found in roots themselves (De Kroon, 2007; Mommer *et al.*, 2016), although the chemical composition of fine

roots determines the composition of the exudates (Bais *et al.*, 2001; Flores, 1999; Weinhold *et al.*, 2020).

5.4 Material and methods

5.4.1 Study sites

Study sites were located in the balsam fir-white birch (*Betula papyrifera* Marsh.) bioclimatic domain of Quebec boreal forest in Abitibi- Témiscamingue (Grondin *et al.*, 1998). The average annual total precipitation for the region is 929 mm (253 mm of snow and 675 mm of rain) with a daily temperature of 1.5 °C and an average of 2366 degree-days above 0 °C (Climate normal 1981-2010, Environment and Natural Resources Canada, 2018). The region is a part of the Ontario-Quebec clay belt characterized by post-Wisconsinian lacustrine deposits (Canadian Agricultural Services Coordinating Committee, 1998; Vincent and Hardy, 1977). The three sites were located near the Lake Duparquet Research and Teaching Forest (Figure 5.1): Site 1 (48°31'19.56"N, 79°27'54.00"O), Site 2 (48°31'8.40"N, 79°25'1.20"O) and Site 3 (48°26'7.80"N, 79°25'33.60"O). We selected monospecific, healthy, naturally regenerated. The minimum average age of the stands was estimated at 50 years old. Root and exudate collection areas covered on average 0.55 ha (Annexe C, Figures C.1., C.2. and C.3.).

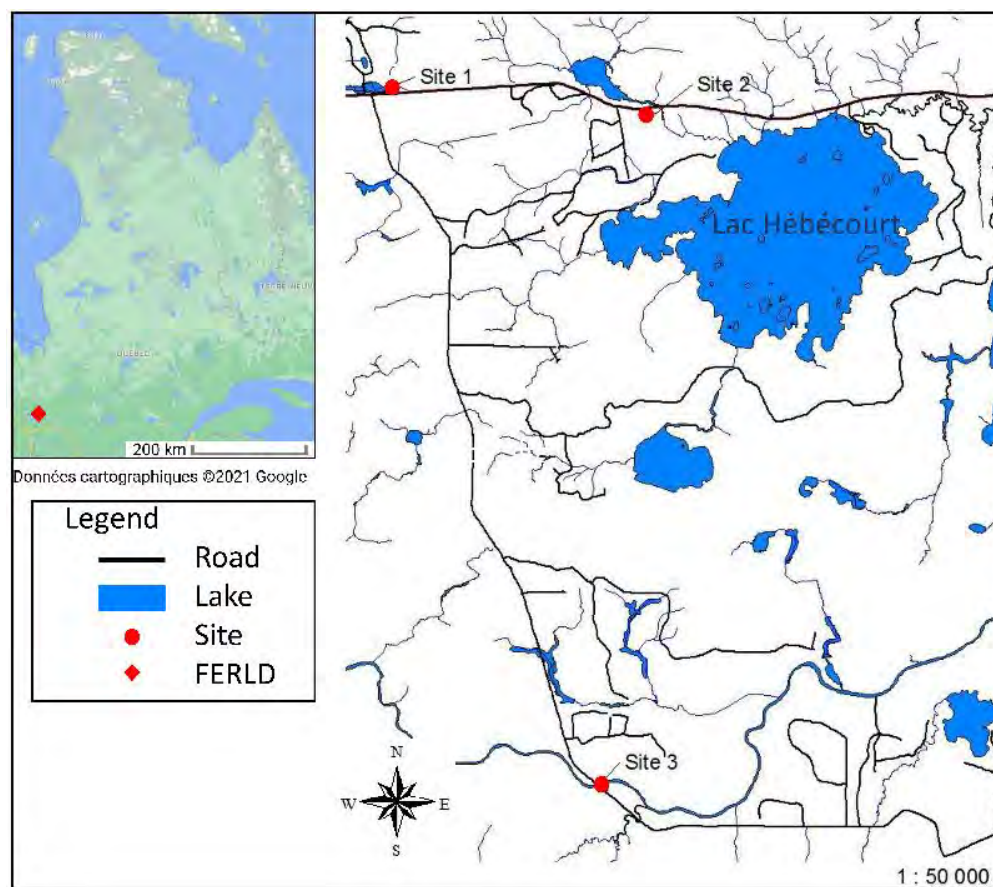


Figure 5.1: Location of the study sites.

5.4.2 Tree and root selection

Fieldwork was carried out in July 2019. Root collection was conducted on 10 pairs of grafted trees (i.e. 20 trees) and 10 non-grafted trees in each site. Exudate collection was conducted on 3 pairs of grafted trees (i.e. 6 trees) and 6 non-grafted trees in each site (Annexe C, Figures C.1., C.2. and C.3.). Root grafts could not be collected to determine if they formed a complete morphological union identified by a common growth ring between the two grafted roots (Bormann and Graham, 1966). Thus, potential grafted trees were selected following 3 criteria maximizing probability to select “true grafted trees” in the field according to Quer *et al.* (2020). The selected trees were less than 30 cm apart, the diameter of the grafted roots was at least 8 cm, potential grafts were formed by the encounter of two main lateral roots and near the stumps (< 30 cm). As maximum distance observed between two

grafted balsam firs was about 2 m (Quer *et al.*, 2020), non-grafted trees were selected at least 3 m away from their nearest neighbor. For each tree selected in the field, we traced and progressively excavated by hand 3 main woody roots. Fine roots and exudates samples were randomly collected along lateral roots derived from these, within a 2 m radius of the trunk and at the interface between the O and A horizons (between 0 and 30 cm soil depth).

5.4.3 Fine root sampling, preparation and extraction

A total of 90 samples of fine roots was collected (i.e. 3 sites x (20 grafted trees + 10 non-grafted trees)). For each tree, approximately 100 g of fine roots (diameter < 1 cm) was carefully excavated, rinsed with distilled water and collected. Each sample was frozen and stored at -80°C in the laboratory then freeze-dried (Lyovac GT2) and ground into powder during 30 s at room temperature (MM 400, Retsch, Germany) for chemical analysis.

A total of 200 mg of root powder of each sample were extracted in 4 mL of MeOH (100%), followed by an ultrasound bath for 3 min at room temperature. The obtained extract was then filtered for metabolomic analysis (PTFE, 13 mm, 0.22 µm, Restek®, USA).

5.4.4 Root exudate sampling preparation and extraction

A total of 108 samples of root exudates was collected (i.e. 3 sites x 3 replicates x (6 grafted trees + 6 non-grafted trees)) by using a culture-based cuvette system, developed for field use by Phillips *et al.* (2008) (Figure 2.6). Firstly, terminal fine root systems (diameter < 5 mm with laterals 10-15 cm in length) were made easily accessible for collection of exudates. The roots were carefully excavated by hand and cleaned from adhering soil by using distilled water and fine forceps. Fine roots were then placed during 24 h for a period of recovery from any potential injury in a moist wipe paper (Kimwipe®) containing sieved excavated soil and covered with a 2 cm layer of litter. The next day, sieved soil was easily removed with distilled

water before placing roots into the cuvette system. Finally, each terminal fine root systems were placed into cartridges (50 mL empty Solid Phase Extraction cartridges equipped with a 20 μ m frits, Agilent®) gently filled with sterilized glass beads (diameter = 1 mm, mass~125 g per cartridges) to simulate soil and 25 mL of distilled water to keep humidity during the incubation period. Cuvettes were sealed around the roots using Parafilm® to prevent the upper excavated root segments from desiccation, a moist paper wipe was placed around it and secured with Parafilm®. Three cuvettes without roots were installed at each site as negative controls. The cuvettes were then wrapped in foil and reburied in soil and covered by litter. After a 72 h incubation period, the solution containing exudates was collected and filtered at 20 μ m. The collection of exudates was realized by using a syringe (60 mL). Exudates were then stored in brown glass vials (60 mL), frozen at -80°C and freeze-dried (Lyovac GT2). A total of 6 mg of exudate powder from each sample was extracted in 1 mL of water (100%), followed by an ultrasound bath for 3 min at room temperature. Exudate extracts were ultracentrifuged (14000 g, at room temperature during 5 min) and the supernatant was collected and filtered for metabolomics analysis (PES, 13 mm, 0.22 μ m, Restek®, USA). Exudate samples from site 3 were finally excluded from the analyses due to insufficient amounts once freeze-dried.

5.4.5 Fine roots and exudates chemical analysis

5.4.5.1 Metabolomic analyses

Data acquisition

Metabolomic analyses were performed on the MALLABAR platform Marseille (funded by the CNRS, the Provence Alpes Côte d'Azur Region, the TOTAL Foundation and ANR). Metabolomic analyses were realised with an UHPLC instrument (Dionex Ultimate 3000, Thermo Scientific®, USA; equipped with an RS pump, an automatic sampler, a thermostated column compartment and a UV diode array) associated to an accurate mass spectrometer (Quadrupole Time of

Flight, QTOF) equipped with an Electrospray Ionisation Source (ESI; Impact II, Bruker Daltonics®, Germany).

Separation of the metabolites by UHPLC was carried out using a Luna® Omega Polar C18 column (2.1 mm× 100 mm, 1.6 µm, Phenomenex®). The elution rate was set-up at 0.5 mL/min at 45°C. Chromatographic solvents were composed of water + 0.1 % formic acid and acetonitrile + 0.1 % formic acid. Chromatographic gradients parameters are detailed in supplementary material (Annexe C, Table C.1.). For root extracts analyses, MS detection was performed in both negative and positive ionisation mode. Because the negative mode gave a better sensitivity for root exudates analyses, mass spectra were recorded in this ionization mode. MS parameters are detailed in supplementary material (Annexe C, Table C.1.).

A pooled sample consisting of a mixture of each sample was used as a quality control sample and to determine chromatographic method and injection volume. The samples were injected randomly, including a pooled sample every six samples, allowing an assessment of MS shift over time and data normalization. Blanks were also injected to remove background related features. The injection volume for root extracts was 0.05 µl (negative mode) and 0.5 µl (positive mode). The injection volume for exudate extracts was 5 µl (negative mode). Analyses were recorded at an acquisition frequency of 2 Hz for root extracts and of 4 Hz for exudates. The mass range was set from m/z 50 to 1200.

MS² were acquired according to the same parameters but injection volumes for root extracts were set as 0.5 µL (negative mode) and 2 µL (positive mode). MS² experiments were carried out with a collision energy set to 40 eV.

Data analyses

The acquired MS based metabolomic data were calibrated automatically by internal calibration with a formate/acetate solution (see supplementary material for calibration solution composition, Annexe C, Table C.1.) before exporting data in netCDF files (centroid mode) by using Bruker Compass DataAnalysis 4.3.

Analysis files were then processed with XCMS software (Smith *et al.*, 2006) under R software version 3.5.1 (R core team, 2019), following different steps to generate the final data matrix: (1) Peak picking (peak width = c (2,20), ppm = 2) without threshold prefilter (Patti *et al.*, 2012); (2) correction of the retention time (method = "obiwarp"), (3) grouping (bw = 10, minfrac = 0.3, minsamp = 1), (4) Fillpeaks, and then (5) report and generate the data matrix transferred to Excel. To remove technical variability, the matrix was then filtered according to blanks and pooled samples in three steps by using in-house R scripts: (1) filtering the matrix using the Signal/Noise (S/N) ratio in order to remove peaks observed in blanks (S/N set at 10), (2) filtering the matrix using peaks coefficient of variation in order to remove peaks with variable intensities in pooled samples (threshold at 0.3), (3) filtering the matrix according to autocorrelation between peaks. A total of 2204 molecular ions were detected in the different type of extracts. The metabolites were annotated using a combination of accurate mass, isotope ratio, MS² fragmentation and public libraries (i.e. KNapSAcK, Dictionary of Natural Products, ChEBI, HMBD and PubChem, Wolfender *et al.*, 2015). The Bruker Compass DataAnalysis 4.3 software was also used to analyze and identify the compounds using MS and MS² spectra.

5.4.5.2 Total phenolic contents of fine roots

Total phenolics were measured colorimetrically according to Peñuelas *et al.* (1996) by using gallic acid as a standard. Fine root samples (0.25 g) were extracted in 20 ml of a 70% aqueous methanol solution, shaken for 30 min and then filtered (0.45 µm filter); 25 µl of filtered extract was mixed with 0.25 mL Folin-Ciocalteu reagent (Folin and Denis, 1915), 0.5 ml of saturated aqueous Na₂CO₃ (to stabilize the color reaction) and 4 ml of distilled water. After 30 min, the reaction was completed, and concentration of phenolics was measured at 765 nm on an UV/Vis spectrophotometer (Thermo Scientific®, Waltham, MA, USA). Quantitative results were expressed with reference to gallic acid.

5.4.6 Soil physico-chemical characteristics

At the base of each sampled tree, three soil samples were collected at the interface between the O and A horizons (between 0 and 30 cm in soil depth) and pooled into a composite sample. The physical and chemical analyses of soil were conducted by the Teyssier laboratory (Bordeaux, France). Cation Exchange Capacity (CEC), Total Organic Matter (TOM), pH, phosphorous (P, Olsen method), potassium (K), magnesium (Mg), calcium (Ca), sodium (Na), nitrogen (N), organic carbon (C), and soil texture (percentage of clay, silt and sand, standard pipette method) were analyzed from soil samples according to French and International standard methods, following NF X 31-130, ISO 10694, ISO 10390, ISO 11263, NF X 31-108, ISO 13878, NF X 31-107, respectively (AFNOR, 1995, 1998, 1999, 2003, 2005).

5.4.7 Statistical analysis

Statistical analyses were performed with R software version 3.5.1 (R core team, 2019). Data acquired in positive and/or negative modes were used to evaluate differences in metabolites composition of fine roots and root exudates according to root grafting status of the trees and sites. These differences were tested by using two factors PERMANOVAs (with 10^4 permutations, function “adonis” in package “vegan”; Dixon, 2003). Data were log-transformed prior to statistical analysis. The associated Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA, for fine roots and exudates) were performed by using MetaboAnalyst 4.0 (www.metaboanalyst.ca, Chong *et al.*, 2018). The 10 highest discriminating compounds according root grafting (chemomarkers or VIP: Variable Importance in Projection) for each site were identified according to the PLS-DA loading plots.

Differences in total phenolic content of fine roots according to sites and root grafting were tested by using two ways ANOVA followed by Tukey tests. A Principal Component Analysis (PCA) was performed with the FactoMineR package (Husson *et al.*, 2020) to analyse the differences in soil physico-chemical

characteristics according to the study sites. This analysis was followed by pairwise tests with a one factor PERMANOVA. Kruskal Wallis tests followed by pairwise Dunn tests were also used to check the differences of soil physico-chemical characteristics between sites.

5.5 Results

5.5.1 Metabolomic analysis

MS-based metabolomic analysis combined with multivariate data analysis (PLS-DA) showed a significant variation of roots and exudates metabolic fingerprints according to root grafting and sites (PERMANOVA, $P < 0.05$, Table Table 5.15.1). The site effect on metabolome of roots and exudates was highly significant and more marked than the root grafting effect for roots (PERMANOVA, $P < 0.001$, Table Table 5.15.1). Thus, we analysed separately metabolomic data by study sites (Figures 5.2 and 5.3), and observed that root metabolomes significantly differed according to root grafting in Sites 1 and 2 but not in Site 3 (PERMANOVA, $P < 0.05$, Figure 5.2). Similarly, the metabolome of exudates varied significantly as a function of root grafting for sites 1 and 2 (PERMANOVA, $P < 0.01$, Figure 5.3).

Table 5.1: Two-way PERMANOVA (10^4 permutations) performed on fine root and root exudate metabolomic data to discriminate effects of the root grafting status, the site and their interaction.

	Fine roots		Root exudates	
Factors	P-value	F	P-value	F
Root grafting	*	1.65	***	2.12
Site	***	2.44	***	3.11
Root grafting x Site	ns	-	ns	-

Note: ns: non-significant with $P > 0.05$, *: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$.

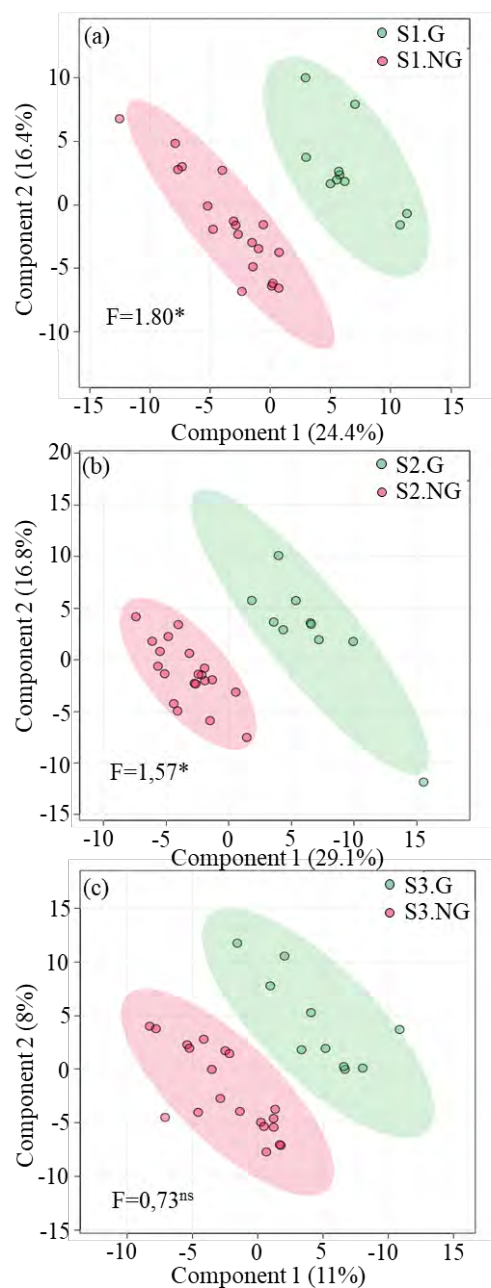


Figure 5.2: Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) on fine roots metabolic fingerprints according to the site (a: Site 1, b: Site 2, c: Site 3) and to the root grafting status of the trees (G: grafted, NG: non-grafted). One-way PERMANOVA (10^4 permutations) were performed on fine root metabolomic data to discriminate effects of root grafting status according to the sites. F values were represented with *: $P < 0.05$ and ns: $P > 0.05$.

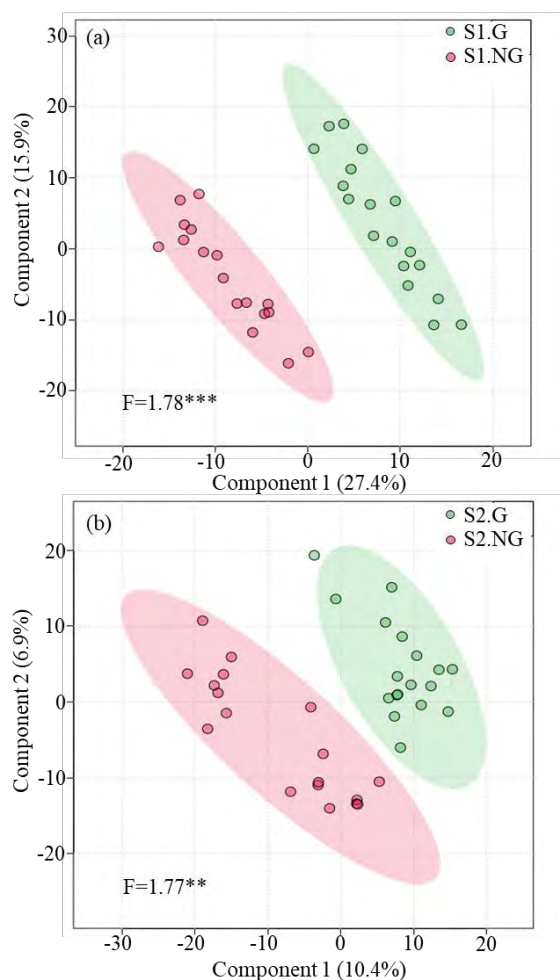


Figure 5.3: Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) on root exudate metabolic fingerprints according to the site (a: Site 1, b: Site 2) and to the root grafting status of the trees (G: grafted, NG: non-grafted). One-way PERMANOVA (10^4 permutations) were performed on root exudate metabolomic data to discriminate effects of root grafting status according to the site. F values were represented with **: $P < 0.01$ and ***: $P < 0.001$.

The 10 highest Variable Important in Projections (VIP) were annotated for fine root and exudate extracts according to the study sites (Tables 5.2 and 5.3). Comparison of VIP retention time revealed that chemomarkers were distributed over the entire chromatogram, suggesting a huge difference in terms of structure and polarity (Figure 5.4).

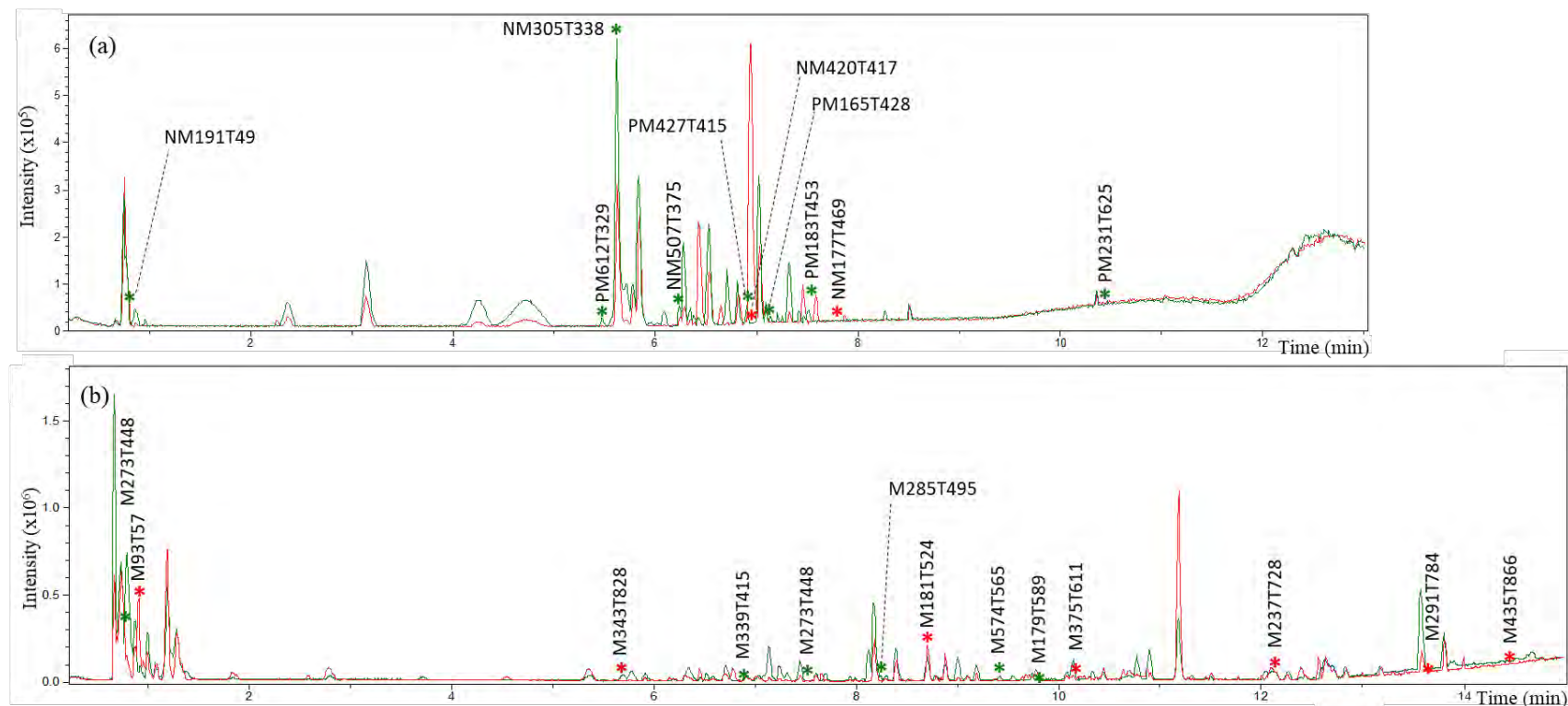


Figure 5.4: The base peak chromatograms of *Abies balsamea* root (a) and exudate (b) extracts from grafted (in green) and non-grafted trees (in red). The VIPs that we were able to annotate were marked with an *. UHPLC-ESI-QTOF was performed with a Luna® Omega Polar C18 column (2.1 mm× 100 mm, 1.6 μ m, Phenomenex®). Experimental spectrums are represented in negative mode (ESI-).

5.5.1.1 Root grafting chemomarkers of fine roots

PM612T329 in root samples of grafted trees was detected at m/z 611.1416. Its MS² fragmentation exhibited ions at m/z 425.0870 and 287.0547 typical of proanthocyanidins (Friedrich *et al.*, 2000). Based on literature, this compound could correspond to a prodelphinidin, a condensed tannin already described in *Abies* bark extract (Bianchi *et al.*, 2014; Leviansky *et al.*, 2019). PM231T625 was detected at m/z 231.1381 in roots from grafted trees. According to its elemental composition and its MS² information, it could be a germacrane sesquiterpenoids such as furanodienone (characteristic from conifer, Otto and Wilde, 2001). PM183T453 (m/z 182.5753) in root samples of grafted trees, could be annotated as a diterpene such as gibberelin A42 or gibberilin A83, as well as diterpene like taxicin I. Similarly, NM507T375 (m/z 507.1877) could be annotated as glycosided compound such as gibberellin A3 O- β -D-glucoside but the fragmentation does not produce typical loss of sugar unit. MS² spectra of PM427T415 (m/z 427.3083) showed fragment ions at m/z 265.1432 and m/z 247.1327 associated to a loss of glucose (-162 Da) and a loss of water (-18 Da). This fragmentation pattern could correspond to abscisic acid β -D-glucopyranosyl ester or a sesquiterpene glycoside according to the dictionary of natural products. NM420T417 (m/z 419.1347) was found in roots of non-grafted trees. Its MS² fragmentation exhibited the loss of a hexose unit (-162 Da), it could potentially belong to stilbenoids (e.g. rhaponticin or isorhapontin) or other glycosilated compound. NM305T338 (m/z 305.0664) and NM191T49 (m/z 191.0562) were detected in roots of grafted trees. Similar fragmentation patterns were found in the literature for each of these chemomarkers corresponding to galocatechin or epigallocatechin isomer (Yuzuak *et al.*, 2018) and isocitric acid (Masike *et al.*, 2017) respectively.

Interestingly several chemomarkers detected in root and exudate extracts were putatively associated to lignin. M179T589 (m/z 179.0715) found in exudates of grafted trees could be annotated as coniferol corresponding to a monolignol. NM177T469 and PM179T469 found in roots of non-grafted trees and detected at

m/z 177.0558 in negative mode and m/z 179.0702 in positive mode can be associated with same compound. It could correspond to an intermediate of lignin biosynthesis such as coniferaldehyde but also as an isoferulaldehyde or methoxycinnamic acid.

5.5.1.2 Root grafting chemomarkers of root exudates

Based on their elemental composition and their MS² information, several root chemomarkers in exudates from non-grafted trees could correspond to phenolic compounds: M93T57 (m/z 93.0340); M237T728 (m/z 237.0767) was putatively annotated as methyl ether, methyl sinapate or 3,4,5-trimethoxycinnamic; M181T524 (m/z 181.0156) was potentially an acid syringaldehyde or a methyl vanillate. M339T415 (m/z 339.0715) detected in exudates of grafted trees was assigned as sinapoyl malate or sinapic acid malate ester. M273T448 (m/z 273.0395) and M317T452 (m/z 317.0295) from exudate samples of grafted trees had similar fragmentation patterns and retention times suggesting the same chemomarker. Fragment ions at m/z 273.0407 and m/z 229.0499 could correspond to a double loss of CO₂ (-44 Da) typical from a flavonol (Fabre *et al.*, 2001). This fragmentation pattern associated to the proposed molecular formula C₁₅H₁₀O₈ could correspond to myricetin, a flavonol observed in several members of the *Pinaceae* family including *Abies* species (Mbakidi-Ngouaby, 2017). M343T828 (m/z 343.0118) and M285T495 (m/z 285.0798) could be identified as flavonoid derivatives according to databases (dictionary of natural products and ChEBI) nevertheless, without fragmentation spectra, their annotation remained complicated. M375T611 (m/z 375.2766), M574T565 (m/z 573.2552), M435T866 (m/z 435.2586), M437T876 (m/z 437.2575) could be annotated as terpenoids. For instance, M375T611 in exudate of non-grafted trees was putatively annotated as a diterpenoid. *Abies* are known to contain huge diversity of kaurane and abietane diterpenoids (Lavoie, 2012). Its elemental composition and their MS² information matched with known diterpenoids from *Lamiaceae* in databases. This annotation is also supported by its MS² spectra showed an ion fragment at m/z 331.1931 that could correspond to a

loss of CO₂ (-44 Da) from a lactone ring or a carboxylic function. M574T565 producing a fragment ion at m/z 395.2060 typical from a loss of a pentose (-132 Da) could be identified as sesquiterpene glycoside (Jiang *et al.*, 2016). M435T866 and M437T876, detected in non-grafted exudates, were putatively annotated as triterpenoids based on database occurrences and their closed retention time at the end of chromatograms (Figure 5.4). MS² spectra of M291T784 (m/z 291.1592) could correspond to mono-isononyl phthalate (Yao *et al.*, 2018). Phthalates are a group of compounds widely used in consumer products and they are ubiquitous in the environment due to their widespread commercial use (Yao *et al.*, 2018), thus a contamination may have occurred during sample preparation. However, MS² spectra of this VIP could also matched with sesquiterpene derivatives.

Table 5.2: Root grafting biomarkers of *Abies balsamea* fine roots highlighted through the VIP (Variable Important in Projection), and their annotations. Annotations were performed by using a combination of accurate mass, isotope ratio, MS² fragmentation and public libraries (i.e. KNapSAcK, Dictionary of Natural Products, HMDB, ChEBI and PubChem). The Bruker Compass DataAnalysis 4.3 software was also used to analyze and identify the compounds using MS and MS² spectra. RT: retention time (min); G: Grafted; NG: Non-grafted. mSigma is a constructor quality value of the formula determination. The closer the value is to zero more accurate is the result.

VIP #	Tree grafting status	Site	m/z ESI+	m/z ESI-	RT (min)	Molecular formula	Error (ppm)	mSigma	MS ² m/z ESI+ or -	Annotations	Reference
PM398T392	G	1	398.1549	-	6.58	C ₂₂ H ₂₄ NO ₆	NA	NA	NA	No match in database for this formula	
			[M+H] ²⁺								
NM462T403	G	1	-	462.2449	6.72	C ₃₂ H ₃₃ NO ₂	NA	NA	465.1944, 417.0452, 343.1172, 263.1293, 219.1389, 112.9860, 44.9993	No match in database for this formula	
PM612T329	G	1	611.1416	-	5.48	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₄	0.4	2.5	485.1086, 443.0964, 425.0870, 287.0547, 179.0339, 139.0390	Prodelphinidin	
PM534T48	NG	1	534.6646	-	0.8	C ₃₃ H ₆₃ O ₃₈	-5.8	22	NA	No match in database for this formula	

Table 5.2: continued

PM231T625	G	1	231.1381	-	10.42	C ₁₅ H ₁₈ O ₂	0	5.5	213.1275, 151.0755, 123.0800, 95.0492	Germacrane sesquiterpenoids (e.g. furanodienone)	(Friedrich <i>et al.</i> , 2000)
PM478T301	G	1	477.0784 [M+H] ²⁺	-	5.02	C ₃₉ H ₅₄ O ₂₇	-1.4	13.0	393.0559, 271.0105, 263.0529, 245.0423, 231.0224, 179.0330, 151.0392, 139.0394, 127.0395	No match in database for this formula	
PM183T453	G	1	182.5753 [M+H] ²⁺	-	7.55	C ₂₀ H ₃₀ O ₆	-2.1	-4.0	231.1425, 213.1252, 123.0780, 121.0642, 119.0843, 105.0675, 95.0851, 67.0539	Diterpene (e.g. Gibberelin A42, gibberilin A83 or taxicin I)	
NM472T392	G	1	-	471.1862	6.53	C ₂₂ H ₃₂ O ₁₁	-0.1	1.3	305.1393, 263.1287, 219.1389	No match in database for this formula	
PM427T415	G	1	427.3083	425.1813	6.92	C ₂₁ H ₃₀ O ₉	-0.7	9	265.1432, 247.1327, 201.1272, 123.0804	Sesquiterpene (e.g. abscisic acid β-D-glucopyranosyl ester or sesquiterpene glycoside)	

Table 5.2: continued

NM420T417	NG	1	421.1501	419.1347	6.95	C ₂₁ H ₂₄ O ₉	0.1	9.3	327.1238, 257.0820, 241.0495	Stilbenoids (e.g. rhaponticin or isorhapontin) or glycosilated compound.
NM177T469	NG	2	179.0706	177.0558	7.82	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	-1.6	-2	146.9595, 139.0401, 133.0657, 130.9658, 118.9666, 111.0798, 105.0320	Phenylpropanoids (e.g. coniferaldehyde, isoferulaldehyde or methoxycinnamic acid)
PM157T203	NG	2	157.0836	-	3.38	C ₈ H ₁₂ O ₃	NA	NA	146.9610, 125.0026, 108.9587, 97.0077, 90.9478, 74.9306, 56.9656, 55.9343	No match in database for this formula
NM305T338	G	2	307.1428	305.0664	5.63	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	-0.5	5.7	219.0668, 167.0347, 165.0181, 139.0402, 137.0242, 125.0243, 109.0308	Gallicocatechin or epigallocatechin isomer (Yuzuak <i>et al.</i> , 2018)
PM178T73	G	2	178.0576	-	1.22	NA	NA	NA	NA	No match in database for this formula

Table 5.2: continued

NM313T46	G	2	-	313.1155	0.76	C ₁₁ H ₂₁ O ₁₀	1.7	5.5	NA	No match in database for this formula
PM179T46	NG	2	179.0702	177.0559	7.82	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	-0.4	10.3	161.0598, 133.0646, 115.0548, 105.0701, 103.0545, 79.0558	Phenylpropanoids (e.g. coniferaldehyde, isoferulaldehyde or methoxycinnamic acid)
NM507T375	G	2	-	507.1877	6.25	C ₂₅ H ₃₁ O ₁₁	0.4	3.1	461.2013, 315.1243, 289.0695, 217.1062, 161.0468, 71.0144	Glycosided compound (e.g. gibberellin A3 O-β-D-glucoside)
				[M+HC OOH] ⁻						
				461.2013		C ₂₈ H ₂₉ O ₆	-6.1	-5.2		
				[M-H] ⁻						
NM191T49	G	2	193.071	191.0562	0.82	C ₇ H ₁₂ O ₆	-1.9	6.5	173.0451, 155.0345, 111.0082, 93.0331, 85.0284	Isocitric acid (Masike <i>et al.</i> , 2017)
PM165T428	G	2	163.1331	-	7.13	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	1.5	16.9	103.0552, 57.0703, 45.0338	No match in database for this formula
NM427T325	G	2	-	427.1251	5.42	C ₁₉ H ₂₂ O ₁₁	-0.8	46.5	NA	No match in database for this formula

Note: A # have been attributed to each VIP with P when MS data were acquired in positive mode or N when MS data were acquired in negative mod, M: *m/z* and T: RT.

Table 5.3: Root grafting biomarkers of *Abies balsamea* exudates highlighted through the VIP (Variable Important in Projection), and their annotations. Annotations were performed by using a combination of accurate mass, isotope ratio, MS² fragmentation and public libraries (i.e. KNapSAcK, Dictionary of Natural Products, ChEBI, HMDB and PubChem). The Bruker Compass DataAnalysis 4.3 software was also used to analyze and identify the compounds by using MS and MS² spectra. RT: retention time (min); G: Grafted; NG: Non-grafted. mSigma is a constructor quality value of the formula determination. The closer the value is to zero more accurate is the result.

VIP #	Tree grafting status	Site	m/z ESI+	m/z ESI-	RT (min)	Molecular formula	Error (ppm)	mSigma	MS ² m/z ESI-	Annotations	Reference
M273T448	G	1	-	273.0395	7.49	C ₁₄ H ₁₀ O ₆	1.5	78.7	229.0499, 211.0395, 185.0610, 167.0494, 133.0301	Myricetin	(Fabre <i>et al.</i> , 2001; Mbakidi-Ngouaby, 2017)
M317T452	G	1	-	317.0295	7.55	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	1.7	47.1	273.0407, 211.0431, 185.0592, 167.0500, 113.0280	Myricetin	(Fabre <i>et al.</i> , 2001; Mbakidi-Ngouaby, 2017)
M237T728	NG	1		237.0767	12.13	C ₁₂ H ₁₄ O ₅	0.2	281.6	NA	Phenolic compound (e.g. Sinapic Acid Methyl Ether or Methyl Sinapate, 3,4,5- trimethoxycinnamic acid)	

Table 5.3: continued

M93T57	NG	1	-	93.0340	0.95	C ₆ H ₆ O	-0.8	50.4	NA	Phenol
M375T611	NG	1	377.2838	375.2766	10.18	C ₂₂ H ₃₂ O ₅	2	177	331.1931, 307.0807, 187.1002, 151.0789, 133.0661, 89.0240	Diterpenoid
M574T565	G	1	529.2580	573.2552 [M+HC OOH] ⁻ 527.2522 [M-H] ⁻	9.42	C ₂₇ H ₄₂ O ₁₃ C ₂₆ H ₄₀ O ₁₁	-0.1 -4.0	32.2 NA	527.2522, 477.5213, 395.2060, 367.1032, 320.5112, 305.1728 293.0867, 275.1400	Diterpene glucoside or Sesquiterpene glycoside (Jiang <i>et al.</i> , 2016)
M389T631	NG	1	389.2903	-	10.52	C ₂₁ H ₄₂ O ₆	0.2	1.3	251.9715, 181.1600 127.1115	No match in database for this formula
M343T828	NG	1	-	343.0118	5.72	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	-3.7	9.7	NA	Flavonoid derivatives (e.g. pentahydroxy flavone)
M403T655	NG	1	-	403.3058	10.92	C ₁₈ H ₁₂ O ₁₁	1.7	643.2	315.2376, 215.2376, 137.0239	No match in database for this formula

Table 5.3: continued

M181T524	NG	1	-	181.0156	8.73	C ₈ H ₆ O	-7.4	NA	NA	Benzofuran, ubiquinone or phenolic compound in C6C3 (e.g. syringaldehyde, methyl vanillate)
M285T495	G	2	-	285.0798	8.25	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	-8	46.8	183.0121, 79.9581	Flavonoid derivative
M383T430	G	2	-	383.1928	7.17	C ₁₆ H ₃₂ O ₁₀	0.6	18.1	223.0412, 101.0244	No match in database for this formula
M229T48	G	2	-	228.9973	0.80	C ₁₃ H ₁₀ O ₄	10.9	206.7	180.9155, 166.9970, 133.0135, 125.0235, 86.9684, 73.0316	Aromatic compound
M204T256	G	2	206.0349	204.0045	4.27	C ₁₂ H ₃ N ₃ O	0.7	NA	NA	No match in database for this formula
M435T866	NG	2	-	435.2586	14.43	C ₂₈ H ₃₆ O ₄	-8.1	-24.7	298.0028, 249.9256	Tetracyclic triterpenoid or steroid
M339T415	G	2	-	339.0715	6.91	C ₁₅ H ₁₆ O ₉	2.0	NA	279.0226, 221.0843, 209.0789, 160.546	Sinapoyl malate or sinapic acid malate ester

Table 5.3: continued

M291T784	NG	2	-	291.1592	13.06	C ₁₇ H ₂₄ O ₄	0.3	16.4	221.1525, 141.1302, 134.0382, 121.0295, 96.9587, 89.0247, 66.0435, 44.9992	Mono-isononyl phthalate or sesquiterpene derivatives	(Yao <i>et al.</i> , 2018)
M533T40	G	2	-	533.0882	0.67	C ₃₁ H ₁₈ O ₉	5.2	NA	NA	No match in database for this formula	
M437T876	NG	2	-	437.2575	14.6	C ₂₈ H ₃₈ O ₄	27.9	27.3	NA	Triterpene derivative	
M179T589	G	2	-	179.0715	9.81	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	-0.9	17.9	135.0823, 133.0625, 119.0507, 93.0342, 79.95	Coniferol or Dihydroconiferyl, degradation product of lignin, aldehyde or 1- (3,4-Dihydroxyphenyl)- 1-propanone; 3-Me ether	

Note: A # have been attributed to each VIP with M: *m/z* and T: RT.

5.5.1.3 Total phenolics content of fine roots

Total phenolic content of fine roots did not vary according to root grafting (two ways ANOVA, $F_{\text{Status}} = 1.75$, $P > 0.05$, Figure 5.5). However, total phenolic content in site 2 was significantly higher than at the other sites (two ways ANOVA, $F_{\text{Sites}} = 8.59$, $P < 0.001$, Figure 5.5).

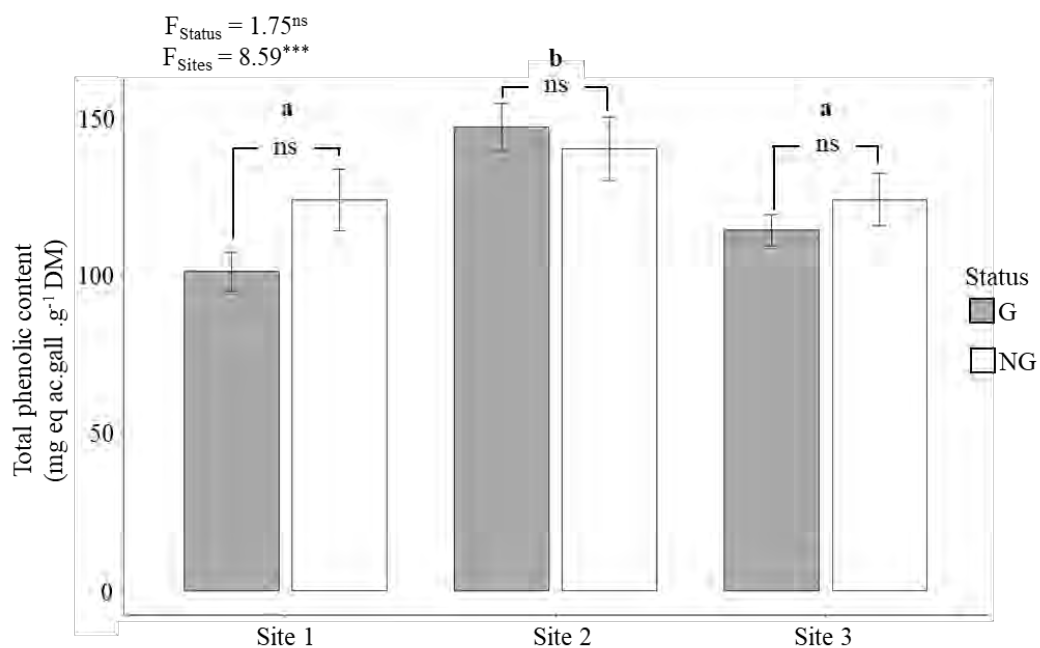


Figure 5.5: Mean ($\pm$ SE) total phenolic content of fine roots from grafted (G; grey bars) and non-grafted (NG; white bars) balsam firs according to the study sites. Differences between sites and root grafting status of trees were tested by using two ways ANOVA followed by Tukey tests (F values are represented, ns: non-significant with $P > 0.05$, ***: $P < 0.001$ and $N = 90$). Different letters indicate significant differences between sites with $a < b$.

5.5.2 Soil physico-chemical characteristics

Soil characteristics varied significantly between sites (PERMANOVA, $F = 14.58$, $P < 0.001$; Figure 5.6; Annexe C, Table C.2.). The first axis of PCA (44% of the variance explained) discriminated the soil characteristics of Site 2 from the other sites with higher pH and clay content but lower concentrations of C and TOM. The second axis of the PCA (22% of the variance explained) distinguished soil characteristics of Site 3 from the other sites due to lower concentrations of K, Ca, N, Mg.

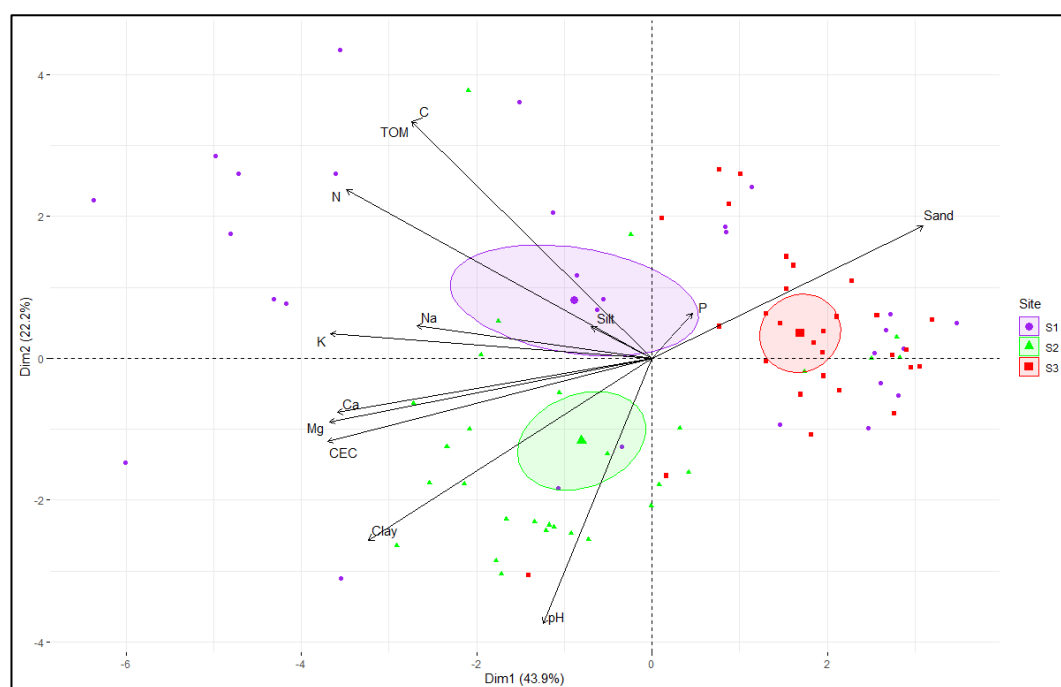


Figure 5.6: Principal Component Analysis (PCA) based on the 13 soil physico-chemical parameters (arrows) arranged by study sites (colored circles). CEC: cationic exchange capacity, C: Carbon, Ca: Calcium, K: Potassium, Mg: Magnesium, TOM: Total organic matter, N: Nitrogen, Na: Sodium and P: Phosphorous.

5.6 Discussion

5.6.1 PSMs determined root grafting

We showed that balsam fir roots and exudates had distinct metabolomic profiles between grafted and non-grafted trees (Figures 5.2 and 5.3). This is the first evidence of a potential chemical determinism of root grafting.

We hypothesized that the roots and exudates of grafted trees might contain compounds facilitating root growth and root contact. Past studies reported that several growth factors are released in rhizosphere by plants roots such as *p*-amino benzoic acid, biotine, choline, *n*-methyl nicotinic acid, and vitamins (Uren, 2000). None of the growth factors previously listed were annotated in the exudates of grafted trees. Growth regulators such as phytohormones (e.g. gibberelin A42 or gibberilin A83 or abscisic acid β -D-glucopyranosyl ester) were putatively detected as chemomarkers in grafted tree roots but these compounds are ubiquitous in plant tissues and their functions in plant physiology are diverse (i.e. dormancy, stomatal closure, stem growth and seed germination) (Hedden and Sponsel, 2015; Rai *et al.*, 2011; Raven *et al.*, 2000). Developing an analytical method to characterize the most hydrophilic compounds would allow to detect more specifically molecules such as amino acids, peptides and vitamins. In particular, this would allow us to target compounds (e.g. *p*-amino benzoic acid, biotine, choline and *n*-methyl nicotinic acid) that could stimulate root growth and root contacts and that we potentially could not detect with our method.

Overall, the compounds distinguishing grafted from non-grafted trees were PSMs, which is of particular interest since they are thought to play a key role in plant-plant interactions through allelopathic processes (Hierro and Callaway, 2021). Coniferous trees are equipped with a complex pattern of PSMs, mainly consisting of different phenolics and terpenoids (Manninen *et al.*, 2002; Stolter *et al.*, 2009). Thus, most of the root grafting chemomarkers annotated were phenolics and belonged to shikimate and malonate pathways, such as flavonoids (e.g. flavonols,

condensed tannins), lignin residues, phenolic acids and stilbenoids (Crozier *et al.*, 2006). Several annotated compounds were also terpenoids (e.g. sesquiterpene glycosides, diterpenoids and tetracyclic triterpenoids) synthesized by the mevalonate (MVA) pathway and the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway (Wink, 2010). The majority of the detected compounds were already reported in the extensive review of phytochemicals found in the genus *Abies* written by Lavoie (2015), which supports our chemomarkers annotation (Tables 5.2 and 5.3). Phenolics and terpenoids were detected as root grafting chemomarkers regardless of sites and root or exudate extracts.

Phenolics play an important role in allelopathy, influencing the growth and development of surrounding plants (Bertin *et al.*, 2003; Qiao *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2021). The majority of phenolics annotated in balsam fir roots and exudates belonging to flavonoids and their derivatives (e.g. prodelphinidins, myricetin). Past studies on flavonoids in rhizosphere revealed that in mixture they can caused inhibition of root growth, reduction in cell division frequency in root meristematic regions, and suppression in the formation of root hairs in herbaceous species (Levizou *et al.*, 2004; Weston and Mathesius, 2013). Other studies suggested that flavonoids allelopathic effects on root growth could be inhibitory or stimulatory, depending on their available concentration in the rhizosphere (Weston and Mathesius, 2013). Additional quantitative analyses of root phenolics content revealed that they were in similar concentrations between grafted and non-grafted trees (Figure 5.5). Thus, phenolics composition rather than their concentration may better explain root grafting. The rhaponticin, belonging to the stilbenoids family (Crozier *et al.*, 2006), was annotated as a chemomarkers in roots of non-grafted trees. The growth inhibitory properties of stilbenoids are well-documented for herbaceous species but has never been reported for tree species (Gorham and Coughlan, 1980; Valio *et al.*, 1969). Thus, allelopathic bioassays would be necessary to confirm if rhaponticin could decrease the probability of root contact and root grafting.

Coniferaldehyde were detected in roots as a chemomarker of non-grafted trees. It is a phenylpropanoid involved in the synthesis of lignin precursors (Yamamoto *et al.*, 2020). Coniferaldehyde is not known to have allelopathic properties, however it led us to reconsider the role of structural compounds (e.g. lignin, cellulose and hemicellulose) in root grafting. It has been suggested that root grafts may not occur within highly woody roots because their bark breaks with difficulty and prevents fusion of vascular tissues (Bormann and Graham, 1959; Eis, 1972). Thus, roots with a high lignin content could have a lower probability of forming grafts than those with a low lignin content. However, this hypothesis should be considered with caution since lignin degradation products (i.e. coniferol or dihydroconiferyl) were also putative chemomarkers of exudates from non-grafted trees.

Chemomarkers of non-grafted tree contained in exudates were mainly terpenoids including sesqui-, di- and triterpenoids. In the literature, the allelopathic role of terpenoids in exudates was associated to defence against soil-borne pathogens, resistance towards root-feeding insects and to the symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi (Baetz and Martinoia, 2014). Firs are characterized by the presence of blisters on the surface of young bark that contain an aromatic liquid called the cortical oleoresin (Manninen *et al.*, 2002). Oleoresin is known as a complex mixture of mono-, sesqui-, di- and triterpenoids which may explain the identification of sesqui- and diterpenoids as chemomarkers in root of grafted trees (Lavoie *et al.*, 2012; Pichette *et al.*, 1998). None of the terpenoids annotated in balsam fir are known to be directly involved in root-root interactions and possibly root grafting. However, this study highlighted the potential importance of terpenoids in root grafting. Volatile compounds (e.g. mono- and sesquiterpenoids) have complex and important roles in the rhizosphere, such as regulating the soil microbial community, providing a defence against herbivores, promoting beneficial symbioses and potentially inhibiting the growth and germination of competing plant species (Lin *et al.*, 2007; Santonja *et al.*, 2019; Schulz-Bohm *et al.*, 2018; van Dam *et al.*, 2016). Complementary analyses using Gas Chromatography Mass

Spectrometry (GC-MS) would allow to detect which volatiles terpenoids potentially involved in root grafting in more details.

Finally, even if most of the root grafting chemomarkers annotated were phenolics and terpenoids, several VIPs occurring in balsam fir extracts remain unidentified as no MS² spectra could be recorded for them or they have never been described in the literature (Da Silva *et al.*, 2015; Peters *et al.*, 2018). Roots and their exudates have received little attention, leading to limited knowledge about their phytochemical contents. Most of the works focused on the identification of metabolites present in plant roots and exudates have been conducted in herbaceous plants (Escudero *et al.*, 2014; Strehmel *et al.*, 2014; Watson *et al.*, 2015). and there have been few studies on roots and exudates from mature trees *in situ* (Qiao *et al.*, 2014; Tückmantel *et al.*, 2017; Weinhold *et al.*, 2020). To our knowledge, only one study tested allelopathic potential of balsam fir and reported phytotoxicity of its leaf and litter leachates on the germination and growth (including root growth) of four weed species (Jobidon, 1986). In addition, the isolation of detected chemomarkers for further structural analysis by nuclear magnetic resonance (NMR) would allow us to annotate the unidentified compounds and to confirm our hypothesis. The isolated chemomarkers can also be used for biological assays in which their allelopathic properties will be experimentally evaluated.

5.6.2 Soil characteristics potentially affect roots and exudates metabolomic profiles

Balsam fir roots and exudates had distinct metabolomic profiles across study sites (Figures 5.2 and 5.3). This effect could be explained by the different soil physico-chemical characteristics between study sites (Badri and Vivanco, 2009; Mukerji *et al.*, 2006). Soil of Site 2 had higher pH and clay content than the other sites (Figure 5.6). However, soil pH has been reported to strongly influence root chemistry of conifer such as macronutrients and micronutrients contents (Brunner *et al.*, 2002). Similarly, clay content influences the binding of different amino acids and peptides (Mukerji *et al.*, 2006). Soil nutrient availability also has profound effect on exudates

chemical composition. Plants respond to nutrient deficiency by altering root exudates, which in turn change the microenvironment of the rhizosphere (Badri and Vivanco, 2009). As soil nutrients concentrations was reported to involved changes in quality of phenolics and terpenoids stored in plants tissues (Chishaki and Horiguchi, 1997; Ormeno and Fernandez, 2012). We may suggest that the lower soil nutrient status of Site 3 (i.e. lower K, Ca, N, Mg concentrations,) induced qualitative changes in allocation of tree to PSMs. Thus, difference in metabolomic profile between root from grafted and non-grafted trees in Site 3 was less marked (Figure 5.2).

However, recognizing the limitations of our collecting method, our results on root exudation should be considered with caution because the rhizosphere is not left intact due to the separation of roots and soil. Although root systems are left intact, the use of the cuvette systems certainly result in some severing injuries of mycorrhizal fungal hyphae. Moreover, the microorganisms naturally occurring in the soil were excluded from the system while they are known to alter the chemical composition of exudates (Philippot *et al.*, 2013; Sebastiana *et al.*, 2021).

5.7 Conclusion

This study is the first to investigate the chemical determinism of root grafting and specifically the metabolome of balsam fir roots and exudates. Metabolomic profiles of balsam fir roots and exudates differed between grafted and non-grafted trees which is the first evidence of a potential chemical determinism of root grafting. Phenolics and terpenoids were detected as the metabolites responsible for these differences regardless of root or exudate extracts. Stilbenoids (e.g. rhaponticin), flavonoids (e.g. prodelphinidins) and their derivatives detected respectively in roots and exudates of non-grafted trees could potentially inhibit root grafting. No compounds that could facilitate graft formation have been identified. It would be necessary to develop a method detecting the most hydrophilic compounds to study them in more detail. The complexity of studying the chemistry of roots and exudates from mature and *in situ* tree was reflected in the fact that their metabolomes were

strongly linked to the sites studied. We supposed that this effect was mainly due to the physico-chemical characteristics of the soils which differed between sites. Our metabolomic analyses are a starting point for testing chemical ecology in more detail and in the context of root grafting. Several annotated root grafting chemomarkers were universal in many tree species and they cannot distinguish such strong allelopathic activity of balsam fir from other tree species. Targeted analyses of phenolics and terpenoids contained in balsam fir exudates and roots combined with bioassays would allow us to identify the compounds involved and to test their potential allelopathic properties more accurately.

5.8 Acknowledgements

The research was funded by a Natural Sciences and Engineering Research Council discovery grant to AD. We are grateful to Philippe Duval, Eva Thévenin and Michel Guimond for their assistance with fieldwork. We also thank Stéphane Greff for conducting UHPLC ESI QTOF data acquisitions. Finally, we thank Frédéric Guibal for the analyses of sampled tree ages.

CHAPITRE VI

DISCUSSION GÉNÉRALE

Comprendre les processus qui régissent les interactions entre les plantes est l'un des défis les plus importants de la recherche en écologie végétale (Bertness et Callaway, 1994; Brooker, 2006; Brooker *et al.*, 2008; Lortie *et al.*, 2004). Aujourd'hui, la perception commune selon laquelle la dynamique forestière est principalement régie par la compétition est remise en question par les « connections racinaires », notamment par la réévaluation des greffes racinaires comme vecteurs potentiels d'interactions positives entre les arbres (McIntire et Fajardo, 2011). Cependant, nous avons peu d'informations sur le rôle écologique des greffes racinaires dans les interactions entre arbres et dans la dynamique des peuplements forestiers. Dans ce contexte, cette thèse avait pour objectif de déterminer la fréquence des greffes racinaires chez le sapin baumier, d'identifier les facteurs qui en favorisent la formation et d'évaluer leur influence sur l'écologie des peuplements. Dans un premier temps, trois peuplements de sapins baumiers ont été excavés hydrauliquement afin de vérifier la présence de greffes, de déterminer leur fréquence et de caractériser les conditions favorables à leur formation (Chapitre III). Dans un second temps, l'effet d'interaction entre la compétition intraspécifique et les greffes racinaires sur la croissance des sapins baumiers a été évalué en utilisant des modèles linéaires de croissance (Chapitre IV). Enfin, nous avons testé l'hypothèse de l'existence d'un déterminisme chimique des greffes racinaires dans les peuplements de sapins baumiers par une approche métabolomique (Chapitre V).

Ce dernier chapitre a pour objectif de i) synthétiser les principaux résultats obtenus lors de ce travail de thèse, ii) en discuter les limites, iii) proposer quelques perspectives de recherches ainsi que iv) d'exposer les implications en termes

d'aménagement forestier.

6.1 La formation des greffes racinaires chez le sapin baumier : un phénomène fréquent principalement médié par la proximité entre les arbres.

Cette étude est la première à démontrer que les peuplements de sapins baumiers sont fortement interconnectés par les greffes racinaires. Le pourcentage d'arbres greffés varie de 32 à 42% en fonction des peuplements (Chapitre III). La fréquence des greffes racinaires chez le sapin baumier est comparable à celle d'autres peuplements naturels d'espèces communes en forêt boréale comme l'épicéa (*Picea abies* (L.) Karst., 33%) et le peuplier baumier (*Populus balsamifera* L., 48%). Cette fréquence peut être légèrement sous-estimée lors de l'observation des systèmes racinaires excavés car quelques greffes peuvent être inaperçues ou cassées. Depuis nos travaux, une nouvelle méthode non-destructive a été développée pour détecter les greffes racinaires à l'aide d'une sonde à ultrasons Doppler (Vovides *et al.*, 2021). Cependant, la présence d'un cerne de croissance commun attestant d'une union morphologique complète entre deux racines n'est pas vérifiée par cette méthode (Bormann et Graham, 1960, 1959). L'excavation hydraulique reste donc la méthode la plus efficace pour estimer la fréquence réelle des greffes racinaires.

Nos résultats ont confirmé le postulat selon lequel la proximité entre les arbres est le meilleur prédicteur de la formation de greffes racinaires (Gaspard et DesRochers, 2020; Gordon et Roth, 1976; Külla et Lõhmus, 1999; Tarroux et DesRochers, 2010). Dans les trois peuplements étudiés, 80% des arbres greffés étaient liés à leur plus proche voisin. La distance moyenne entre les arbres greffés était de 48 cm et aucune greffe n'a été observée au-delà d'une distance de 2 m entre les arbres. Il est très courant d'observer des formations en « patches », issues de banques de semis abondantes, dans les peuplements de sapins baumiers (Morin et Laprise, 1997; Ruel *et al.*, 2003). Ce type de formation où les arbres se développent très proches les uns des autres peut justifier la fréquence importante des greffes racinaires pour cette espèce. Le nombre de racines par arbre était le second meilleur prédicteur du nombre de greffes par arbre. Le nombre de greffes par arbre augmente avec le

nombre de racines par arbre. Des arbres proches avec un nombre de racines élevé présentent une forte probabilité de contacts racinaires dans un temps plus court (Gaspard et DesRochers, 2020; Külla et Löhmnus, 1999; Tarroux *et al.*, 2010). Les principaux facteurs favorisant la formation de greffes racinaires étant ceux facilitant les contacts racinaires, nos résultats supportent l'hypothèse selon laquelle la formation de greffes est issue de la rencontre au hasard entre deux racines distinctes.

Contrairement aux études précédentes (Bormann et Graham, 1959; Fraser *et al.*, 2005; Tarroux et DesRochers, 2010), nos travaux démontrent que les greffes racinaires se forment indépendamment de la densité des peuplements, de la taille (i.e. DHP) et de l'âge des arbres et du diamètre moyen de leurs racines. En effet, malgré une densité d'arbres dans le site III.1 trois fois supérieure à celle du site III.3 (Chapitre III), le pourcentage d'arbres greffés n'était pas différent (i.e. 36% d'arbres greffés en moyenne). Au moment de l'excavation, les arbres greffés avaient en moyenne 48 ans et un diamètre de 11 cm tandis que le diamètre moyen de leurs racines était de 7 cm. Néanmoins, aucun de ces facteurs n'affectaient le nombre de greffes par arbre.

Des greffes racinaires pouvaient s'initier chez des arbres âgés de 12 à 106 ans et ayant un DHP allant de 1,3 à 77 cm. L'âge des racines lors de l'initiation des greffes était en moyenne de 27 ans mais variait fortement de 5 à 64 ans. Uniquement 37% des greffes s'initiaient au niveau des racines ayant un diamètre supérieur à 4 cm. Probablement parce que les racines ligneuses de diamètre important ont une écorce plus épaisse, limitant la fusion des tissus vasculaires lors de l'initiation de la greffe (Eis, 1972). La formation des greffes racinaires chez le sapin baumier n'est donc pas limitée à une période particulière de son développement et peut avoir lieu tout au long de la vie des peuplements. Cela suggère que la fonction écologique des greffes racinaires pourrait être tellement importante que peu importe les conditions du peuplement dans lequel un arbre se développe, il s'adapte afin d'en former. Les greffes racinaires peuvent s'initier tôt chez le sapin baumier par rapport à d'autres espèces en forêt naturelle et potentiellement affecter la dynamique des peuplements très rapidement après leurs établissements (Adonsou *et al.*, 2016b; Tarroux et

DesRochers, 2010). La plus ancienne greffe observée avait 39 ans et appartenait à des arbres de 77 et 74 ans. Le plus jeune arbre greffé avait 36 ans, au moment de l'excavation, sa plus vieille greffe avait 24 ans. Ainsi, les greffes racinaires peuvent se maintenir pendant plusieurs dizaines d'années et pourraient affecter la dynamique des peuplements tout au long de leur développement. Il paraît cependant que des greffes disparaissent au cours du temps, puisque qu'il n'y a pas corrélation positive entre l'âge et le nombre de greffes par arbres.

Nos résultats indiquent que les arbres qui allaient plus tard se greffer présentaient de meilleurs taux de croissance au sein des peuplements (Chapitre V). Ces résultats sont en accord avec ceux de Tarroux et DesRochers (2011) et Gaspard et DesRochers (2020) qui supposent i) que les racines des arbres de gros diamètres ont plus de chance de se croiser et de fusionner, ii) que les arbres « sélectionnés » pour être greffés ont une croissance plus importante parce qu'ils ont plus de réserves énergétiques pour assumer le coût de la formation des greffes racinaires (Tarroux et DesRochers, 2011).

6.2 Effet d'interaction entre les greffes racinaires et la compétition intraspécifique sur la croissance des arbres.

Nous avons mis en évidence que l'effet des greffes racinaires sur la croissance des arbres était fortement lié à la compétition intraspécifique (Chapitre IV). La meilleure performance de l'indice de compétition indépendant de la distance (i.e. BAL) dans les modèles de croissance réalisés nous indique que : i) la compétition asymétrique aussi bien que la compétition symétrique réduisaient fortement la croissance des sapins baumiers des peuplements étudiés ; ii) la compétition intraspécifique entre les sapins baumiers est davantage déterminée par la taille des arbres que par leur proximité. Les futurs arbres greffés avaient un meilleur taux de croissance que les arbres qui ne formeraient jamais de greffes racinaires, ce qui suggère qu'ils étaient les arbres les plus productifs au sein d'un peuplement. Cependant, l'effet négatif de la compétition intraspécifique sur la croissance des arbres est plus important une fois que les arbres sont greffés. Les arbres non-greffés

sont, quant à eux, moins affectés par la compétition intraspécifique que les arbres greffés. Nous avons donc rejeté notre hypothèse selon laquelle les arbres greffés étaient de « meilleurs compétiteurs ». Le taux de croissance plus faible des arbres greffés suppose qu'ils sont moins vigoureux et plus sensibles aux perturbations sous des régimes de compétition intraspécifique élevés.

Entre deux arbres greffés de même taille, les échanges de ressources seraient équilibrés (Bormann, 1966). Cependant lorsque deux arbres de taille différente sont greffés, celui avec la plus grande couronne et le taux d'évapotranspiration le plus élevé serait plus apte à détourner les ressources à son avantage. Dans un peuplement où la compétition intraspécifique est faible, l'arbre dominant pourrait soutenir la croissance et la survie d'un arbre dominé auquel il est greffé. Lorsque la compétition intraspécifique est forte et les ressources limitées, leur transfert vers les arbres dominés pourrait être limité ou nul (Bormann et Graham, 1959; Eis, 1972; Loehle et Jones, 1990). Cela pourrait justifier la croissance inférieure des arbres greffés par rapport à celle des arbres non-greffés lorsque la compétition intraspécifique augmente. Les greffes racinaires pourraient donc jouer un rôle important durant la phase d'auto-éclaircie des peuplements en accélérant la vitesse de dépérissement des arbres les moins vigoureux (Adonsou *et al.*, 2016a; Bormann et Graham, 1966; Krasny et Johnson, 1992).

Une fois les arbres greffés, l'effet négatif de la compétition intraspécifique sur leur croissance est rapide et marqué (Chapitre IV). Des phytohormones impliquées dans la dominance apicale sont potentiellement transférées à travers les greffes racinaires (Graham, 1960; Schier, 1972). Les arbres dominants pourraient envoyer un signal hormonal aux arbres dominés, induisant une réduction de leur croissance et accélérant l'auto-éclaircie des peuplements. Par exemple, l'auxine qui est synthétisée au niveau des jeunes feuilles et des méristèmes, est responsable de la dominance apicale ou de la ramification des parties aériennes des plantes (Barbier *et al.*, 2017; Kebrom, 2017; Woodward, 2005). Son transfert à des arbres dominés pourrait perturber leur activité mitotique (Schier, 1972).

Contrairement à ce qui était attendu, les greffes racinaires n'ont pas permis de diminuer les effets négatifs de la compétition sur la croissance des arbres greffés. Cependant sur le long terme, elles pourraient permettre d'éliminer les individus les plus faibles ayant pour effet de réduire la densité et de limiter l'effet négatif de la compétition intraspécifique sur la croissance à l'échelle du peuplement (i.e. arbres greffés et non-greffés inclus). Notre étude est limitée à la date de l'excavation des arbres. L'âge moyen des peuplements étudiés au moment de l'excavation était de 54 ans alors que les sapins baumiers peuvent atteindre un âge de 150 à 200 ans (Cauboue, 2007). Intégrer des données de croissance issues de peuplements plus vieux aux modèles réalisés permettrait de mieux prédire l'effet d'interaction entre la compétition intraspécifique et les greffes racinaires sur l'évolution des peuplements.

Nous avons considéré les sites en effet aléatoire dans les modèles étudiés, permettant d'inclure l'influence des conditions environnementales sur la croissance des arbres. Afin d'améliorer leur qualité prédictive, il serait intéressant d'ajouter des variables climatiques (e.g. pluviométrie et températures) qui sont de très bons prédicteurs de la croissance des arbres (Duchesne et Houle, 2011; Goldblum et Rigg, 2011). Ce travail n'a pas été réalisé en raison du nombre insuffisant de données climatiques disponibles sur les 60 dernières années de développement des peuplements pour les trois localités étudiées.

Enfin, le sapin baumier est connu pour croître pendant des périodes prolongées en sous-bois denses d'autres espèces (e.g. tremble et épinette noire) (Burns et Honkala, 1990; Ruel *et al.*, 2003). Il serait intéressant de réaliser les mêmes analyses sur des peuplements mixtes où les sapins sont en sous-bois d'une autre espèce ou ont percé la canopée. Cela nous permettrait de mieux comprendre le rôle des greffes racinaires dans la tolérance du sapin baumier à se développer en sous-bois d'autres espèces ainsi que dans l'acquisition de la dominance ou de la codominance.

6.3 Sur la piste d'un déterminisme chimique des greffes racinaires.

Dans le Chapitre III, nous avons démontré que les conditions des peuplements dans lesquelles allaient se former les greffes racinaires étaient très variables (i.e. âge et densité des peuplements, taille des arbres et de leurs racines). De plus, l'excavation hydraulique nous a permis de constater, comme Eis (1972) et Tarroux et DesRochers (2010), que la racine d'un arbre peut croiser les racines de plusieurs arbres voisins avant de se greffer à celle d'un arbre plus éloigné (jusqu'à 2 m). L'ensemble de ces observations suggère que d'autres facteurs entrent en jeu dans la formation des greffes racinaires. Notre hypothèse est que les racines des arbres libèreraient des composés chimiques dans la rhizosphère, stimulant ou inhibant la formation des greffes racinaires. Les racines fines et exsudats de sapins baumiers ont des compositions chimiques (i.e. profils métabolomiques) différentes entre les arbres greffés et non-greffés. Les composés chimiques discriminant les racines et les exsudats des arbres greffés de ceux des non-greffés sont majoritairement des composés phénoliques (e.g. flavonoïdes, résidus de lignine, acides phénoliques et stilbènes) ou des terpénoïdes ainsi que leurs dérivés (e.g. glycosides sesquiterpéniques, diterpénoïdes, triterpènes tétracycliques). Ces deux familles de composés appartenant aux métabolites secondaires (i.e. PSMs) sont reconnues pour avoir un haut potentiel allélopathique dans la rhizosphère (Bais *et al.*, 2004; Inderjit *et al.*, 1994; Vives-Peris *et al.*, 2020). Parmi les composés chimiques pouvant être impliqués dans le déterminisme chimique des greffes racinaires, nous pouvons citer la rhaponticine qui est un polyphénol détecté comme un marqueur chimique des racines des arbres non-greffés. Ce composé a un intérêt particulier puisqu'il appartient à la famille des stilbènes dont les propriétés inhibitrices de la croissance sont reconnues chez les herbacées (Gorham et Coughlan, 1980 ; Valio *et al.*, 1969). Les flavonoïdes et leurs dérivés (e.g. prodelphinidines, myricétine) constituent aussi un groupe important de marqueurs chimiques des greffes racinaires. Ils sont présents de manière indifférenciée dans les exsudats et les racines issus d'arbres greffés et non-greffés. Selon leur concentration et la diversité des composés en mélange, les flavonoïdes présents dans les exsudats peuvent stimuler ou inhiber la

croissance racinaire des plantes voisines (Levizou *et al.*, 2004; Weston et Mathesius, 2013). Les marqueurs chimiques des arbres non-greffés détectés dans les exsudats sont principalement des terpénoïdes et leurs dérivés (e.g. sesqui-, di- et triterpénoïdes). Le rôle allélopathique des terpénoïdes contenus dans les exsudats est associé à la défense contre les insectes herbivores et les microorganismes pathogènes du sol, ainsi qu'à la symbiose mycorhizienne (Baetz et Martinoia, 2014).

Très peu d'analyses métabolomiques sur le sapin baumier et encore moins sur des extraits de racines et d'exsudats ont été réalisées conduisant à une connaissance limitée de leur contenu phytochimique (Pichette *et al.*, 1998; Lavoie, 2015). Ainsi, plusieurs marqueurs chimiques des greffes racinaires restent sans annotation car il n'y a pas de spectres MS² expérimentaux et de standards de références pour réaliser des comparaisons. L'isolation des marqueurs chimiques détectés pour réaliser des analyses structurales supplémentaires par Résonance Magnétique Nucléaire (i.e. RMN) permettrait d'annoter les composés encore non identifiés et de confirmer les annotations potentielles. La co-injection de standards commerciaux (e.g. prodelphinidines, rhaponticine, myricétine, coniferaldehyde, gibbereline A42) confirmerait également l'annotation des marqueurs chimiques détectés. Les composés isolés pourraient être ensuite utilisés pour des bioessais en laboratoire sur des plants de sapins baumiers afin de tester expérimentalement leurs propriétés allélopathiques (i.e. auto-inhibition ou stimulation de la croissance des racines). Etant donné la difficulté d'obtenir des quantités importantes d'exsudats, des macérats de racines pourraient être utilisés pour les bioessais, à des concentrations biologiquement pertinentes, préalablement évaluées par des mesures *in situ* dans la rhizosphère. Des analyses quantitatives complémentaires permettraient d'estimer la concentration des marqueurs chimiques annotés et d'estimer s'ils sont diffusés dans la rhizosphère en quantité suffisante pour avoir des effets allélopathiques.

Nos analyses métabolomiques sur le sapin baumier constituent un point de départ pour décrire plus en détail son écologie chimique. Développer une méthode analytique détectant les composés plus hydrophiles permettrait de cibler une plus

grande diversité de composés tels que les acides aminés et les peptides qui sont couramment décrits dans les exsudats (Flores, 1999). Ce type de méthode nous permettrait également de cibler des composés susceptibles de stimuler la croissance des racines et leurs contacts que nous n'avons pas réussi à détecter, tels que les vitamines (e.g. biotine, choline) et les acides organiques (e.g. acide *p*-amino benzoïque) (Uren, 2000). Des analyses complémentaires par chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS) permettraient d'analyser les terpènes volatils (i.e. mono-, sesqui- et diterpènes) libérés par les racines et les exsudats dans la rhizosphère et pouvant être impliqués dans la formation des greffes racinaires.

Les résultats obtenus reflètent la difficulté d'analyser la composition chimique des exsudats racinaires d'arbres matures *in situ* (Oburger et Jones, 2018). Les analyses chimiométriques ont été réalisées en considérant séparément les sites étudiés car ils influençaient fortement la composition chimique des racines et des exsudats de sapins baumiers. En effet, les caractéristiques physico-chimiques des sols différaient en fonction des sites étudiés, ce qui a pu influencer la composition chimique des racines et des exsudats. Nous suggérons que la plus faible teneur en nutriment (i.e. K, Ca, N, Mg) du sol du site V.3. induit une modification de la composition des terpènes et composés phénoliques contenus dans les racines de sapins baumiers. Ainsi, la différence entre les profils métabolomiques des racines issues d'arbres greffés et non greffés était moins marquée dans le site V.3

Notre étude est la première approche *in situ* du déterminisme chimique des greffes racinaires. Nous sommes limités par le fait que nous ne pouvons pas suivre l'évolution du processus de formation des greffes racinaires dans son intégralité (i.e. de l'entrée en contact des racines jusqu'à la fusion des tissus vasculaires). L'idéal aurait été de réaliser des prélèvements d'exsudats sur des plants de sapins baumiers avant, pendant et après l'initiation de la greffe. Au cours de ces travaux de recherche, j'ai pu assister à plusieurs expérimentations tentant de « forcer » la formation de greffes racinaires en serre ou en plantation sans succès. Les racines latérales et principales (diamètre entre 0,5 et 1 cm) d'une quinzaine de paires de

jeunes pins rouges (< 1 ans), dont l'écorce avait préalablement été retirée pour faire affleurer les tissus vasculaires, ont été mises en contact manuellement (par paires) puis fixées à l'aide d'adhésif chirurgical afin de provoquer la formation de greffes racinaires. Après 1 an de croissance sous des conditions de croissance contrôlées en serre, aucune greffe racinaire n'a été observée (*comm. pers.* Annie DesRochers). En utilisant une méthode similaire, les racines latérales (diamètre entre 2 et 4 cm) de 5 paires de platanes (*Platanus x acerifolia* (Aiton) Willd.) âgés de 30 ans et en plantation n'ont pas formé de greffe au bout d'un an également (*comm. pers.* Charles Gers). L'initiation de la continuité vasculaire entre deux racines pouvant prendre jusqu'à 5 ans en peuplements naturels (Bormann et Graham, 1959; Graham, 1960), il aurait probablement fallu attendre encore plusieurs années avant d'observer la formation de greffes racinaires complètes sous conditions contrôlées. Dans un temps limité, nous avons donc réalisé cette étude sur des arbres déjà greffés en émettant l'hypothèse que les composés exsudés, une fois la greffe formée, sont les mêmes que ceux avant la formation de la greffe.

6.4 Quelles implications pour l'aménagement forestier ?

Les peuplements de sapins baumiers étant reconnus pour développer des formations en « patches » très denses, des éclaircies commerciales ou pré-commerciales sont souvent réalisées pour réduire la compétition pour les ressources et augmenter la productivité des peuplements (Ruel, 2000; Ruel *et al.*, 2003). Les peuplements de sapins baumiers étant greffés à hauteur d'au moins 30%, il serait préférable de réaliser des éclaircies par le bas. Cela limiterait les pertes de photosynthétats destinés à soutenir les souches d'arbres éclaircis, tout en favorisant la croissance des arbres résiduels par augmentation de la disponibilité des ressources (Tarroux *et al.*, 2010). Néanmoins, le sapin baumier est reconnu pour être particulièrement vulnérable aux chablis (Duperat *et al.*, 2021; Ruel, 2000). Les coupes partielles ainsi que les épidémies répétées de tordeuses des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana* Clem) sont des facteurs augmentant la sensibilité du sapin baumier aux dommages éoliens (Duperat *et al.*, 2021; Taylor et MacLean,

2009). Les greffes racinaires pourraient limiter la formation de chablis en augmentant la stabilité des arbres par augmentation de la surface de leurs systèmes racinaires (Basnet *et al.*, 1993; Stokes *et al.*, 1995). Conserver les arbres proches et de même taille permettrait donc de maintenir les arbres greffés, dont les échanges de ressources sont équilibrés, et d'augmenter la stabilité des peuplements. Inversement, dans les peuplements de sapins susceptibles d'être affectés par la carie des souches, il serait efficace de couper les arbres les plus proches ($< 1\text{m}$) afin de limiter les contacts racinaires et la propagation de la pourriture des souches (Basham *et al.*, 1953; Burns et Honkala, 1990; Epstein, 1978).

6.5 Conclusion

Ces travaux de thèse sont les premiers à mettre en évidence que les systèmes racinaires des sapins baumiers sont fortement interconnectés par des greffes racinaires. Nos résultats permettent de mieux comprendre les facteurs de formation des greffes racinaires en montrant que la fréquence des greffes racinaires, chez cette espèce, était principalement liée à la proximité entre les arbres. De plus, nous avons démontré que la composition chimique des racines et des exsudats des arbres greffés est différente de celle des arbres non-greffés, ce qui constitue une première preuve d'un potentiel déterminisme chimique des greffes racinaires. Les racines des sapins baumiers libèrent de nombreux métabolites secondaires (i.e. flavonoïdes et terpénoïdes) dans la rhizosphère qui sont susceptibles d'inhiber la formation des greffes racinaires. Malgré des conditions des peuplements très variables en termes d'âge, de taille des arbres et de densité, le pourcentage d'arbres greffés au sein des peuplements était similaire (36% en moyenne). Ainsi la formation des greffes racinaires n'était pas limitée à une période particulière et pouvait avoir lieu tout au long de la vie des peuplements. Ces résultats soulignent l'importance de mieux comprendre leur rôle écologique sur la dynamique des peuplements forestiers. Bien que les arbres greffés sont capables de se transférer des ressources, nous avons démontré qu'ils ne sont pas de meilleurs compétiteurs au sein des peuplements de sapins baumiers. Les futurs arbres greffés présentaient de meilleurs taux de

croissance, mais une fois greffés, leur croissance diminuait fortement avec l'augmentation de la compétition intraspécifique jusqu'à devenir inférieure à celle des arbres non-greffés. Ainsi les greffes racinaires pourraient jouer un rôle important dans la dynamique des peuplements de sapins baumiers en accélérant la phase d'auto-éclaircie. A la lumière de nos résultats, il devient évident que le rôle écologique des greffes racinaires dans la dynamique des peuplements forestiers n'est pas neutre : les greffes racinaires permettent aux arbres d'interagir directement entre eux. Ces travaux nous invitent à reconsidérer le principe classique d'individualité en écologie forestière en supportant l'idée que les greffes racinaires permettent aux arbres de répondre à la compétition comme un groupe plutôt qu'en tant qu'entités individuelles. Il serait intéressant de poursuivre nos recherches sur le déterminisme chimique des greffes racinaires en réalisant des bioessais permettant de tester les propriétés allélopathiques des composés contenus dans les racines de sapins baumiers. De plus nous suggérons d'étudier si des phytohormones impliquées dans la dominance apicale pourrait être transférées *via* les greffes racinaires et accélérer les épisodes d'auto-éclaircie au sein des peuplements de sapins baumiers.

ANNEXE A

MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE DU CHAPITRE III



Figure A.1. Photograph of the excavated root systems of *Abies balsamea* in Site 1.

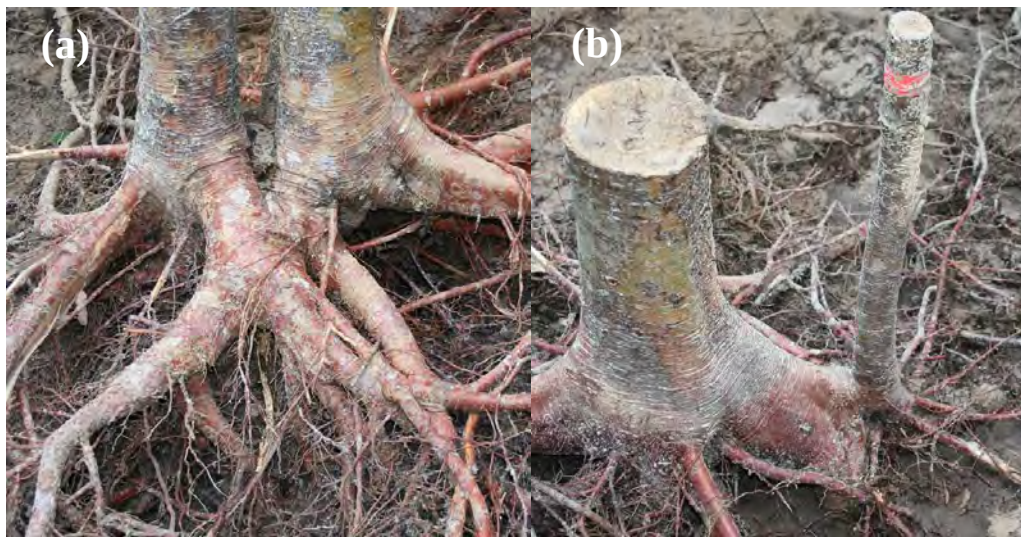


Figure A.2. Photographs of root grafts between several *Abies balsamea*. (a) A graft formed when main lateral of roots encountered. (b) A graft formed when the root encountered the stump of the neighbor tree.

Table A.1. Diameter (cm) and status (alive or dead) of trees and diameter (cm) at graft initiation of grafted roots in balsam fir stands according to grafts and sites. Tree No 1 is the biggest and Tree No 2 is the smallest tree of the pair of grafted trees. Root No 1 is the biggest and Root No 2 is the smallest grafted root. DBH: Diameter Breast Height. NA: Not Available.

Graft Labels	Sites	Statut, Tree No 1	Statut, Tree No 2	DBH, Tree No 1 (cm)	DBH, Tree No 2 (cm)	Diameter, Root No 1 (cm)	Diameter, Root No 2 (cm)
G1	1	Alive	Alive	15.20	8.90	14.67	7.79
G2	1	Alive	Alive	77.00	10.80	4.39	1.74
G3	1	Alive	Alive	77.00	10.80	3.67	1.87
G4	1	Alive	Alive	77.00	10.80	7.05	0.96
G5	1	Alive	Alive	77.00	10.80	2.17	1.98
G6	1	Alive	Alive	77.00	10.80	5.17	2.61
G7	1	Alive	Alive	12.70	3.70	7.01	2.61
G8	1	Alive	Alive	12.70	3.70	4.95	NA
G9	1	Alive	Alive	12.90	12.30	2.36	2.34
G10	1	Alive	Alive	12.70	3.70	2.12	1.40
G11	1	Alive	Alive	12.70	3.70	1.14	1.02
G12	1	Alive	Alive	7.10	3.10	3.26	3.01
G13	1	Alive	Alive	11.30	7.10	2.50	1.86
G14	1	Alive	Alive	20.90	16.10	4.39	4.02
G15	1	Alive	Alive	12.90	12.30	NA	NA
G16	1	Alive	Alive	12.70	3.70	1.89	1.02
G17	1	Alive	Alive	15.80	8.70	1.95	1.35
G18	1	Alive	Alive	15.80	8.70	3.57	2.06
G19	1	Alive	Alive	15.80	8.70	4.72	2.06
G20	1	Alive	Alive	15.80	8.70	3.77	3.25
G21	1	Alive	Alive	11.30	8.70	8.76	4.27
G22	1	Alive	Alive	15.80	11.30	2.58	2.44
G23	1	Alive	Alive	19.50	18.10	4.68	4.30
G24	1	Alive	Alive	10.80	NA	NA	NA
G25	1	Dead	Dead	3.50	2.10	2.90	0.69
G26	1	Alive	Alive	12.90	12.30	5.45	1.68
G27	1	Alive	Alive	12.90	12.30	2.48	0.98
G28	1	Alive	Alive	12.90	12.30	14.94	8.85
G29	1	Alive	Alive	12.90	12.30	11.67	2.80
G30	1	Alive	Alive	12.90	12.30	3.99	1.11
G31	2	Alive	Dead	19.40	12.40	5.69	NA
G32	2	Alive	Alive	30.30	15.00	6.31	NA

Table A.1. Continued

G33	2	Alive	Alive	30.30	15.00	1.51	NA
G34	2	Alive	Alive	30.30	15.00	1.36	NA
G35	2	Alive	Alive	30.30	15.00	1.02	0.40
G36	2	Alive	Alive	30.30	15.00	9.47	1.05
G37	2	Alive	Dead	19.40	12.40	4.10	3.11
G38	2	Alive	Alive	16.90	7.30	9.10	4.50
G39	2	Alive	Alive	16.90	7.30	6.70	2.64
G40	2	Alive	Alive	20.10	1.62	2.57	1.36
G41	2	Alive	Alive	36.10	22.60	2.61	1.62
G42	2	Alive	Alive	30.30	15.00	5.07	2.24
G43	3	Alive	Alive	16.40	7.80	3.82	3.69
G44	3	Dead	Alive	10.00	9.20	5.85	3.91
G45	3	Alive	Alive	16.60	8.90	NA	NA
G46	3	Alive	Alive	16.60	8.90	4.72	3.62
G47	3	Alive	Alive	16.60	8.90	NA	4.01
G48	3	Alive	Alive	16.40	13.80	11.83	6.41
G49	3	Alive	Alive	16.60	10.30	1.60	1.54
G50	3	Alive	Dead	16.60	NA	NA	NA
G51	3	Alive	Dead	16.60	NA	2.88	2.82
G52	3	Alive	Alive	19.70	12.40	4.47	4.04
G53	3	Alive	Alive	16.60	10.30	4.80	3.37
G54	3	Alive	Alive	16.60	10.30	6.41	3.10
G55	3	Alive	Alive	19.70	12.40	7.42	6.01
G56	3	Alive	Alive	16.40	13.80	6.56	4.81
G57	3	Dead	Alive	9.40	4.80	NA	NA
G58	3	Alive	Alive	16.40	7.80	4.73	1.60

ANNEXE B

MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE DU CHAPITRE IV

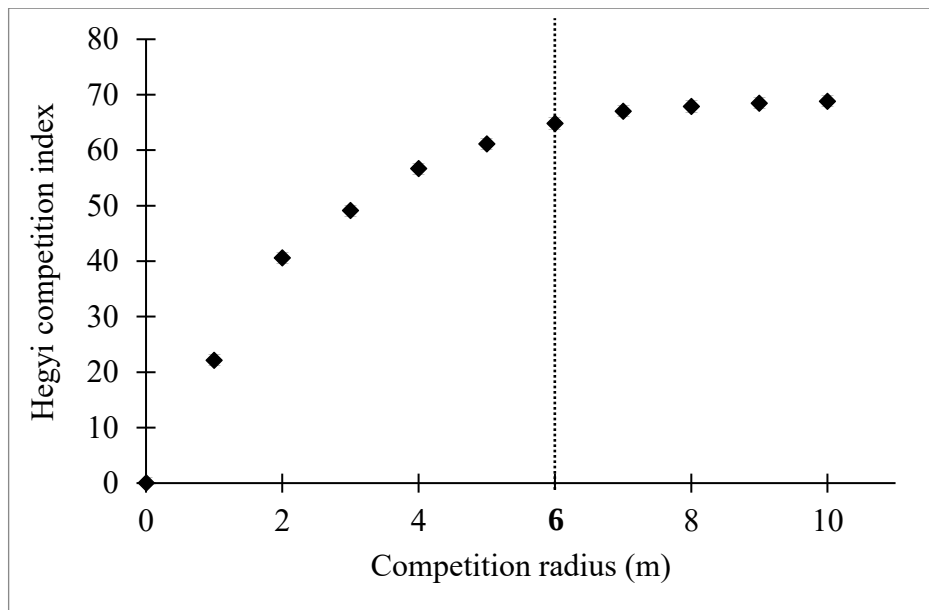


Figure B.1. Selection of the competition radius. Selection of the competition radius. In order to determine the radius around the subject tree in which there are potential competitors, mean Hegyi competition indices were calculated for 10 trees in each site and for 10 years according to different values of radii (from 1 to 10 m).

ANNEXE C

MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE DU CHAPITRE V

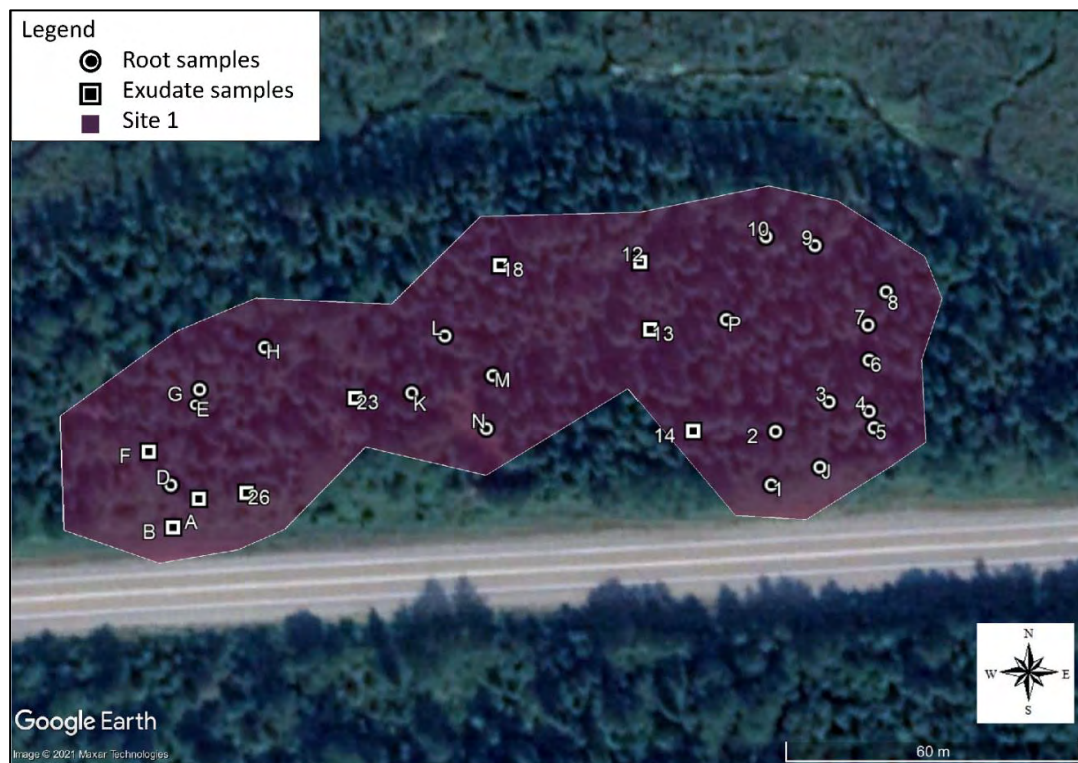


Figure C.1. Map of site 1. The letters indicate pairs of grafted trees while the numbers indicate non-grafted trees. The squares indicate trees where exudates were collected while the circles indicate those where fine roots were collected.

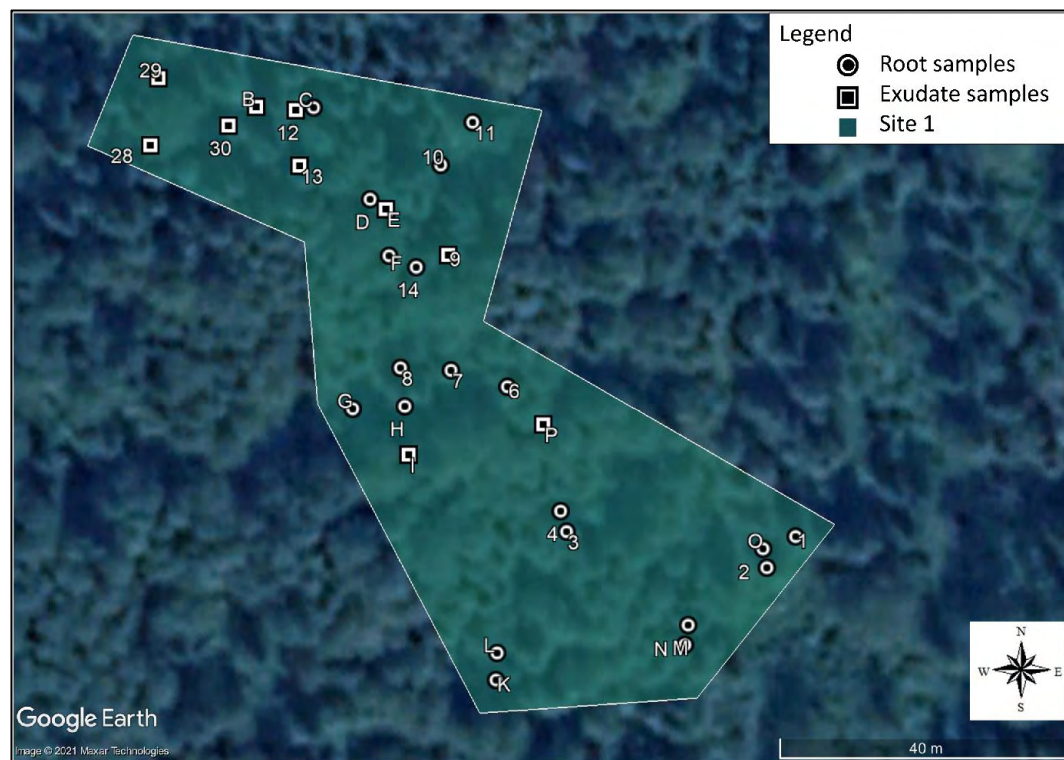


Figure C.2. Map of site 2. The letters indicate pairs of grafted trees while the numbers indicate non-grafted trees. The squares indicate trees where exudates were collected while the circles indicate those where fine roots were collected.

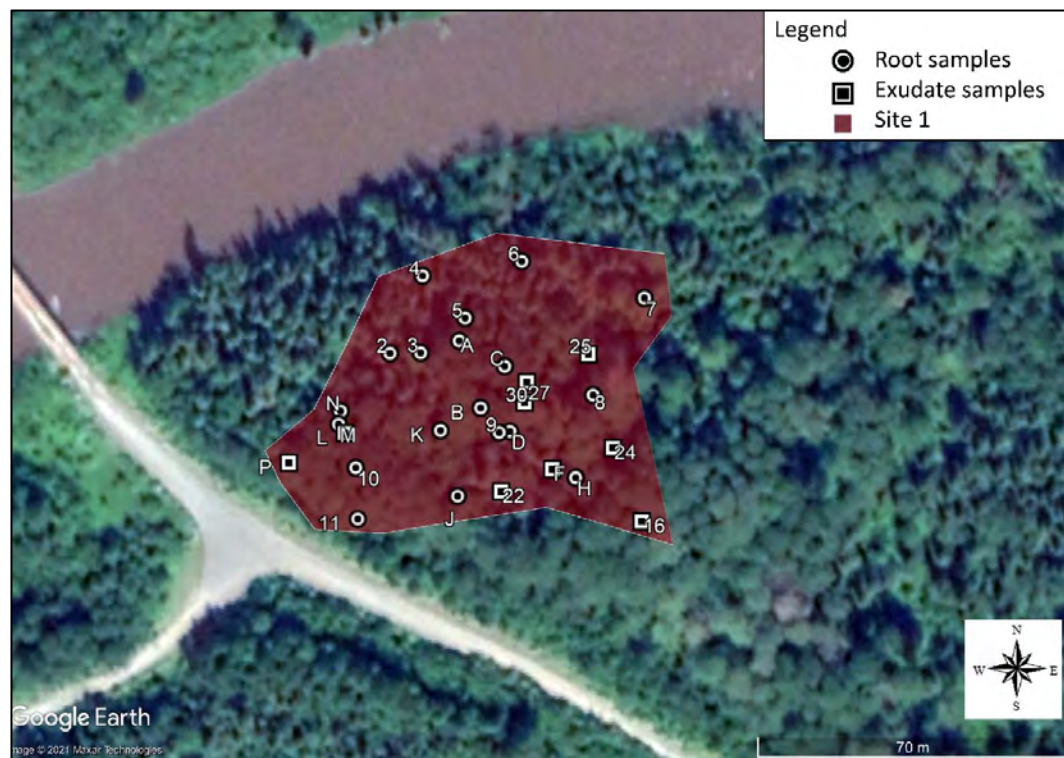


Figure C.3. Map of site 3. The letters indicate pairs of grafted trees while the numbers indicate non-grafted trees. The squares indicate trees where exudates were collected while the circles indicate those where fine roots were collected.

Table C.1. Chromatographic and mass spectrometers (UHPLC ESI QTOF) parameters used for balsam fir (*Abies balsamea*) fine roots and exudates metabolomic analysis.

Chromatographic parameters : Fine root analysis			
Brand	Dionex Ultimate 3000 equipped with RS Pump, autosampler and thermostated column compartment and UV diode array, Thermo Scientific®		
Solvent A	water + 0.1 % Formic acid	Positive and negative mode	
Solvent B	ACN + 0.1 % Formic acid		
Elution rate	0.5 mL.min ⁻¹		
Elution temperature	45 °C		
Column	Luna® Omega Polar C18 column (2.1 mm× 100 mm, 1.6 µm, Phenomenex®)		
Injection Volume	Mode	Positive	0.5 µL
		Negative	0.05 µL
Chromatographic program	Time (min)	% A	% B
	0.000	95	5
	2.000	95	5
	10.000	0	100
	14.000	0	100
	14.010	95	5
	17.000	95	5
Chromatographic parameters : Root exudates analysis			
Brand	Dionex Ultimate 3000 equipped with RS Pump, autosampler and thermostated column compartment and UV diode array, Thermo Scientific®		
Solvent A	water + 0.1 % Formic acid	Negative mode	
Solvent B	ACN + 0.1 % Formic acid		
Elution rate	0.5 mL.min ⁻¹		
Elution temperature	45 °C		
Column	Luna® Omega Polar C18 column (2.1 mm× 100 mm, 1.6 µm, Phenomenex®)		
Injection Volume	Mode	Negative	5 µL
Chromatographic program	Time (min)	% A	% B
	0.000	98	2
	2.000	98	2
	14.000	0	100
	17.000	0	100
	17.010	98	2
	20.000	98	2

Table C.1. Continued

Mass spectrometer parameters		
Brand	Impact II, Bruker Daltonics® equipped with ESI source	
Calibration	Formate/acetate solution before sequence run and for /each sample	<u>Calibration solution :</u> 25 mL ultrapure water 25 mL isopropanol 0.5 mL NaOH solution 1M 25 µL formic acid 75 µL acetic acid
Positive mode		
Nebulizer gas	N ₂	Pressure : 3.5 Bar
Dry gas		Flux : 12.0 L/min
Capillary temperature	200 °C	
Voltage	2500 V	
Negative mode		
Nebulizer gas	N ₂	Pressure : 3.5 Bar
Dry gas		Flux : 12.0 L/min
Capillary temperature	200 °C	
Voltage	3000 V	

Table C.2. Soil characteristics according to the site (Site 1, Site 2 and Site 3). Values are means $\pm$ SE; n = 29. Different letters denote significant differences between the three sites with $a < b < c$.

	Site 1	Site 2	Site 3
pH	4.50 $\pm$ 0.09 a	4.98 $\pm$ 0.06 b	4.47 $\pm$ 0.07 a
TOM(%)	10.29 $\pm$ 0.94 b	6.81 $\pm$ 0.55 a	7.06 $\pm$ 0.50 a
P (mg. g⁻¹)	0.02 $\pm$ 0.002 a	0.04 $\pm$ 0.004 b	0.04 $\pm$ 0.003 b
K (mg. g⁻¹)	0.21 $\pm$ 0.02 b	0.22 $\pm$ 0.02 b	0.12 $\pm$ 0.01 a
Mg (mg. g⁻¹)	0.19 $\pm$ 0.02 b	0.23 $\pm$ 0.02 b	0.09 $\pm$ 0.01 a
Ca (mg. g⁻¹)	1.14 $\pm$ 0.13 b	1.31 $\pm$ 0.09 b	0.56 $\pm$ 0.07 a
Na (mg. g⁻¹)	0.45 $\pm$ 0.1275 c	0.02 $\pm$ 0.0007 b	0.01 $\pm$ 0.0005 a
N (mg. g⁻¹)	4.41 $\pm$ 0.51 b	3.00 $\pm$ 0.24 b	1.94 $\pm$ 0.14 a
C (mg. g⁻¹)	59.68 $\pm$ 5.44 b	39.53 $\pm$ 3.20 a	40.97 $\pm$ 2.89 ab
C:N	15.22 $\pm$ 0.78 a	13.4 $\pm$ 0.42 a	21.78 $\pm$ 0.77 b
Clay (%)	20.63 $\pm$ 3.38 b	31.64 $\pm$ 2.93 c	8.9 $\pm$ 1.13 a
Silt (%)	43.23 $\pm$ 2.34 a	47.68 $\pm$ 1.82 a	50.41 $\pm$ 2.49 a
Sand (%)	36.15 $\pm$ 4.08 b	20.68 $\pm$ 3.17 a	40.7 $\pm$ 3.14 b
CEC (meq.100g⁻¹)	17.69 $\pm$ 1.22 ab	18.87 $\pm$ 0.82 b	14.08 $\pm$ 0.48 a

RÉFÉRENCES

- Adonsou, K. E., DesRochers, A. et Tremblay, F. (2016a). Physiological integration of connected balsam poplar ramets. *Tree Physiology*, 36(7), 797-806. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpv142>
- Adonsou, K. E., DesRochers, A., Tremblay, F., Thomas, B. R. et Isabel, N. (2016b). The clonal root system of balsam poplar in upland sites of Quebec and Alberta. *Ecology and Evolution*, 6(19), 6846-6854. <https://doi.org/10.1002/ece3.2441>
- Adonsou, K. E., Drobyshev, I., DesRochers, A. et Tremblay, F. (2016c). Root connections affect radial growth of balsam poplar trees. *Trees*, 30(5), 1775-1783. <https://doi.org/10.1007/s00468-016-1409-2>
- Association Française de Normalisation (1995). Qualité du sol - Dosage du carbone organique et du carbone total après combustion sèche (analyse élémentaire) (NF ISO 10694) AFNOR, Paris.
- Association Française de Normalisation (1995). Qualité du sol - Dosage du phosphore - Dosage spectrométrique du phosphore soluble dans une solution d'hydrogénocarbonate de sodium. (NF ISO 11263) AFNOR, Paris.
- Association Française de Normalisation (1998). Qualité du sol - Détermination de la teneur totale en azote par combustion sèche ("analyse élémentaire"). (NF ISO 13878) AFNOR, Paris.
- Association Française de Normalisation (1999). Qualité des sols - Détermination des cations Ca^{++} , Mg^{++} , K^{+} , Na^{+} extractibles par l'acétate d'ammonium - Méthode par agitation (AFNOR NF X31-108) AFNOR, Paris.
- Association Française de Normalisation (1999). Qualité des sols-Méthodes chimiques-Détermination de la capacité d'échange cationique (CEC) et des cations extractibles (AFNOR NF X31-130) AFNOR, Paris.
- Association Française de Normalisation (2003). Qualité du sol-Détermination de la Distribution Granulométrique des Particules du sol-Méthode à la Pipette (AFNOR NF X31-107) AFNOR, Paris.

- Association Française de Normalisation (2005). Qualité du sol-Détermination du pH (NF ISO 10390) AFNOR, Paris.
- Alpert, P. et Mooney, H. A. (1986). Resource sharing among ramets in the clonal herb, *Fragaria chiloensis*. *Oecologia*, 70(2), 227-233. <https://doi.org/10.1007/BF00379244>
- Andersson, F. A. et Goodall, D. W. (2005). The boreal forest of North America. Dans *Coniferous Forests* (vol. 6, p. 104-108). Amsterdam, Netherland : Elsevier.
- Armson, K. A. et Driessche, R. V. D. (1959). Natural root grafts in red pine (*Pinus resinosa* ait.). *The Forestry Chronicle*, 35(3), 232-241. <https://doi.org/10.5558/tfc35232-3>
- Bader, M. K.-F. et Leuzinger, S. (2019). Hydraulic coupling of a leafless kauri tree remnant to conspecific hosts. *iScience*, 19, 1238-1247. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.05.009>
- Badri, D. V. et Vivanco, J. M. (2009). Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell & Environment*, 32(6), 666-681. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01926.x>
- Baetz, U. et Martinoia, E. (2014). Root exudates: the hidden part of plant defense. *Trends in Plant Science*, 19(2), 90-98. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.11.006>
- Bais, H. P., Loyola-Vargas, V. M., Flores, H. E. et Vivanco, J. M. (2001). Root-specific metabolism: The biology and biochemistry of underground organs. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 37(6), 730-741. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0122-y>
- Bais, H. P., Park, S.-W., Weir, T. L., Callaway, R. M. et Vivanco, J. M. (2004). How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends in Plant Science*, 9(1), 26-32. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2003.11.008>
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S. et Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 233-266. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>
- Baker, F. S. (1949). A revised tolerance table. *Journal of Forestry*, 47(3), 179-178.
- Barbier, F. F., Dun, E. A. et Beveridge, C. A. (2017). Apical dominance. *Current Biology*, 27(17), 864-865. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.024>

- Baret, M. et DesRochers, A. (2011). Root connections can trigger physiological responses to defoliation in nondefoliated aspen suckers. *Botany*, 89(11), 753-761. <https://doi.org/10.1139/b11-062>
- Baric, S., Kerschbamer, C., Vigl, J. et Dalla Via, J. (2008). Translocation of apple proliferation phytoplasma via natural root grafts – a case study. *European Journal of Plant Pathology*, 121(2), 207-211. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9256-z>
- Barton, K. (2020). MuMIn: Multi-Model Inference. R package version 1.43.17. <https://CRAN.R-project.org/package=MuMIn>
- Basham, J. T., Mook, P. V. et Davidson, A. G. (1953). New information concerning balsam fir decays in eastern North America. *Canadian Journal of Botany*, 31(3), 334-360. <https://doi.org/10.1139/b53-027>
- Basnet, K., Scatena, F. N., Likens, G. E. et Lugo, A. E. (1993). Ecological consequences of root grafting in tabonuco (*Dacryodes excelsa*) trees in the Luquillo experimental forest, Puerto Rico. *Biotropica*, 25(1), 28. <https://doi.org/10.2307/2388976>
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B. et Walker, S. (2020). lme4: Linear Mixed-Effects Models using « Eigen » and S4. R package version 1.1.26. <https://CRAN.R-project.org/package=lme4>
- Bégin, E., Bégin, J., Bélanger, L., Rivest, L.-P. et Tremblay, S. (2001). Balsam fir self-thinning relationship and its constancy among different ecological regions. *Revue canadienne de recherche forestière*, 31(6), 950-959.
- Bergeron, Y., Camiré, C., Bouchard, A. et Gangloff, P. (2007). Analyse et classification des sols pour une étude écologique intégrée d'un secteur de l'Abitibi, Québec. *Géographie physique et Quaternaire*, 36(3), 291-305. <https://doi.org/10.7202/032482ar>
- Bergeron, Y., Flannigan, M., Gauthier, S., Leduc, A. et Lefort, P. (2004). Past, Current and Future Fire Frequency in the Canadian Boreal Forest: Implications for Sustainable Forest Management. *A Journal of the Human Environment*, 33(6), 356-360. <https://doi.org/10.1579/0044-7447-33.6.356>
- Bergh, J. et Linder, S. (1999). Effects of soil warming during spring on photosynthetic recovery in boreal Norway spruce stands. *Global Change Biology*, 5(3), 245-253. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2486.1999.00205.x>
- Berntson, G. M. (1994). Modelling root architecture: are there tradeoffs between efficiency and potential of resource acquisition? *New Phytologist*, 127(3), 483-493. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb03966.x>

- Bertin, C., Yang, X. et Weston, L. A. (2003). The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant and Soil*, 256(1), 67-83. <https://doi.org/10.1023/A:1026290508166>
- Bertness, M. D. et Callaway, R. (1994). Positive interactions in communities. *Trends in Ecology & Evolution*, 9(5), 191-193. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(94\)90088-4](https://doi.org/10.1016/0169-5347(94)90088-4)
- Bianchi, S., Gloess, A. N., Krosiakova, I., Mayer, I. et Pichelin, F. (2014). Analysis of the structure of condensed tannins in water extracts from bark tissues of Norway spruce (*Picea abies* [Karst.]) and Silver fir (*Abies alba* [Mill.]) using MALDI-TOF mass spectrometry. *Industrial Crops and Products*, 61, 430-437. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.07.038>
- Biging, G. S. et Dobbertin, M. (1995). Evaluation of competition indices in individual tree growth models. *Forest Science*, 41(2), 360-377. <https://doi.org/10.1093/forestscience/41.2.360>
- Biondi, F. et Qeadan, F. (2008). A theory-driven approach to tree-ring standardization: defining the biological trend from expected Basal Area Increment. *Tree-Ring Research*, 64(2), 81-96. <https://doi.org/10.3959/2008-6.1>
- Bonan, G. B. et Shugart, H. H. (1989). Environmental factors and ecological processes in boreal forests. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 20(1), 1-28. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.20.110189.000245>
- Bormann, F. H. (1961). Intraspecific root grafting and the survival of eastern white pine stumps. *Forest Science*, 7(3), 247-256. <https://doi.org/10.1093/forestscience/7.3.247>
- Bormann, F. H. (1966). The structure, function, and ecological significance of root grafts in *Pinus strobus* L. *Ecological Monographs*, 36(1), 1-26. <https://doi.org/10.2307/1948486>
- Bormann, F. H. et Graham, B. F. (1959). The occurrence of natural root grafting in eastern white pine, *Pinus Strobus* L., and its ecological implications. *Ecology*, 40(4), 677-691. <https://doi.org/10.2307/1929820>
- Bormann, F. H. et Graham, B. F. (1960). Translocation of silvicides through root grafts. *Journal of Forestry*, 58(5), 402-403.
- Bormann, F. H. et Graham, B. F. (1966). Natural Root Grafts. *Botanical Review*, 32(3), 255-292.

- Bouchard, M., Kneeshaw, D. et Bergeron, Y. (2006). Forest dynamics after successive spruce budworm outbreaks in mixedwood forests. *Ecology*, 87(9), 2319-2329. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2006\)87\[2319:FDASSB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2006)87[2319:FDASSB]2.0.CO;2)
- Boys, J., Cherry, M. et Dayanandan, S. (2005). Microsatellite analysis reveals genetically distinct populations of red pine (*Pinus resinosa*, *Pinaceae*). *American Journal of Botany*, 92(5), 833-841. <https://doi.org/10.3732/ajb.92.5.833>
- Brakni, R., Ali Ahmed, M., Burger, P., Schwing, A., Michel, G., Pomares, C., Hasseine, L., Boyer, L., Fernandez, X., Landreau, A. et Michel, T. (2018). UHPLC-HRMS/MS based profiling of Algerian lichens and their antimicrobial activities. *Chemistry & Biodiversity*, 15(4), e1800031. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201800031>
- Brandt, J. P., Flannigan, M. D., Maynard, D. G., Thompson, I. D. et Volney, W. J. A. (2013). An introduction to Canada's boreal zone: ecosystem processes, health, sustainability, and environmental issues. *Environmental Reviews*, 21(4), 207-226. <https://doi.org/10.1139/er-2013-0040>
- Breheny, P. et Burchett, W. (2017). Visualization of regression models using visreg. *The R Journal*, 9(2), 56-66. <https://doi.org/10.32614/RJ-2017-046>
- Brooker, R. W. (2006). Plant-plant interactions and environmental change. *New Phytologist*, 171(2), 271-284. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01752.x>
- Brooker, R. W., Maestre, F. T., Callaway, R. M., Lortie, C. L., Cavieres, L. A., Kunstler, G., Liancourt, P., Tielbörger, K., Travis, J. M. J., Anthelme, F., Armas, C., Coll, L., Corcket, E., Delzon, S., Forey, E., Kikvidze, Z., Olofsson, J., Pugnaire, F., Quiroz, C. L., ... Michalet, R. (2008). Facilitation in plant communities: The Past, the Present, and the Future. *Journal of Ecology*, 96(1), 18-34. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2007.01295.x>
- Brown, J. K. et DeByle, N. V. (1987). Fire damage, mortality, and suckering in aspen. *Canadian Journal of Forest Research*, 17(9), 1100-1109. <https://doi.org/10.1139/x87-168>
- Brunner, I., Brodbeck, S. et Walthert, L. (2002). Fine root chemistry, starch concentration, and 'vitality' of subalpine conifer forests in relation to soil pH. *Forest Ecology and Management*, 165(1-3), 75-84. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(01\)00633-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(01)00633-8)

- Burns, R. M. et Honkala, B. H. (1990). *Silvics of North America*. (Agriculture Handbook, vol. 1. Conifers.). Washington : United States Department of Agriculture (USDA), Forest Service.
- Callaway, R. M. et Mahall, B. E. (2007). Family roots. *Nature*, 448(12), 145-146.
- Canadian Agricultural Services Coordinating Committee (1998). *The Canadian system of soil classification* (3e éd.). Ontario : NRC Research Press. <https://doi.org/10.1139/9780660174044>
- Cauboue, M. (2007). *Description écologique des forêts du Québec*. Montréal : Centre collégial de développement de matériel didactique.
- Cavard, X., Bergeron, Y., Chen, H. Y. H., Paré, D., Laganière, J. et Brassard, B. (2011). Competition and facilitation between tree species change with stand development. *Oikos*, 120(11), 1683-1695. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2011.19294.x>
- Chapin, F. S. et Danell, K. (2001). Boreal Forest. Dans F. S. Chapin, O. E. Sala et E. Huber-Sannwald (dir.), *Global Biodiversity in a Changing Environment* (vol. 152, p. 101-120). New York: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0157-8_6
- Chen, L.-C., Wang, S.-L., Wang, P. et Kong, C.-H. (2014). Autoinhibition and soil allelochemical (cyclic dipeptide) levels in replanted Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) plantations. *Plant and Soil*, 374(1-2), 793-801. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1914-7>
- Chishaki, N. et Horiguchi, T. (1997). Responses of secondary metabolism in plants to nutrient deficiency. Dans T. Ando, K. Fujita, T. Mae, H. Matsumoto, S. Mori et J. Sekiya (dir.), *Plant nutrition for sustainable food production and environment* (p. 341-345). Netherlands: Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0047-9_101
- Chomel, M., Fernandez, C., Bousquet-Mélou, A., Gers, C., Monnier, Y., Santonja, M., Gauquelin, T., Gros, R., Lecareux, C. et Baldy, V. (2014). Secondary metabolites of *Pinus halepensis* alter decomposer organisms and litter decomposition during afforestation of abandoned agricultural zones. *Journal of Ecology*, 102(2), 411-424. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12205>
- Chong, J., Soufan, O., Li, C., Caraus, I., Li, S., Bourque, G., Wishart, D. S. et Xia, J. (2018). MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W486-W494. <https://doi.org/10.1093/nar/gky310>

- Connell, J. H. (1990). Apparent *versus* “real” competition in plants. Dans *Perspectives on plant competition* (p. 9-26). Minnesota: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-294452-9.50006-0>
- Connolly, J. et Wayne, P. (1996). Asymmetric competition between plant species. *Oecologia*, 108(2), 311-320. <https://doi.org/10.1007/BF00334656>
- Contreras, M. A., Affleck, D. et Chung, W. (2011). Evaluating tree competition indices as predictors of basal area increment in western Montana forests. *Forest Ecology and Management*, 262(11), 1939-1949. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2011.08.031>
- Cook, D. B. et Welch, D. S. (1957). Backflash damage to residual stands incident to chemi-peeling. *Journal of Forestry*, 55(4), 265-267.
- Coutts, M. P., Nielsen, C. C. N. et Nicoll, B. C. (1999). The development of symmetry, rigidity and anchorage in the structural root system of conifers. *Plant and Soil*, 217(1/2), 1-15.
- Crozier, A., Jaganath, I. B. et Clifford, M. N. (2006). Phenols, polyphenols and tannins: an overview. Dans A. Crozier, M. N. Clifford et H. Ashihara (dir.), *Plant Secondary Metabolites* (p. 1-24). Oxford: Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470988558.ch1>
- Cyr, D., Gauthier, S., Bergeron, Y. et Carcaillet, C. (2009). Forest management is driving the eastern North American boreal forest outside its natural range of variability. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 7(10), 519-524. <https://doi.org/10.1890/080088>
- Da Silva, R. R., Dorrestein, P. C. et Quinn, R. A. (2015). Illuminating the dark matter in metabolomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(41), 12549-12550. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516878112>
- De Kroon, H. (2007). How do roots interact? *Science*, 318(5856), 1562-1563. <https://doi.org/10.1126/science.1150726>
- DesRochers, A. et Gagnon, R. (1997). Is ring count at ground level a good estimation of black spruce age? *Canadian Journal of Forest Research*, 27, 1263-1267.
- DesRochers, A. et Lieffers, V. J. (2001). The coarse-root system of mature *Populus tremuloides* in declining stands in Alberta, Canada. *Journal of Vegetation Science*, 12(3), 355-360. <https://doi.org/10.2307/3236849>

- DeWoody, J., Rowe, C. A., Hipkins, V. D. et Mock, K. E. (2008). “Pando” lives: molecular genetic evidence of a giant aspen clone in Central Utah. *Western North American Naturalist*, 68(4), 493-497. <https://doi.org/10.3398/1527-0904-68.4.493>
- Dixon, P. (2003). VEGAN, a package of R functions for community ecology. *Journal of Vegetation Science*, 14(6), 927-930. <https://doi.org/10.1111/j.1654-1103.2003.tb02228.x>
- Dixon, R. A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411(6839), 843-847. <https://doi.org/10.1038/35081178>
- Dosen, R. C. et Iyer, J. G. (1979). Effect of grafted roots of stumps on the growth of a thinned red pine plantation. *Tree Planters Notes*, 30(2), 1-3.
- Duchesne, L. et Houle, D. (2011). Modelling day-to-day stem diameter variation and annual growth of balsam fir (*Abies balsamea* (L.) Mill.) from daily climate. *Forest Ecology and Management*, 262(5), 863-872. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2011.05.027>
- Duchesneau, R., Lesage, I., Messier, C. et Morin, H. (2001). Effects of light and intraspecific competition on growth and crown morphology of two size classes of understory balsam fir saplings. *Forest Ecology and Management*, 140(2-3), 215-225. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(00\)00281-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(00)00281-4)
- Duperat, M., Gardiner, B. et Ruel, J.-C. (2021). Testing an individual tree wind damage risk model in a naturally regenerated balsam fir stand: potential impact of thinning on the level of risk. *Forestry: An International Journal of Forest Research*, 94(1), 141-150. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpaa023>
- Eis, S. (1972). Root grafts and their silvicultural implications. *Revue canadienne de recherche forestière*, 2(2), 111-120. <https://doi.org/10.1139/x72-022>
- Elwes, H. J. et Henry, A. (1909). *The trees of Great Britain and Ireland* (vol. 7). Cambridge: University Press.
- Environment and Natural Resources Canada, 2018. Canadian climate normal 1981–2010 station data. https://climat.meteo.gc.ca/climate_normals/results_1981_2010_f.html?searchType=stnName&txtStationName=amos&searchMethod=contains&txtCentralLatMin=0&txtCentralLatSec=0&txtCentralLongMin=0&txtCentralLongSec=0&stnID=6019&dispBack=1 (consulté le 17 Oct 2018).

- Epstein, A. H. (1978). Root graft transmission of tree pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 16(1), 181-192. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.16.090178.001145>
- Escudero, N., Marhuenda-Egea, F. C., Ibanco-Cañete, R., Zavala-Gonzalez, E. A. et Lopez-Llorca, L. V. (2014). A metabolomic approach to study the rhizodeposition in the tritrophic interaction: tomato, *Pochonia chlamydosporia* and *Meloidogyne javanica*. *Metabolomics*, 10(5), 788-804. <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0632-3>
- Eshel, A. et Beeckman, T. (2013). *Plant roots : the hidden half* (4e éd.). New York: CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b14550>
- Fabre, N., Rustan, I., Hoffmann, E. et Quetin-Leclercq, J. (2001). Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 12(6), 707-715. [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(01\)00226-4](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(01)00226-4)
- Falik, O., Reides, P., Gersani, M. et Novoplansky, A. (2005). Root navigation by self inhibition. *Plant, Cell and Environment*, 28(4), 562-569. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01304.x>
- Fernandez, C., Voiriot, S., Mévy, J.-P., Vila, B., Ormeño, E., Dupouyet, S. et Bousquet-Mélou, A. (2008). Regeneration failure of *Pinus halepensis* Mill.: The role of autotoxicity and some abiotic environmental parameters. *Forest Ecology and Management*, 255(7), 2928-2936. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2008.01.072>
- Flores, H. (1999). « Radicle » biochemistry: the biology of root-specific metabolism. *Trends in Plant Science*, 4(6), 220-226. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(99\)01411-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(99)01411-9)
- Folin, O. et Denis, W. (1915). A colorimetric method for the determination of phenols (and phenol derivatives) in urine. *Journal of Biological Chemistry*, 22(2), 305-308.
- Fox, J., Weisberg, S., Price, B., Friendly, M., Hong, J., Andersen, R., Firth, D., Taylor, S. et R Core Team. (2020). effects: Effect displays for linear, generalized linear, and other models (version 4.2-0). <https://CRAN.R-project.org/package=effects>
- Fraser, E. C., Lieffers, V. J. et Landhäusser, S. M. (2005). Age, stand density, and tree size as factors in root and basal grafting of lodgepole pine. *Canadian Journal of Botany*, 83(8), 983-988. <https://doi.org/10.1139/b05-048>

- Fraser, E. C., Lieffers, V. J. et Landhausser, S. M. (2006). Carbohydrate transfer through root grafts to support shaded trees. *Tree Physiology*, 26(8), 1019-1023. <https://doi.org/10.1093/treephys/26.8.1019>
- Freckleton, R. P. et Watkinson, A. R. (2001). Asymmetric competition between plant species. *Functional Ecology*, 15(5), 615-623. <https://doi.org/10.1046/j.0269-8463.2001.00558.x>
- Friedrich, W., Eberhardt, A. et Galensa, R. (2000). Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry. *European Food Research and Technology*, 211(1), 56-64. <https://doi.org/10.1007/s002170050589>
- Gallet, C. et Pellissier, F. (1997). Phenolic compounds in natural solutions of a coniferous forest. *Journal of Chemical Ecology*, 23(10), 2401-2412. <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000006682.50061.83>
- Gargallo-Garriga, A., Preece, C., Sardans, J., Oravec, M., Urban, O. et Peñuelas, J. (2018). Root exudate metabolomes change under drought and show limited capacity for recovery. *Scientific Reports*, 8(1), 12696. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30150-0>
- Gaspard, D. T. et DesRochers, A. (2020). Natural root grafting in hybrid poplar clones. *Trees*, 34(4), 881-890. <https://doi.org/10.1007/s00468-020-01966-z>
- Gauthier, S., Bernier, P., Kuuluvainen, T., Shvidenko, A. Z. et Schepaschenko, D. G. (2015). Boreal forest health and global change. *Science*, 349(6250), 819-822. <https://doi.org/10.1126/science.aaa9092>
- Goldblum, D. et Rigg, L. S. (2011). Tree growth response to climate change at the deciduous–boreal forest ecotone, Ontario, Canada. *Canadian Journal of Forest Research*, 35(11), 2709-2718. <https://doi.org/10.1139/x05-185>
- Gordon, D. E. et Roth, L. F. (1976). Root grafting of port-orford-cedar—An infection route for root rot. *Forest Science*, 22(3), 276-278. <https://doi.org/10.1093/forestscience/22.3.276>
- Gorham, J. et Coughlan, S. (1980). Inhibition of photosynthesis by stilbenoids. *Phytochemistry*, 19(10), 2059-2064. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82194-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82194-9)
- Graham, B. F. (1960). Transfer of dye through natural root grafts of *Pinus Strobus* L. *Ecology*, 41(1), 56-64. <https://doi.org/10.2307/1931939>
- Grondin, P., Ansseau, C., Bélanger, L., Bergeron, J., Bergeron, Y., Bouchard, A., Brisson, J., De Grandpré, L., Gagnon, G. et Lavoie, C. (1996). Cadre

bioclimatique de référence des régions écologiques du Québec. *Manuel de Foresterie. Les Presses de l'Université Laval*, 134-279.

- Haichar, F. el Z., Santaella, C., Heulin, T. et Achouak, W. (2014). Root exudates mediated interactions belowground. *Soil Biology and Biochemistry*, 77, 69-80. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.06.017>
- Hartmann, T. (2007). From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2831-2846. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.09.017>
- Havranek, W. M. et Tranquillini, W. (1995). Physiological processes during winter dormancy and their ecological significance. Dans W. K. Smith et T. M. Hinckley (dir.), *Ecophysiology of coniferous forests* (p. 95-124). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-092593-6.50010-4>
- Hedden, P. et Sponsel, V. (2015). A century of gibberellin research. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34(4), 740-760. <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9546-1>
- Hegyí, F. (1974). A simulation model for managing jack-pine stands. Dans J. Fries *Growth models for tree and stand simulation* (p. 74-90). Sweden: Royal College of Forestry.
- Helluy, M., Prévosto, B., Cailleret, M., Fernandez, C. et Balandier, P. (2020). Competition and water stress indices as predictors of *Pinus halepensis* Mill. radial growth under drought. *Forest Ecology and Management*, 460, 117877. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2020.117877>
- Hierro, J. L. et Callaway, R. M. (2021). The ecological importance of allelopathy. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 52. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-051120-030619>
- Hothorn, T., Bretz, F., Westfall, P., Heiberger, R. M., Schuetzenmeister, A. et Scheibe, S. (2021). multcomp: Simultaneous inference in general parametric models (version 1.4-17). <https://CRAN.R-project.org/package=multcomp>
- Huang, X.-F., Chaparro, J. M., Reardon, K. F., Zhang, R., Shen, Q. et Vivanco, J. M. (2014). Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. *Botany*, 92(4), 267-275. <https://doi.org/10.1139/cjb-2013-0225>
- Husson, F., Josse, J., Le, S. et Mazet, J. (2020). FactoMineR: Multivariate Exploratory Data Analysis and Data Mining (version 2.4). <https://CRAN.R-project.org/package=FactoMineR>

- Inderjit et Weston, L. A. (2003). Root exudates: an overview. Dans H. de Kroon et E. J. W. Visser (dir.), *Root ecology* (vol. 168, p. 235-255). Berlin : Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-662-09784-7_10
- Inderjit, Dakshini, K. M. M. et Einhellig, F. A. (dir.). (1994). Allelopathy: organisms, processes, and applications (vol. 582). *American Chemical Society*. <https://doi.org/10.1021/bk-1995-0582>
- Jelinkova, H., Tremblay, F. et DesRochers, A. (2009). Molecular and dendrochronological analysis of natural root grafting in *Populus tremuloides* (Salicaceae). *American Journal of Botany*, 96(8), 1500-1505. <https://doi.org/10.3732/ajb.0800177>
- Jelinkova, H., Tremblay, F. et Desrochers, A. (2012). Herbivore-simulated induction of defenses in clonal networks of trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Tree Physiology*, 32(11), 1348-1356. <https://doi.org/10.1093/treephys/tps094>
- Jepson, W. L. (1923). *The trees of California*. San Francisco : University of Michigan Press.
- Jiang, Y., Liu, Y., Guo, Q., Xu, C., Zhu, C. et Shi, J. (2016). Sesquiterpene glycosides from the roots of *Codonopsis pilosula*. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 6(1), 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.09.007>
- Jobidon, R. (1986). Allelopathic potential of coniferous species to old-field weeds in eastern Quebec. *Forest Science*, 32(1), 112-118. <https://doi.org/10.1093/forestscience/32.1.112>
- Kebrom, T. H. (2017). A growing stem inhibits bud outgrowth – the overlooked theory of apical dominance. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1874. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01874>
- Keeley, J. E. (1988). Population variation in root grafting and a hypothesis. *Oikos*, 52(3), 364-366. <https://doi.org/10.2307/3565212>
- Klein, T., Siegwolf, R. T. W. et Korner, C. (2016). Belowground carbon trade among tall trees in a temperate forest. *Science*, 352(6283), 342-344. <https://doi.org/10.1126/science.aad6188>
- Kong, C. H., Chen, L. C., Xu, X. H., Wang, P. et Wang, S. L. (2008). Allelochemicals and activities in a replanted chinese fir (*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook) *Tree Ecosystem. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(24), 11734-11739. <https://doi.org/10.1021/jf802666p>

- Körner, C. (2011). The grand challenges in functional plant ecology. *Frontiers in Plant Science*, 2, 1-3. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00001>
- Krasny, M. E. et Johnson, E. A. (1992). Stand development in aspen clones. *Canadian Journal of Forest Research*, 22(9), 1424-1429. <https://doi.org/10.1139/x92-190>
- Krause, C. et Morin, H. (1995). Changes in radial increment in stems and roots of balsam fir (*Abies balsamea* (L.) Mill.) after defoliation spruce budworm. *The Forestry Chronicle*, 71(6), 747-754. <https://doi.org/10.5558/tfc71747-6>
- Küllä, T. et Löhmnus, K. (1999). Influence of cultivation method on root grafting in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Plant and Soil*, 217, 91-100. https://doi.org/10.1007/978-94-017-3469-1_10
- Kunstler, G., Falster, D., Coomes, D. A., Hui, F., Kooyman, R. M., Laughlin, D. C., Poorter, L., Vanderwel, M., Vieilledent, G., Wright, S. J., Aiba, M., Baraloto, C., Caspersen, J., Cornelissen, J. H. C., Gourlet-Fleury, S., Hanewinkel, M., Herault, B., Kattge, J., Kurokawa, H., ... Westoby, M. (2016). Plant functional traits have globally consistent effects on competition. *Nature*, 529(7585), 204-207. <https://doi.org/10.1038/nature16476>
- Kunstler, G., Lavergne, S., Courbaud, B., Thuiller, W., Vieilledent, G., Zimmermann, N. E., Kattge, J. et Coomes, D. A. (2012). Competitive interactions between forest trees are driven by species trait hierarchy, not phylogenetic or functional similarity: implications for forest community assembly. *Ecology Letters*, 15(8), 831-840. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2012.01803.x>
- Kuntz, J. E. et Riker, A. J. (1956). The use of radioactive isotopes to ascertain the role of root grafting in the translocation of water, nutrients, and disease-inducing organisms among forest trees. In Proceedings of the international conference on the peaceful uses of atomic energy, Geneva, Switzerland (pp. 144-148).
- Kuznetsova, A., Brockhoff, P. B., Christensen, R. H. B. et Jensen, S. P. (2020). lmerTest: Tests in Linear Mixed Effects Models (version 3.1-3). <https://CRAN.R-project.org/package=lmerTest>
- Lamb, E. G., Kembel, S. W. et Cahill, J. F. (2009). Shoot, but not root, competition reduces community diversity in experimental mesocosms. *Journal of Ecology*, 97(1), 155-163. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2008.01454.x>

- Lanner, R. M. (1961). Living Stumps in the Sierra Nevada. *Ecology*, 42(1), 170-173. <https://doi.org/10.2307/1933281>
- Larue, C. D. (1952). Root-grafting in tropical trees. *Science*, 115(2985), 296. <https://doi.org/10.1126/science.115.2985.296>
- Lavoie, J., Montoro Girona, M. et Morin, H. (2019). Vulnerability of conifer regeneration to spruce budworm outbreaks in the eastern canadian boreal forest. *Forests*, 10(10), 850. <https://doi.org/10.3390/f10100850>
- Lavoie, S. (2015). *Isolement et caractérisation de principes actifs d'Abies balsamea et de Cornus canadensis* [Thèse de doctorat, Université du Québec à Chicoutimi]. <https://constellation.uqac.ca/4002/>
- Lavoie, S., Legault, J., Gauthier, C., Mshvildadze, V., Mercier, S. et Pichette, A. (2012). Abibalsamins A and B, two new Tetraterpenoids from *Abies balsamea* oleoresin. *Organic letters*, 14, 1504-1507. <https://doi.org/10.1021/ol300237f>
- Leake, J., Johnson, D., Donnelly, D., Muckle, G., Boddy, L. et Read, D. (2004). Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Canadian Journal of Botany*, 82(8), 1016-1045. <https://doi.org/10.1139/b04-060>
- Levdansky, V. A., Kondrasenko, A. A., Levdansky, A. V. ; et Lutoshkin, M. A. (2019). Isolation and study of abies bark proanthocyanidins. *Journal of Siberian Federal University. Chemistry*, 12(4), 604-613. <https://doi.org/10.17516/1998-2836-0155>
- Levizou, E., Karageorgou, P., Petropoulou, Y., Grammatikopoulos, G. et Manetas, Y. (2004). Induction of ageotropic response in lettuce radicle growth by epicuticular flavonoid aglycons of *Dittrichia viscosa*. *Biologia plantarum*, 48(2), 305-307. <https://doi.org/10.1023/B:BIOP.0000033462.71065.93>
- Lev-Yadun, S. (2011). Why should trees have natural root grafts? *Tree Physiology*, 31(6), 575-578. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpr061>
- Lin, C., Owen, S. et Penuelas, J. (2007). Volatile organic compounds in the roots and rhizosphere of *Pinus* spp. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(4), 951-960. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.11.007>
- Liu, Y. H., Zeng, R. S., An, M., Mallik, A. U. et Luo, S. M. (2008). Autotoxicity in agriculture and forestry. Dans R. S. Zeng, A. U. Mallik et S. M. Luo (dir.), *Allelopathy in sustainable agriculture and forestry* (p. 283-301). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77337-7_15

- Loehle, C. et Jones, R. H. (1990). Adaptive significance of root grafting in trees. *Functional Ecology*, 4(2), 268-271.
- Lorimer, C. G. (1983). Tests of age-independent competition indices for individual trees in natural hardwood stands. *Forest Ecology and Management*, 6(4), 343-360. [https://doi.org/10.1016/0378-1127\(83\)90042-7](https://doi.org/10.1016/0378-1127(83)90042-7)
- Lortie, C. J., Brooker, R. W., Choler, P., Kikvidze, Z., Michalet, R., Pugnaire, F. I. et Callaway, R. M. (2004). Rethinking plant community theory. *Oikos*, 107(2), 433-438. <https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2004.13250.x>
- MacFarlane, D. W. et Kobe, R. K. (2006). Selecting models for capturing tree-size effects on growth resource relationships. *Canadian Journal of Forest Research*, 36(7), 1695-1704. <https://doi.org/10.1139/x06-054>
- Macias, F. A., Galindo, J. C. G. et Molinillo, J. M. G. (2003). *Allelopathy: chemistry and mode of action of allelochemicals*. Boca Raton: CRC Press.
- MacLean, D. A. (1984). Effects of spruce budworm outbreaks on the productivity and stability of balsam fir forests. *The Forestry Chronicle*, 60(5), 273-279. <https://doi.org/10.5558/tfc60273-5>
- Makinen, H. (2004). Thinning intensity and growth of Norway spruce stands in Finland. *Forestry*, 77(4), 349-364. <https://doi.org/10.1093/forestry/77.4.349>
- Manninen, A.-M., Tarhanen, S., Vuorinen, M. et Kainulainen, P. (2002). Comparing the variation of needle and wood terpenoids in scots pine provenances. *Journal of Chemical Ecology*, 28(1), 211-228. <https://doi.org/10.1023/A:1013579222600>
- Martin, M., Morin, H. et Fenton, N. J. (2019). Secondary disturbances of low and moderate severity drive the dynamics of eastern Canadian boreal old-growth forests. *Annals of Forest Science*, 76(4), 108. <https://doi.org/10.1007/s13595-019-0891-2>
- Masike, K., Mhlongo, M. I., Mudau, S. P., Nobela, O., Ncube, E. N., Tugizimana, F., George, M. J. et Madala, N. E. (2017). Highlighting mass spectrometric fragmentation differences and similarities between hydroxycinnamoyl-quinic acids and hydroxycinnamoyl-isocitric acids. *Chemistry Central Journal*, 11(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0262-8>
- Mazerolle, M. J. (2020). AICcmodavg: model selection and multimodel inference based on (Q)AIC(c) (version 2.3-1). <https://CRAN.R-project.org/package=AICcmodavg>

- Mbakidi-Ngouaby, H. (2017). Métabolites de *Pseudotsuga menziesii*: approche métabolomique et rôle dans la résistance [Thèse de doctorat, Université Limoges]. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01662455/document>
- McCarthy, J. W. et Weetman, G. (2007). Self-thinning dynamics in a balsam fir (*Abies balsamea* (L.) Mill.) insect-mediated boreal forest chronosequence. *Forest Ecology and Management*, 241(1-3), 295-309. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2007.01.001>
- McIntire, E. J. B. et Fajardo, A. (2011). Facilitation within species: a possible origin of group-selected superorganisms. *The American Naturalist*, 178(1), 88-97. <https://doi.org/10.1086/660286>
- McIntire, E. J. B. et Fajardo, A. (2014). Facilitation as a ubiquitous driver of biodiversity. *New Phytologist*, 201(2), 403-416. <https://doi.org/10.1111/nph.12478>
- Melnyk, C. W. et Meyerowitz, E. M. (2015). Plant grafting. *Current Biology*, 25(5), R183-R188. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.01.029>
- Messier, C., Doucet, R., Ruel, J.-C., Claveau, Y., Kelly, C. et Lechowicz, M. J. (1999). Functional ecology of advance regeneration in relation to light in boreal forests. *Canadian Journal of Forest Research*, 29(6), 812-823. <https://doi.org/10.1139/x99-070>
- Michalet, S., Rohr, J., Warshan, D., Bardon, C., Roggy, J.-C., Domenach, A.-M., Czarnes, S., Pommier, T., Combourieu, B., Guillaumaud, N., Bellvert, F., Comte, G. et Poly, F. (2013). Phytochemical analysis of mature tree root exudates *in situ* and their role in shaping soil microbial communities in relation to tree N-acquisition strategy. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, 169-177. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.003>
- Michel, T., Khelif, I., Kanakis, P., Termentzi, A., Allouche, N., Halabalaki, M. et Skaltsounis, A.-L. (2015). UHPLC-DAD-FLD and UHPLC-HRMS/MS based metabolic profiling and characterization of different *Olea europaea* organs of Koroneiki and Chetoui varieties. *Phytochemistry Letters*, 11, 424-439. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.12.020>
- Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune du Québec (MRNF) (2009). *Ressources et industries forestières – Édition complète*. Québec: Direction du développement de l'industrie des produits forestiers.
- Mommer, L., Kirkegaard, J. et van Ruijven, J. (2016). Root–root interactions: towards a rhizosphere framework. *Trends in Plant Science*, 21(3), 209-217. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.009>

- Morin, H. (1994). Dynamics of balsam fir forests in relation to spruce budworm outbreaks in the Boreal Zone of Quebec. *Canadian Journal of Forest Research*, (24)4, 730-741. <https://doi.org/10.1139/x94-097>
- Morin, H. et Laprise, D. (1997). Seedling bank dynamics in boreal balsam fir forests. *Canadian Journal of Forest Research*, 27(9), 1442-1451.
- Morin, H., Laprise, D. et Bergeron, Y. (1993). Chronology of spruce budworm outbreaks near Lake Duparquet, Abitibi region, Québec. *Canadian Journal of Forest Research*, 23(8), 1497-1506.
- Morris, R. F. (1948). How old is balsam tree? *The Forestry Chronicle*, 24(2), 106-110. <https://doi.org/10.5558/tfc24106-2>
- Mudge, K., Janick, J., Scofield, S. et Goldschmidt, E. E. (2009). A history of grafting. Dans J. Janick (dir.), *Horticultural Reviews* (p. 437-493). Hoboken: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780470593776.ch9>
- Mukerji, K. G., Manoharachary, C. et Singh, J. (dir.). (2006). *Microbial activity in the rhizosphere*. Delhi: Springer.
- Nardi, S., Concheri, G., Pizzeghello, D., Sturaro, A., Rella, R. et Parvoli, G. (2000). Soil organic matter mobilization by root exudates. *Chemosphere*, 41(5), 653-658. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00488-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00488-9)
- Neumann, G. et Romheld, V. (2000). The release of root exudates as affected by the plant's physiological status. Dans S. Willig, Z. Varanini et P. Nannipieri (dir.), *The rhizosphere* (p. 54-66). Boca Raton: CRC Press.
- O'Neal, E. S. et Davis, D. D. (2015). Intraspecific root grafts and clonal growth within *Ailanthus altissima* stands influence *verticillium nonalfalfae* transmission. *Plant Disease*, 99(8), 1070-1077. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-14-0722-RE>
- Oburger, E. et Jones, D. L. (2018). Sampling root exudates – Mission impossible? *Rhizosphere*, 6, 116-133. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.06.004>
- Ormeno, E. et Fernandez, C. (2012). Effect of soil nutrient on production and diversity of volatile terpenoids from plants. *Current Bioactive Compounds*, 8(1), 71-79. <https://doi.org/10.2174/157340712799828188>
- Otto, A. et Wilde, V. (2001). Sesqui-, di-, and triterpenoids as chemosystematic markers in extant conifers—A review. *The Botanical Review*, 67(2), 141-238. <https://doi.org/10.1007/BF02858076>

- Parent, S., Morin, H. et Messier, C. (2000). Effects of adventitious roots on age determination in Balsam fir *Abies balsamea* regeneration. *Canadian Journal of Forest Research*, 30(3), 513-518. <https://doi.org/10.1139/cjfr-30-3-513>
- Parent, S., Morin, H. et Messier, C. (2002). Missing growth rings at the trunk base in suppressed balsam fir saplings. *Canadian Journal of Forest Research*, 32, 1776-1783. <https://doi.org/10.1139/x02-102>
- Patti, G. J., Yanes, O. et Siuzdak, G. (2012). Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(4), 263-269. <https://doi.org/10.1038/nrm3314>
- Pavlović, P., Muscolo, A., Sidari, M. et Mitrović, M. (2014). Non-trophic interactions: allelopathy. Dans J. Dighton et J. A. Krumins (dir.), *Interactions in soil: promoting plant growth* (vol. 1, p. 139-162). Netherlands: Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8890-8_7
- Peñuelas, J., Estiarte, M., Kimball, B. A., Idso, S. B., Pinter, P. J., Wall, G. M., Garcia, R. L., Hansaker, D. J., LaMorte, R. L. et Hensrik, D. L. (1996). Variety of responses of plant phenolic concentration to CO₂ enrichment. *Journal of Experimental Botany*, 47(9), 1463-1467. <https://doi.org/10.1093/jxb/47.9.1463>
- Pérot, T., Goreaud, F. et Ginisty, C. (2008). Quels modèles de croissance pour les peuplements mélangés ? Exemple du mélange chêne sessile - pin sylvestre. *Revue Forestière Française*, 60(2), 215-232. <https://doi.org/10.4267/2042/18145>
- Perry, L. G., Thelen, G. C., Ridenour, W. M., Callaway, R. M., Paschke, M. W. et Vivanco, J. M. (2007). Concentrations of the allelochemical (±)-Catechin in *Centaurea maculosa* soils. *Journal of Chemical Ecology*, 33(12), 2337-2344. <https://doi.org/10.1007/s10886-007-9383-1>
- Peters, K., Worrich, A., Weinhold, A., Alka, O., Balcke, G., Birkemeyer, C., Bruelheide, H., Calf, O., Dietz, S., Dührkop, K., Gaquerel, E., Heinig, U., Kücklich, M., Macel, M., Müller, C., Poeschl, Y., Pohnert, G., Ristok, C., Rodríguez, V., ... Dam, N. (2018). Current challenges in plant eco-metabolomics. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5), 1385. <https://doi.org/10.3390/ijms19051385>
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P. et van der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 789-799. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>

- Phillips, R. P., Erlitz, Y., Bier, R. et Bernhardt, E. S. (2008). New approach for capturing soluble root exudates in forest soils. *Functional Ecology*, 22(6), 990-999. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01495.x>
- Pichette, A., Garneau, F.-X., Jean, F.-I., Riedl, B. et Girard, M. (1998). Chemical differences between the wood extracts of jack pine (*Pinus Banksiana*), black spruce (*Picea Mariana*) and balsam fir (*Abies Balsamea*) from eastern Canada. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 18(4), 427-438. <https://doi.org/10.1080/02773819809349590>
- Pineda-Krch, M. et Lehtila, K. (2004). Costs and benefits of genetic heterogeneity within organisms. *Journal of Evolutionary Biology*, 17(6), 1167-1177. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2004.00808.x>
- Pinton, R., Varanini, Z. et Nannipieri, P. (2007). *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface* (2de éd.). Boca Raton: CRC Press.
- Pommerening, A. et Sánchez Meador, A. J. (2018). Tamm review: tree interactions between myth and reality. *Forest Ecology and Management*, 424, 164-176. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2018.04.051>
- Pothier, D. (dir.). (2003). *Recherche en sylviculture et rendement de la forêt boréale québécoise*. Québec: Direction de la recherche forestière.
- Pregitzer, K. S. et King, J. S. (2005). Effects of soil temperature on nutrient uptake. Dans H. BassiriRad (dir.), *Nutrient acquisition by plants: an ecological perspective* (p. 277-310). Berlin: Springer. https://doi.org/10.1007/3-540-27675-0_10
- Pregitzer, K. S., King, J. S., Burton, A. J. et Brown, S. E. (2008). Responses of tree fine roots to temperature. *New Phytologist*, 147(1), 105-115. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00689.x>
- Pretzsch, H. et Biber, P. (2010). Size-symmetric versus size-asymmetric competition and growth partitioning among trees in forest stands along an ecological gradient in central Europe. *Canadian Journal of Forest Research*, 40(2), 370-384. <https://doi.org/10.1139/X09-195>
- Prévost, M. et Dumais, D. (2018). Long-term growth response of black spruce advance regeneration (layers), natural seedlings and planted seedlings to scarification: 25th year update. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 33(6), 583-593. <https://doi.org/10.1080/02827581.2018.1430250>

- Prevosto, B. (2005). Les indices de compétition en foresterie: exemples d'utilisation, intérêts et limites. *Revue Forestière Française*, (5), 413. <https://doi.org/10.4267/2042/5062>
- Qiao, M., Xiao, J., Yin, H., Pu, X., Yue, B. et Liu, Q. (2014). Analysis of the phenolic compounds in root exudates produced by a subalpine coniferous species as responses to experimental warming and nitrogen fertilisation. *Chemistry and Ecology*, 30(6), 555-565. <https://doi.org/10.1080/02757540.2013.868891>
- Quer, E., Baldy, V. et DesRochers, A. (2020). Ecological drivers of root grafting in balsam fir natural stands. *Forest Ecology and Management*, 475, 118388. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2020.118388>
- R Core Team, 2019. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.
- Rai, M. K., Shekhawat, N. S., Harish, Gupta, A. K., Phulwaria, M., Ram, K. et Jaiswal, U. (2011). The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 106(2), 179-190. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9923-9>
- Raven, P. H., Evert, R. F. et Eichhorn, S. E. (2000). *Biologie végétale* (2e éd.). Bruxelles: De Boeck.
- Redmond, D. R. (1957). Infection courts of butt-rotting fungi in balsam fir. *Forest Science*, 3(1), 15-21. <https://doi.org/10.1093/forestscience/3.1.15>
- Reinartz, J. A. et Popp, J. W. (1987). Structure of clones of northern prickly ash (*Xanthoxylum americanum*). *American Journal of Botany*, 74(3), 415-428.
- Reynolds, K. M. (1982). Estimating probability of intertree root contact in second-growth Douglas-fir. *Canadian Journal of Forest Research*, 12(3), 493-498. <https://doi.org/10.1139/x82-077>
- Rice, E. L. (2012). *Allelopathy* (2e éd.). Orlando: Academic Press.
- Rigg, G. B. et Harrar, E. S. (1931). The root systems of trees growing in sphagnum. *American Journal of Botany*, 18(6), 391-397. <https://doi.org/10.2307/2435874>
- Robitaille, A. et Saucier, J.-P. (1996). Land district, ecophysiographic units and areas: The landscape mapping of the Ministère des Ressources naturelles du Québec. *Environmental Monitoring and Assessment*, 39(1-3), 127-148. <https://doi.org/10.1007/BF00396141>

- Rossi, S. et Morin, H. (2011). Demography and spatial dynamics in balsam fir stands after a spruce budworm outbreak. *Canadian Journal of Forest Research*, 41(5), 1112-1120. <https://doi.org/10.1139/x11-037>
- Ruel, J.-C. (2000). Factors influencing windthrow in balsam fir forests: from landscape studies to individual tree studies. *Forest Ecology and Management*, 135(1-3), 169-178. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(00\)00308-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(00)00308-X)
- Ruel, J.-C., Larouche, C. et Achim, A. (2003). Changes in root morphology after precommercial thinning in balsam fir stands. *Canadian Journal of Forest Research*, 33(12), 2452-2459. <https://doi.org/10.1139/x03-178>
- Sainte-Marie, G., Kneeshaw, D., MacLean, D. et Hennigar, C. (2014). Estimating forest vulnerability to the next spruce budworm outbreak: Will past silvicultural efforts pay dividends? *Canadian Journal of Forest Research*, 45, 314-324. <https://doi.org/10.1139/cjfr-2014-0344>
- Salomón, R. L., Tarroux, E. et DesRochers, A. (2016). Natural root grafting in *Picea mariana* to cope with spruce budworm outbreaks. *Canadian Journal of Forest Research*, 46(8), 1059-1066. <https://doi.org/10.1139/cjfr-2016-0121>
- Santonja, M., Bousquet-Mélou, A., Greff, S., Ormeno, E. et Fernandez, C. (2019). Allelopathic effects of volatile organic compounds released from *Pinus halepensis* needles and roots. *Ecology and Evolution*, 9(14), 8201-8213. <https://doi.org/10.1002/ece3.5390>
- Saucier, J.-P., Gosselin, J., Morneau, C. et Grondin, P. (2010). Utilisation de la classification de la végétation dans l'aménagement forestier au Québec. *Revue Forestière Française*, 8(3-4). <https://doi.org/10.4267/2042/38956>
- Saunier, R. E. et Wagle, R. F. (1965). Root grafting in *Quercus Turbinella* Greene. *Ecology*, 46(5), 749-750. <https://doi.org/10.2307/1935020>
- Schenk, H. J. (2006). Root competition: beyond resource depletion. *Journal of Ecology*, 94(4), 725-739. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2006.01124.x>
- Schier, G. A. (1972). Apical dominance in multishoot cultures from aspen roots. *Forest Science*, 18(2), 147-149. <https://doi.org/10.1093/forestscience/18.2.147>
- Schultz, R. P. (1972). Intraspecific root grafting in slash pine. *Botanical Gazette*, 133(1), 26-29. <https://doi.org/10.1086/336608>

- Schulz-Bohm, K., Gerards, S., Hundscheid, M., Melenhorst, J., de Boer, W. et Garbeva, P. (2018). Calling from distance: attraction of soil bacteria by plant root volatiles. *The ISME Journal*, 12(5), 1252-1262. <https://doi.org/10.1038/s41396-017-0035-3>
- Schweingruber, F. H. (1989). *Tree rings: basics and applications of dendrochronology*. Kluwer: Academic Publishers.
- Schwinning, S. et Weiner, J. (1998). Mechanisms determining the degree of size asymmetry in competition among plants. *Oecologia*, 113(4), 447-455. <https://doi.org/10.1007/s004420050397>
- Sebastiana, M., Gargallo-Garriga, A., Sardans, J., Pérez-Trujillo, M., Monteiro, F., Figueiredo, A., Maia, M., Nascimento, R., Silva, M. S., Ferreira, A. N., Cordeiro, C., Marques, A. P., Sousa, L., Malhó, R. et Penuelas, J. (2021). Metabolomics and transcriptomics to decipher molecular mechanisms underlying ectomycorrhizal root colonization of an oak tree. *Scientific Reports*, 11(1), 8576. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87886-5>
- Signorell, A., Aho, K., Alfons, A., Anderegg, N., Aragon, T., Arachchige, C., Arppe, A., Baddeley, A., Barton, K., Bolker, B., Borchers, H. W., Caeiro, F., Champely, S., Chessel, D., Chhay, L., Cooper, N., Cummins, C., Dewey, M., Doran, H. C., ... Zeileis, A. (2021). DescTools: Tools for Descriptive Statistics (version 0.99.41). <https://CRAN.R-project.org/package=DescTools>
- Simard, S. W. et Durall, D. M. (2004). Mycorrhizal networks: a review of their extent, function, and importance. *Canadian Journal of Botany*, 82(8), 1140-1165. <https://doi.org/10.1139/b04-116>
- Simard, S. W., Beiler, K. J., Bingham, M. A., Deslippe, J. R., Philip, L. J. et Teste, F. P. (2012). Mycorrhizal networks: mechanisms, ecology and modelling. *Fungal Biology Reviews*, 26(1), 39-60. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.01.001>
- Skovsgaard, J. P. (2009). Analysing effects of thinning on stand volume growth in relation to site conditions: A case study for even-aged Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.). *Forestry*, 82(1), 87-104. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpn047>
- Smith, C. A., Want, E. J., O'Maille, G., Abagyan, R. et Siuzdak, G. (2006). XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical Chemistry*, 78(3), 779-787. <https://doi.org/10.1021/ac051437y>

- Spek, L. Y. (1997). Generation and visualization of root-like structures in a three-dimensional space. *Plant and Soil*, 197(1), 9-18.
- Stadt, K. J., Huston, C., Coates, K. D., Feng, Z., Dale, M. R. T. et Lieffers, V. J. (2007). Evaluation of competition and light estimation indices for predicting diameter growth in mature boreal mixed forests. *Annals of Forest Science*, 64(5), 477-490. <https://doi.org/10.1051/forest:2007025>
- Stokes, A., Fitter, A. H. et Courts, M. P. (1995). Responses of young trees to wind and shading: effects on root architecture. *Journal of Experimental Botany*, 46(9), 1139-1146. <https://doi.org/10.1093/jxb/46.9.1139>
- Stolter, C., Niemelä, P., Ball, J. P., Julkunen-Tiitto, R., Vanhatalo, A., Danell, K., Varvikko, T. et Ganzhorn, J. U. (2009). Comparison of plant secondary metabolites and digestibility of three different boreal coniferous trees. *Basic and Applied Ecology*, 10(1), 19-26. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2007.12.001>
- Stone, J. E. et Stone, E. L. (1975). The communal root system of red pine: water conduction through root grafts. *Forest Science*, 21(3), 255-261. <https://doi.org/10.1093/forestscience/21.3.255>
- Strehmel, N., Böttcher, C., Schmidt, S. et Scheel, D. (2014). Profiling of secondary metabolites in root exudates of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 108, 35-46. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.10.003>
- Stueffer, J. F., Kroon, H. D. et During, H. J. (1996). Exploitation of environmental heterogeneity by spatial division of labor in a clonal plant. *Functional Ecology*, 10(3), 328. <https://doi.org/10.2307/2390280>
- Sullivan, J. H. et Peterson, K. M. (1994). The importance of seedling competition in the segregation of spruce and fir in the southern Appalachians. *New Forests*, 8(2), 105-121. <https://doi.org/10.1007/BF00028188>
- Tarroux, E. et DesRochers, A. (2010). Frequency of root grafting in naturally and artificially regenerated stands of *Pinus banksiana*: influence of site characteristics. *Canadian Journal of Forest Research*, 40(5), 861-871. <https://doi.org/10.1139/X10-038>
- Tarroux, E. et DesRochers, A. (2011). Effect of natural root grafting on growth response of jack pine (*Pinus banksiana*; *Pinaceae*). *American Journal of Botany*, 98(6), 967-974. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000261>
- Tarroux, E., DesRochers, A. et Krause, C. (2010). Effect of natural root grafting on growth response of jack pine (*Pinus banksiana*) after commercial thinning.

- Forest Ecology and Management*, 260(4), 526-535.
<https://doi.org/10.1016/j.foreco.2010.05.008>
- Tarroux, E., DesRochers, A. et Tremblay, F. (2014). Molecular analysis of natural root grafting in jack pine (*Pinus banksiana*) trees: how does genetic proximity influence anastomosis occurrence? *Tree Genetics & Genomes*, 10(3), 667-677. <https://doi.org/10.1007/s11295-014-0712-6>
- Taylor, S. L. et MacLean, D. A. (2009). Legacy of insect defoliators: increased wind-related mortality two decades after a spruce budworm outbreak. *Forest Science*, 55(3), 256-267.
<https://doi.org/10.1093/forestscience/55.3.256>
- Thaler, P. et Pages, L. (1998). Modelling the influence of assimilate availability on root growth and architecture. *Plant and Soil*, 201, 307-320. <https://doi-org.lama.univ-amu.fr/10.1023/A:1004380021699>
- Tilman, D. (1982). *Resource competition and community structure*. (MPB-17, vol. 17). Princeton: Princeton University Press.
<https://doi.org/10.1515/9780691209654>
- Tückmantel, T., Leuschner, C., Preusser, S., Kandeler, E., Angst, G., Mueller, C. W. et Meier, I. C. (2017). Root exudation patterns in a beech forest: dependence on soil depth, root morphology, and environment. *Soil Biology and Biochemistry*, 107, 188-197.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.01.006>
- Uren, N. C. (2000). Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. Dans R.. Pinton, Z. Varanini et P. Nannipieri (dir.), *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface* (2de éd. p. 35-56). Boca Raton: CRC Press.
<https://doi.org/10.1201/9780849384974-8>
- Valio, I. F. M., Burdon, R. S. et Schwabe, W. W. (1969). New natural growth inhibitor in the liverwort *Lunularia cruciata* (L) Dum. *Nature*, 223(5211), 1176-1178. <https://doi.org/10.1038/2231176a0>
- Valladares, F., Bastias, C. C., Godoy, O., Granda, E. et Escudero, A. (2015). Species coexistence in a changing world. *Frontiers in Plant Science*, 6.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00866>
- Van Dam, N. M. et Bouwmeester, H. J. (2016). Metabolomics in the rhizosphere: tapping into belowground chemical communication. *Trends in Plant Science*, 21(3), 256-265. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.008>

- Van Dam, N. M. et van der Meijden, E. (2011). A role for metabolomics in plant ecology. *Annual Plant Reviews*, 43, 87-107. <https://doi.org/10.1002/9781444339956.ch4>
- Van Dam, N. M., Weinhold, A. et Garbeva, P. (2016). Calling in the dark: the role of volatiles for communication in the rhizosphere. Dans J. D. Blande et R. Glinwood (dir.), *Deciphering chemical language of plant communication* (p. 175-210). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33498-1_8
- Venables, W. N. et Ripley, B. D. (2013). *Modern Applied Statistics with S-PLUS*. Cham: Springer Science & Business Media.
- Vincent, J.-S. et Hardy, L. (1977). L'évolution et l'extension des lacs glaciaires Barlow et Ojibway en territoire québécois. *Géographie physique et Quaternaire*, 31(3-4), 357-372. <https://doi.org/10.7202/1000283ar>
- Vincent, M., Krause, C. et Zhang, S. Y. (2009). Radial growth response of black spruce roots and stems to commercial thinning in the boreal forest. *Forestry*, 82(5), 557-571. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpp025>
- Vives-Peris, V., de Ollas, C., Gómez-Cadenas, A. et Pérez-Clemente, R. M. (2020). Root exudates: from plant to rhizosphere and beyond. *Plant Cell Reports*, 39(1), 3-17. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02447-5>
- Vovides, A. G., Wimmmler, M.-C., Schrewe, F., Balke, T., Zwanzig, M., Piou, C., Delay, E., López-Portillo, J. et Berger, U. (2021). Cooperative root graft networks benefit mangrove trees under stress. *Communications Biology*, 4(1), 513. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02044-x>
- Walker, T. S., Bais, H. P., Grotewold, E. et Vivanco, J. M. (2003). Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiology*, 132(1), 44-51.
- Wang, N., Kong, C., Wang, P. et Meiners, S. J. (2021). Root exudate signals in plant–plant interactions. *Plant, Cell & Environment*, 44(4), 1044-1058. <https://doi.org/10.1111/pce.13892>
- Watson, B. S., Bedair, M. F., Urbanczyk-Wochniak, E., Huhman, D. V., Yang, D. S., Allen, S. N., Li, W., Tang, Y. et Sumner, L. W. (2015). Integrated metabolomics and transcriptomics reveal enhanced specialized metabolism in *Medicago truncatula* root border cells. *Plant Physiology*, 167(4), 1699-1716. <https://doi.org/10.1104/pp.114.253054>
- Weiner, J. (1990). Asymmetric competition in plant populations. *Trends in Ecology & Evolution*, 5(11), 360-364. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(90\)90095-U](https://doi.org/10.1016/0169-5347(90)90095-U)

- Weinhold, A., Döll, S., Liu, M., Schedl, A., Xu, X., Neumann, S. et van Dam, N. M. (2020). Plot diversity differentially affects the chemical composition of leaves, roots and root exudates in four subtropical tree species [preprint]. *Ecology*. <https://doi.org/10.1101/2020.11.26.400424>
- Weir, T. L., Park, S.-W. et Vivanco, J. M. (2004). Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(4), 472-479. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.05.007>
- Weston, L. A. et Mathesius, U. (2013). Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. *Journal of Chemical Ecology*, 39(2), 283-297. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0248-5>
- Wink, M. (dir.). (2010). *Annual plant reviews, Biochemistry of plant secondary metabolism* (vol. 40). Oxford: John Wiley & Sons.
- Wolfender, J.-L., Marti, G., Thomas, A. et Bertrand, S. (2015). Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. *Journal of Chromatography*, 1382, 136-164. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.091>
- Woodward, A. W. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*, 95(5), 707-735. <https://doi.org/10.1093/aob/mci083>
- Wykoff, W. R., Crookston, N. L. et Stage, A. R. (1982). *User's Guide to the Stand Prognosis Model* (vol. 133) US Department of Agriculture, Forest Service, Intermountain Forest and Range Experiment Station.
- Yamamoto, M., Blaschek, L., Subbotina, E., Kajita, S. et Pesquet, E. (2020). importance of lignin coniferaldehyde residues for plant properties and sustainable uses. *ChemSusChem*, 13(17), 4400-4408. <https://doi.org/10.1002/cssc.202001242>
- Yao, C., Wang, J., Chan, P. et Feng, Y.-L. (2018). A novel non-targeted screening method for urinary exposure biomarker discovery of phthalates using liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Methods*, 10(9), 959-967. <https://doi.org/10.1039/C7AY02941A>
- Yuan, Z. Y. et Chen, H. Y. H. (2010). Fine root biomass, production, turnover rates, and nutrient contents in boreal forest ecosystems in relation to species, climate, fertility, and stand age: literature review and meta-analyses. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29(4), 204-221. <https://doi.org/10.1080/07352689.2010.483579>
- Yuzuak, S., Ballington, J. et Xie, D.-Y. (2018). HPLC-qTOF-MS/MS-based profiling of flavan-3-ols and dimeric proanthocyanidins in berries of two

muscadine grape hybrids flh 13-11 and flh 17-66. *Metabolites*, 8(4), 57.
<https://doi.org/10.3390/metabo8040057>