

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivrée par le
**Centre international d'études
supérieures en sciences agronomiques
Montpellier**

Préparée au sein de l'écoledoctorale SIBAGHE
Et de l'unité mixte de recherche AGAP

Spécialité
Biologie Intégrative des Plantes

Présentée par Nicolas VIRLET

**Phénotypage haut débit par imagerie
multispectrale au verger:**

**Etude du déterminisme génétique de la réponse à
la contrainte hydrique d'une population d'hybrides
de pommier (*Malus x domestica* Borkh.).**

Thèse soutenue le 3 juillet 2014 devant le jury composé de :

M. Christian JAY-ALLEMAND, PR, UM2	Président
M. Oliver BRENDEL, CR, INRA Nancy	Rapporteur
M. Frédéric BARET, DR, INRA Avignon	Rapporteur
Mme Agnès BÉGUÉ, chercheur, Cirad Montpellier	Examineur
M. François LAURENS, IR, INRA Angers	Examineur
Mme Marie-Christine VAN LABEKE, Pr, Université de Ghent (Belgique)	Invitée
M. Jean-Luc REGNARD, PR, MontpellierSupAgro	Directeur de thèse

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier les membres de mon jury, Messieurs Christian Jay-Allemand, Frédéric Baret, Oliver Brendel, François Laurens, ainsi que Mesdames Agnès Bégué et Marie-Christine van Labeke d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail et pour la bienveillance de vos questions lors la soutenance.

Je tiens aussi à remercier Evelyne Costes pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe AFEF et Jean-Luc Regnard, mon directeur de thèse. Merci à vous deux pour votre confiance dans la réalisation de ce travail de thèse qui s'est avéré compliqué par bien des aspects.

Je remercie Sylvain Labbé et les membres de l'Avion Jaune pour leurs connaissances en télédétection et le développement d'outils de plus en plus poussés pour l'acquisition de données à la parcelle. Sans eux ce projet aurait été difficilement réalisable. Sylvain, merci pour l'accès aux cours de télédétection et de traitements d'images qui m'ont permis de devenir autonome pour la réalisation de ce travail de thèse.

Un merci tout particulier à Valentine Lebourgeois. Merci pour ton implication dans ce travail. Merci pour ta gentillesse et ta patience pour m'expliquer les différents aspects du WDI et des indices de végétation ainsi que pour l'apprentissage de ce logiciel à fonctions mystérieusement mouvantes qu'est Erdas. Merci aussi pour ton soutien et ta pertinence dans la relecture de mes écrits notamment dans les derniers moments de l'écriture du manuscrit.

Je souhaite remercier également les membres de mon comité de thèse, Christian Jay-Allemand, Thierry Simonneau, Denis Fabre, Sylvain Labbé, Evelyne Costes et Valentine Lebourgeois qui ont su me guider dans la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier les différents membres permanents de l'équipe AFEF avec qui j'ai partagé ces 3 années et demie de thèse et qui ont suivi de près ou de loin l'avancée de mes travaux. Merci donc à Bouchaib, Jean-Michel, Françoise, Nathalie, Jean-Jacques, Gilbert. Merci aussi à Isabelle pour tes conseils dans la préparation de la soutenance. Merci à Séb pour les nombreuses heures passées avec moi sur le terrain sous le soleil de plomb et au labo à broyer des pommes à n'en plus finir, merci à Véro pour sa gentillesse et son soutien dans les moments difficiles. Pierre-Eric, merci à toi pour ces nombreuses discussions scientifiques finissant invariablement sur la nature humaine, merci pour ton ouverture d'esprit et ton soutien pendant toute la durée de la thèse. Je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont participé au projet à un moment ou à un autre : merci à Audrey Jolivot, Renaud Marty, Murielle Filiao, Stéphan Feral, Charles Romieu. Merci aussi à tous les doctorants et post-doc de l'équipe pour tous les moments partagés ensemble : merci à Baptiste, Inès, Anaëlle, Hicham, Ahmed les brésiliens Juliano et Gustavo, Liqi, Damien, Amal, Gerardo, David et la p'tite dernière arrivée Alix, il te reste un an à faire alors je te souhaite bon courage pour

terminer. Merci aussi à tous les stagiaires passés dans l'équipe. Merci également à Jacques et Fred pour les conversations au détour des couloirs et votre écoute lors des coups durs.

Je souhaite remercier aussi les collègues du club Aïkido Agro qui sont suivis de loin mes pérégrinations de thèse. Merci à vous pour votre accueil et votre joie de vivre dans la pratique et la recherche de l'aïkido.

Un très grand merci à mes parents et ma famille pour leur soutien durant ces trois années et demie. Sans vous je ne sais pas comment j'aurai fait pour tenir jusqu'au bout. Je tiens à remercier tous mes amis et particulièrement Julien, Pierre-Maxime, Sacha et Philou qui vous êtes, vous aussi, engagés en thèse pour le meilleur et pour le pire....

Je terminerai par remercier ma compagne Charlotte qui m'a épaulé durant toute la durée de cette thèse. Ces trois années n'ont pas été faciles pour nous deux, chacun en thèse à l'autre bout de la France mais nous avons tenu bon et nous nous sommes encouragés mutuellement pour la réalisation de nos travaux. Merci pour tes conseils (que je n'ai pas souvent suivis, une tête de mule reste une tête de mule...), ton soutien indéfectible et tous ces moments partagés ensemble.

Merci à toutes les personnes que j'ai pu croisées tout au long de ces trois années et demie de thèse et à ceux que j'ai pu oublier dans ces quelques lignes...

Table des matières

Remerciements.....	3
Table des matières.....	5
Listes des abréviations	9
Listes des figures et tableaux.....	13
Introduction générale.....	15
Chapitre 1 : Etat de l'art	21
I. Les plantes face à la demande en eau	23
I.1. Stratégie des plantes face à une diminution des ressources en eau	23
I.1.a. Disponibilité en eau des sols.....	24
I.1.b. Stratégies adoptées face à la contrainte hydrique	26
I.2. Perception et transduction du signal lié au déficit d'eau dans le sol	28
I.2.a. Des racines aux feuilles	28
I.2.b. Action de l'ABA au niveau des cellules de garde	29
I.3. Régulation des pertes en eau : rôle des stomates	29
I.4. L'efficacité d'utilisation de l'eau et sa variabilité génétique	31
II. Le pommier	32
II.1. Données économiques	32
II.2. Aspects taxonomiques, historiques et cytogénétiques	32
II.3. Effets de la contrainte hydrique chez le pommier	34
II.3.a. Effets sur la production	35
II.3.b. Effet sur les cycles de développement végétatif et reproducteur	36
II.3.c. Effet sur la réponse transpiratoire.....	36
II.4. L'amélioration génétique chez le pommier	38
II.4.a. Cibles actuelles	38
II.4.b. Prise en compte de la tolérance ou de l'adaptation à la contrainte hydrique	39
III. Génétique des caractères quantitatifs.....	40
III.1. Notions de génétique quantitative.....	41
III.2. La détection de QTL.....	42
III.2.a. Principe.....	42
III.2.b. Applications.....	43
III.3. Déterminisme génétique de la réponse au stress chez les ligneux.....	45
IV. La télédétection comme outil de phénotypage à haut débit	46
IV.1. Principes et notions de télédétection.....	47

IV.2. Applications de la télédétection aux couverts végétaux.....	48
IV.2.a. Domaine optique réflectif (du visible au moyen infrarouge)	48
IV.2.b. Domaine de l'infrarouge thermique.....	51
IV.3. Variabilité génétique pour les caractères issus de la télédétection.....	56
V. Objectifs de la thèse.....	57
Chapitre 2 : Matériel et méthodes.....	59
I. Matériel végétal	61
II. Dispositif expérimental.....	61
III. Descripteurs utilisés pour les plantes.....	63
IV. Campagnes d'acquisition d'images 2010 et 2011.....	64
V. Traitement des images	66
V.1. Normalisation radiométrique relative aux images visible et proche infra-rouge	68
V.2. Corrections atmosphériques des images infra-rouge thermique.....	70
V.3. Calcul des indices spectraux	71
V.4. Création d'une image multicouche	72
V.5. Création d'une zone d'intérêt dans chaque arbre pour l'extraction des valeurs spectrales	73
VI. Analyse génétique	75
Chapitre 3 : Résultats	77
I. Indicateurs de stress issus de l'imagerie thermique aéroportée pour le phénotypage au champ d'une population d'arbres hétérogènes pour sa réponse à la contrainte hydrique	79
II. Imagerie multispectrale aéroportée au champ pour l'analyse des déterminismes génétiques relatifs à des traits morphologiques et de transpiration : application à une population hybride de pommier en réponse à la contrainte hydrique	95
Chapitre 4 : Discussion générale et perspectives	145
I. L'imagerie aéroportée pour le phénotypage à haut débit au verger	147
I.1. Haute résolution et simultanéité de balayage	147
I.2. Flexibilité du système d'acquisition	148
I.3. Développement en cours et futurs	149
II. Apport de l'imagerie à la caractérisation des phénotypes pour leur réponse à la contrainte hydrique	151
II.1. Indices de végétation	151
II.2. Indices liés à la transpiration.....	151
II.3. Liens des variables agronomiques avec les indices spectraux	153
II.4. Classification des génotypes	154
III. Méthodologie de traitement des données pour quantifier la réponse au stress	154
IV. De la mise en évidence de la variabilité génétique à l'analyse de ses déterminants	156
V. Applications aux programmes de sélection.....	158

Conclusion	161
Références bibliographiques	163
Annexes.....	181

Listes des abréviations

Agronomie

BmFr : fruit biomass / biomasse des fruits

GS : Granny Smith

NbFr : fruit number / nombre de fruits

STK : Starkrimson

TC : trunk circumference / circonférence du tronc

TCSA: trunk cross sectional area / surface de section du tronc

Ecophysiologie végétale

A : assimilation (nette) du carbone ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)

CO_2 : dioxyde de carbone

Cp : chaleur spécifique à pression constante ($\text{J} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)

CSPE : continuum sol plante atmosphère

$\delta^{13}\text{C}$: composition isotopique du carbone, en ^{13}C (‰)

$\Delta^{13}\text{C}$: discrimination isotopique du ^{13}C (‰)

DOY : day of year

ET : évapotranspiration (ETM : maximale ; ETR : réelle, $\text{mm} \cdot \text{h}^{-1}$)

FTSW fraction d'eau transpirable du sol (%)

G : flux de chaleur du sol ($\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$)

γ : constante psychrométrique de l'air ($\gamma \approx 66 \text{ Pa} \cdot \text{K}^{-1}$)

GMT: Greenwich Mean Time

g_{sw} : stomatique (pour l'eau) ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ou $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)

Ig : index de conductance stomatique

LAI: leaf area index

Psi : potentiel hydrique (MPa)

ρ : densité de l'air sec à pression constante ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$)

r_a : résistance aérodynamique du couvert ($\text{s} \cdot \text{m}^{-1}$)

r_c : résistance du couvert végétal ($\text{s} \cdot \text{m}^{-1}$)

Rg : rayonnement global ($\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$)

RH / HR : humidité relative (de l'air) (%)

Rn : net radiation / rayonnement net ($\text{W} \cdot \text{m}^{-2}$)

T_a : température de l'air ($^{\circ}\text{C}$)

T_c / T_s : température du couvert végétal / température de surface

E : transpiration ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)

$T_s T_a / T_s - T_a$: Différence entre la température de surface et la température de l'air

u : vitesse de vent ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)

VPD : déficit de pression de vapeur (de l'air) (kPa)

WW : well-watered

WS : water stressed

WUE: Water Use Efficiency ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$)

WUEi : intrinsic Water Use Efficiency (A/g_{sw})

Génétique quantitative et statistique

ADN : desoxyribonucleic acid / acide désoxyribonucléique

AIC : Akaike Information Criterion

ANOVA: ANalysis Of Variance / analyse de variance

BIC : Bayesian Information Criterion
 BLUP : Best Linear Unbiased Predictor / meilleur prédicteur linéaire non biaisé
 F : statistique F de Fisher Snedecor
 G : génotype
 G x D : interaction génotype x date
 GxE : génotype x environnement
 G x M : interaction génotype x modalité d'irrigation
 IM : interval mapping / cartographie par intervalles
 LG : groupe de liaison
 LOD : Logarithm of the Odds / Logarithme de l'Odds ratio
 MQM : Multiple QTL Mapping / cartographie de QTL multiples
 QTL : Quantitative Trait Loci
 RMSE : Root Mean Square Error / erreur quadratique moyenne
 Sd : standard deviation
 SSR : Single Sequence Repeats

Imagerie et Télédétection

BRDF :bidirectional reflectance distribution function
 CMOS :Complementary Metal Oxide Semiconductor
 CN : numerical count / compte numérique
 CWSI : crop water stress index
 DI : differential index
 DGPS :Differential Global Positioning System
 DN : Digital Number / nombre digital
 NDVI :Normalized Difference Vegetation Index
 NIR / PIR : near infrared / proche infrarouge
 RGB / RVB / VIS : Red-Green-Blue / Rouge Vert Bleu / domaine visible
 SRPI :Simple Ratio Pigment Index
 TIR / IRT: thermal infrared / infrarouge thermique
 ULA/ULM: ultralight aircraft / ultra-léger motorisé
 UV : ultraviolet
 VARI : Visible Atmospherically Resistant Index
 VIT : Vegetation index-temperature
 WDI : water deficit index

Physiologie moléculaire : hormones, protéines, gènes et facteurs de transcription (FT)

ABA: abscisic acid / acide abscissique
 ABC : ATP-binding cassette transporters (protein)
 ABH : ABA hypersensitive
 CBL: Calcineurin B-Like protein (protein)
 CIPK : Calcium Independent Protein Kinase
 DELLA proteins: protéines inhibitrices de l'action des gibbérellines (RGL1, RGL2, ...)
 ERF : Ethylene Response Factor / Facteurs de Réponse à l'Ethylène (TF)
 ERL-2 : Erecta-like 2 gene (gène de régulation de l'efficacité de transpiration)
 GA : gibbérellines
 KATP: ATP-sensitive Potassium channel (protein, ATP-sensitive K⁺ channel)
 JAZ: JAmonate-ZIM-domain protein
 MRP : Multidrug Resistance-associated Protein
 MYB: MYeloBlastosis transcription factor (FT)
 MYC : MYeloCytomatosis transcription factor (FT)

NCED : 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (protein)
OST : Open stomata serine/threonine protein kinase (protein)
PDR : Pleiotropic drug resistance (protein)
PKT ou KAT : 3-ketoacyl-CoA thiolase protéine
PP2C : protein phosphatase 2C
PYR/PYL/RCAR : PYrabactin Resistance / PYr1-Like/Regulatory Components of ABA Receptors (protein)
SLAC : SLOW Anion Channel-associated (protein)
SnRK: Sucrose non-fermenting-1-Related protein Kinase (protein)
STO : salt tolerance protein
TAIR : The Arabidopsis Information Resource
TF: transcription factor / facteur de transcription

Organismes

CIRAD : Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations
INRA: Institut National de la Recherche Agronomique
IPCC : Intergovernmental Panel on Climate Change
IRSTEA : Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture
NCBI : National Center for Biotechnology Information
UE : unité expérimentale / UMR : Unité mixte de recherche

Listes des figures et tableaux

Figure 1 : Mouvement de l'eau à travers la plante, du sol vers l'atmosphère	24
Figure 2 : Réponses de la plante aux conditions de sécheresse	26
Figure 3 : Modèle expliquant la constitution du génome actuel de <i>Malus</i>	34
Figure 4 : Courbes typiques de la réflectance spectrale de la végétation	48
Figure 5 : Relation entre VPD et $T_c - T_a$ pour le calcul du <i>CWSI</i> empirique	51
Figure 6 : Illustration de la forme hypothétique du trapèze	54
Figure 7 : Photographie du verger expérimental et plan de la parcelle	60
Figure 8 : Etapes du traitement d'images	66
Figure 9 : Droites de régressions pour les corrections radiométriques entre dates	68
Figure 10 : Relation entre les températures de surface (sol vs images)	70
Figure 11 : Zones tampon permettant d'extraire les variables phénotypiques	73
Tableau 1 : Conditions environnementales des six vols réalisés en 2010 et 2011.	63
Tableau 2 : Systèmes d'acquisition des images en 2010 et 2011	64
Tableau 3 : Coefficients de variation (%) moyens entre les trois dates	69

Introduction générale

Le dernier rapport du groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC) indique que les trois dernières décennies ont été successivement plus chaudes à la surface de la terre que toutes les décennies connues depuis 1850 (IPCC, 2014). Pour certaines régions du monde, comme le bassin méditerranéen, les prévisions de changement climatique global vont se traduire par une diminution de la fréquence des précipitations et une augmentation en fréquence et en intensité des périodes de sécheresse. Ces phénomènes pourront se traduire par des redoux soudains, des vagues de chaleur, ainsi que par des épisodes marqués de précipitations (Della-Marta et al., 2007a ; Giorgi et Lionello, 2008 ; Zolina et al., 2009). Une diminution de la fréquence des nuits froides en hiver ainsi qu'une augmentation de la fréquence des jours très chauds en été ont déjà été observées dans le bassin méditerranéen au cours de la période 1989-2008 (Efthymiadis et al., 2011). L'existence d'un lien spatio-temporel entre les phénomènes climatiques observés dans différentes régions d'Europe a été montrée. En effet, les sécheresses estivales dans le sud de l'Europe peuvent succéder à un déficit des précipitations lors de l'hiver précédent. La fréquence des précipitations hivernales et printanières de la région Méditerranéenne pourrait ainsi être corrélée aux températures estivales du centre de l'Europe (Vautard et al., 2007).

Par ailleurs, la demande en eau pour l'agriculture est en augmentation constante. Cet accroissement résulte d'une part de l'augmentation de la population mondiale et des consommations humaines individuelles et d'autre part de la diminution des précipitations couplée à une forte demande évaporative dans de nombreuses régions. Comme l'agriculture est le secteur d'activité consommant le plus d'eau au niveau mondial, on peut s'attendre à une situation de plus en plus tendue vis-à-vis de cette ressource compte tenu des besoins pour la santé, l'alimentation et l'industrie.

Les espèces fruitières sont très cultivées sous les climats méditerranéens. L'irrigation joue un rôle essentiel pour l'arboriculture fruitière commerciale. Elle est généralement pratiquée de manière systématique afin de sécuriser les rendements et les revenus des producteurs. Quelles que soient les espèces, les consommations d'eau agricole sont dépendantes des saisons et elles augmentent en raison de la demande évaporative, jusqu'à la récolte tout du moins (Allen et al., 1998). Sous les climats tempérés océaniques ou

régulièrement sujets aux précipitations, les vergers peuvent assurer une production sans l'appoint de l'irrigation, alors que dans les zones semi-arides et arides, à déficit de pluviométrie printanier et/ou estival, la production et parfois la survie des vergers sont sous la dépendance de la disponibilité en eau. Dans le cas du pommier, les rendements, les calibres et la qualité des fruits à la récolte, ainsi que les capacités de stockage, sont fortement dépendants du pilotage rationnel de l'irrigation (Girona et Naor, 2012). D'une manière plus générale, pour les arbres fruitiers en culture commerciale, la recherche de rendements maximum n'est pas nécessairement priorisée dans la mesure où le potentiel de production peut être volontairement réduit par éclaircissage (jusqu'à 50% des fleurs ou jeunes fruits) ; ceci afin d'obtenir des fruits plus gros et de meilleure qualité et aussi pour assurer une régularité de production (Dennis, 2000; Trillot et al., 2002).

Si l'amélioration du pommier privilégie actuellement la qualité du fruit et la résistance aux bio-agresseurs, il n'existe pas encore de programme de sélection intégrant les traits adaptatifs. La capacité des variétés à maintenir une production satisfaisante sous contrainte hydrique modérée, ou forte demande évaporative, associée ou non au stress thermique constitue pourtant une cible d'amélioration potentiellement porteuse. Si de nombreux travaux ont permis d'appréhender les réponses du matériel ligneux fruitier à la contrainte hydrique édaphique (et notamment le pommier : Atkinson et al., 2000 ; Sircelj et al., 2007 ; Wisniewski et al., 2008; Bassett et al., 2011), diverses études récentes ont mis en évidence une certaine plasticité phénotypique de la réponse foliaire (photosynthèse nette, efficience d'utilisation de l'eau) à la contrainte hydrique imposée. Une variabilité génétique de la conductance stomatique en réponse à la variation de VPD (Déficit de pression de vapeur) a été démontrée par Regnard et al. (2008) en conditions contrôlées, sur une descendance en ségrégation cultivée en pots, permettant ensuite la détection de régions chromosomiques (Quantitative Trait Loci – QTL) pour ce trait et pour la transpiration (Regnard et al., 2009). Plus récemment, une variabilité du comportement stomatique, de la croissance végétative et de l'efficience d'utilisation de l'eau en réponse à une contrainte hydrique édaphique a été mise en évidence sur une trentaine de variétés commerciales de pommiers également cultivées en pots (Liu et al., 2012a, b). Au champ et en période reproductive, l'étude de la réponse transpiratoire et photosynthétique du pommier et l'analyse de ses bases génétiques nécessitent aussi de prendre en compte l'influence des fruits dont la force d'appel pour les photosynthétats stimule le fonctionnement foliaire (Pretorius et Wand, 2003).

Parmi les différentes contraintes abiotiques affectant les rendements, la sécheresse est l'une des plus étudiées. L'amélioration génétique pour la tolérance au stress hydrique reste toutefois délicate car les plantes utilisent diverses réponses pour y faire face (Tuberosa et Salvi, 2006). Jusque récemment, l'hérédité quantitative des traits, les faibles connaissances sur les réponses des rendements aux conditions d'eau restreintes ainsi que les difficultés technologiques ont limité les stratégies de sélection pour la tolérance à la sécheresse (Sinclair, 2011). Par ailleurs, les méthodes de phénotypage restent un goulot d'étranglement important alors que les avancées en matière de séquençage des génomes à haut débit (technologies dites de next-generation sequencing, NGS) permettent un accès à des données génomiques de masse et à moindre coût (Shendure et Ji, 2008 ; Jackson et al., 2011). L'émergence de la phénomique (Furbank and Tester, 2011), domaine pluridisciplinaire qui a pour but de relier les données NGS et les données phénotypiques quantifiées et haut débit, permettra progressivement de développer la génétique d'association et les modèles statistiques permettant la sélection génomique (Albrecht et al., 2011). Dans l'immédiat, la détection de QTL et l'identification de gènes candidats impliqués dans la tolérance au stress hydrique ou au maintien du rendement en conditions de sécheresse nécessitent déjà de pouvoir phénotyper un grand nombre d'individus.

La dernière décennie a vu émerger des plateformes de plus en plus sophistiquées dédiées au phénotypage à haut débit en conditions contrôlées. Ces plateformes permettent d'étudier la réponse spécifique des plantes à différents stress en conditions contrôlées et de disséquer les effets environnementaux afin de mieux appréhender les mécanismes des réponses au stress et les effets sur les rendements. Cependant, la transférabilité des résultats des essais en milieux contrôlés aux conditions de plein champ n'est pas simple car la réponse des plantes dans un environnement ouvert dépend de nombreux facteurs environnementaux qui ne peuvent pas être totalement contrôlés et qui sont spatialement variables (Mir et al., 2012). Le phénotypage au champ, en conditions plus ou moins contrôlées, constitue donc un enjeu essentiel et représente un défi technologique dont la réussite réside dans le développement et l'utilisation d'outils permettant d'acquérir une information précise et quantifiée sur un grand nombre d'individus (Masuka et al. 2012; White et al., 2012, Araus et Cairns., 2014).

Dans ce contexte, ce travail a fait le choix de l'imagerie par télédétection aéroportée. L'utilisation de capteurs spécifiques, embarqués sur des vecteurs aéroportés pouvant voler à basse altitude permet aujourd'hui l'acquisition d'images à très haute résolution spatiale. Ces

images permettent d'appréhender les variations intra-parcellaires, notamment en vergers, et pour ces derniers de distinguer les individus entre eux ainsi qu'une éventuelle variabilité au sein de leur canopée (Berni et al., 2009 ; Gonzalez-Dugo et al., 2012). Par ailleurs, il existe en télédétection une large gamme d'indices permettant de caractériser l'état nutritionnel, transpiratoire ou physiologique des couverts végétaux. Selon les indices choisis, les réponses des plantes peuvent être étudiées pour appréhender des réponses sur le court terme ou sur le long terme. Il apparaît nécessaire d'évaluer les variables issues de l'imagerie en termes d'intérêt pour la sélection variétale et notamment d'estimer leur capacité à caractériser la variabilité génétique. De ce point de vue, notre recherche a été abordée sous l'hypothèse de la possibilité de phénotyper à haut débit une population de pommiers au champ pour mettre en évidence et analyser la variabilité de réponse des parties aériennes à la contrainte hydrique.

Ce travail de thèse s'est déroulé au sein de l'équipe d'Architecture et Fonctionnement des Espèces Fruitières (AFEF) de l'UMR d'Amélioration Génétique et Adaptation des Plantes méditerranéennes et tropicales (AGAP) de Montpellier. Il a abordé la thématique de la réponse aux contraintes abiotiques sous diverses approches. Cette recherche centrée sur le phénotypage a été conduite en collaboration étroite avec la Maison de la Télédétection de Montpellier et l'appui de la société l'Avion Jaune. La thèse a été cofinancée par la Région Languedoc-Roussillon et le Centre international d'études supérieures en sciences agronomiques, Montpellier SupAgro.

Ce manuscrit de thèse est organisé en quatre chapitres :

- Le chapitre 1 présente une synthèse bibliographique dans laquelle sont exposées les connaissances nécessaires à la compréhension de la problématique, débouchant sur l'énoncé des objectifs de la thèse.
- Le chapitre 2 est découpé en deux parties principales. La première partie présente succinctement le matériel végétal ainsi que le déroulement des campagnes d'acquisition des images et la deuxième partie présente les différentes étapes du processus de traitement de celles-ci.

- Le chapitre 3 présente les principaux résultats de ce travail de thèse. La partie I est un article accepté et publié dans la revue *Journal of Experimental Botany*. Il concerne un aspect méthodologique important de la thèse qui a consisté à mettre en œuvre et à interpréter l'image thermique acquise sur un couvert hétérogène. La partie 2 est un article préparé pour soumission à la revue *New Phytologist*. Il traite de l'analyse des déterminants génétiques des variables issues des images multispectrales et de quelques variables agronomiques en réponse à une contrainte hydrique et il débouche sur une amorce de recherche de gènes candidats.
- Le chapitre 4 présente enfin la discussion générale et les perspectives, et se termine par la conclusion de ce travail de thèse.

Chapitre 1 : Etat de l'art

I. Les plantes face à la demande en eau

I.1. Stratégie des plantes face à une diminution des ressources en eau

La colonisation du milieu terrestre par les végétaux a pu se réaliser par l'évolution des mécanismes permettant aux plantes de réguler leurs pertes en eau tout en continuant à assimiler du carbone par photosynthèse. Cette évolution a été une étape importante car la disponibilité en eau est certainement l'un des points-clés de la distribution des plantes et de leur survie. C'est aussi l'un des facteurs les plus limitants pour les rendements en agriculture.

Les plantes sont situées à l'interface entre sol et atmosphère. L'eau absorbée circule la plupart du temps sous tension, dans le xylème, entre ces interfaces. Le système biophysique ainsi constitué est appelé continuum sol-plante-atmosphère (CSPE). L'état énergétique de l'eau dans ce système est décrit par le potentiel hydrique, Ψ , qui pour la plante, est exprimé en MPa. Dans le CSPE, les mouvements de l'eau se produisent à partir des organes qui ont le potentiel hydrique le plus élevé (généralement les racines, valeurs négatives, proches de 0) vers ceux dont le Ψ est le plus faible (généralement les feuilles, valeurs plus négatives). L'absorption de l'eau par la plante à partir du sol se produit sous l'influence du gradient de potentiel généré par la transpiration. A la sortie de la plante, le flux transpiratoire, sous forme gazeuse, résulte lui-même de la grande différence de potentiel hydrique entre l'atmosphère sèche et le potentiel hydrique relativement plus élevé de l'eau des feuilles. Le caractère continu de la colonne d'eau sous tension dans le CSPE entraîne l'absorption d'eau qui se produit au niveau de la racine, au contact de la solution du sol (Nobel 2009, Goldsmith, 2013, Figure 1).

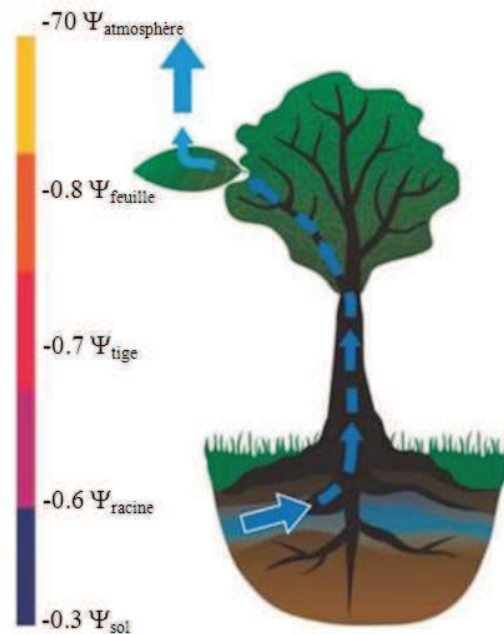


Figure 1. Mouvement de l'eau à travers la plante, du sol vers l'atmosphère (en se basant sur le potentiel hydrique, Ψ en MPa). L'eau circule depuis le sol vers l'atmosphère, du potentiel hydrique le plus élevé (Ψ_{sol}) vers le plus faible ($\Psi_{atmosphère}$). Figure adaptée de Goldsmith (2013).

1.1.a. Disponibilité en eau des sols

La disponibilité de l'eau pour la plante peut être caractérisée par diverses approches. La première, qui est la plus traditionnelle, considère le stock d'eau contenu dans le sol (quantité d'eau référée au volume ou au poids de sol). Elle débouche sur les notions de réserve utile et de réserve facilement utilisable, qui sont largement utilisées pour l'établissement du bilan hydrique simplifié en agriculture (Allen et al., 1998). Une approche plus récente consiste à considérer la disponibilité de l'eau pour la plante. Elle se fonde sur l'état énergétique de l'eau dans le sol, c'est-à-dire sur le potentiel hydrique de sol. Cette approche débouche donc sur l'utilisation des sondes tensiométriques qui mesurent cet état (Tron et al., 2000). La troisième approche, enfin, considère le fonctionnement du système biophysique du point de vue de la plante. Elle a permis l'émergence du concept de fraction d'eau transpirable du sol (Fraction of Transpirable Soil

Water, FTSW, Sinclair and Ludlow, 1986), qui peut également varier en fonction du génotype (Bimpong et al., 2011 ; Gholipour et al., 2012 ; Marguerit et al., 2012 ; Schoppach et al., 2012).

Différents concepts sont susceptibles de définir la diminution de la disponibilité de l'eau et ses effets. Cette diminution passe par plusieurs phases dont les implications ne sont pas les mêmes pour la plante :

- Le **déficit hydrique** correspond à un état physique pour lequel l'eau disponible pour la plante ne lui permet pas de faire face à la demande évaporative. La perte en eau constatée, et appréciée au niveau du couvert par l'évapotranspiration réelle ($E_{réel}$), est inférieure à l'évapotranspiration maximale (E_{max}) qui est observée en conditions hydriques non-limitantes (Allen et al., 1998). Le déficit hydrique peut provenir de la faible disponibilité en eau présente dans la fraction de sol prospectée par les racines et/ou d'une demande évaporative devenue plus forte.

- La **contrainte hydrique** correspond à un état de la plante où son fonctionnement va être affecté, mais avec un maintien de la turgescence de ses tissus. Elle se traduit par une diminution de la transpiration et par diverses modifications métaboliques comme par exemple l'ajustement osmotique (par accumulation d'osmoprotectants : sorbitol, proline, glycine-bétaïne) (Wang et al., 1995).

- Le **stress hydrique** correspond finalement à une situation où la plante subit une diminution plus prononcée de sa teneur en eau qui va affecter son métabolisme de manière importante (Tardieu et Hammer, 2012).

Dans la suite du manuscrit, lorsqu'il sera référé à une restriction en eau l'expression « contrainte hydrique » sera fréquemment utilisée, car ce terme est plus englobant.

La réponse des plantes à une diminution des ressources en eau dépend de l'intensité et de la durée de cette limitation ainsi que de leur capacité d'adaptation à cette contrainte environnementale (McDonald and Davies, 1996). Le délai de réponse de la plante peut être fortement influencé par la relation qu'elle entretient avec son environnement. Dans le cas d'un déficit hydrique à long terme, les plantes peuvent échapper à la déshydratation en raccourcissant leur cycle de végétation (esquive) ou en optimisant le gain de la ressource dans le temps. Dans le cas d'une menace de déshydratation, la réaction des plantes doit permettre de limiter les pertes en eau et d'éviter les dommages occasionnés par les stress oxydatifs et thermiques qui se

développent secondairement (Chaves et al., 2003; Tardieu, 2005). La déshydratation induit différents mécanismes de réponse et d'adaptation à court et à long termes (Vadell et Medrano, 1992, Chaves et al., 2003 ; Figure2).

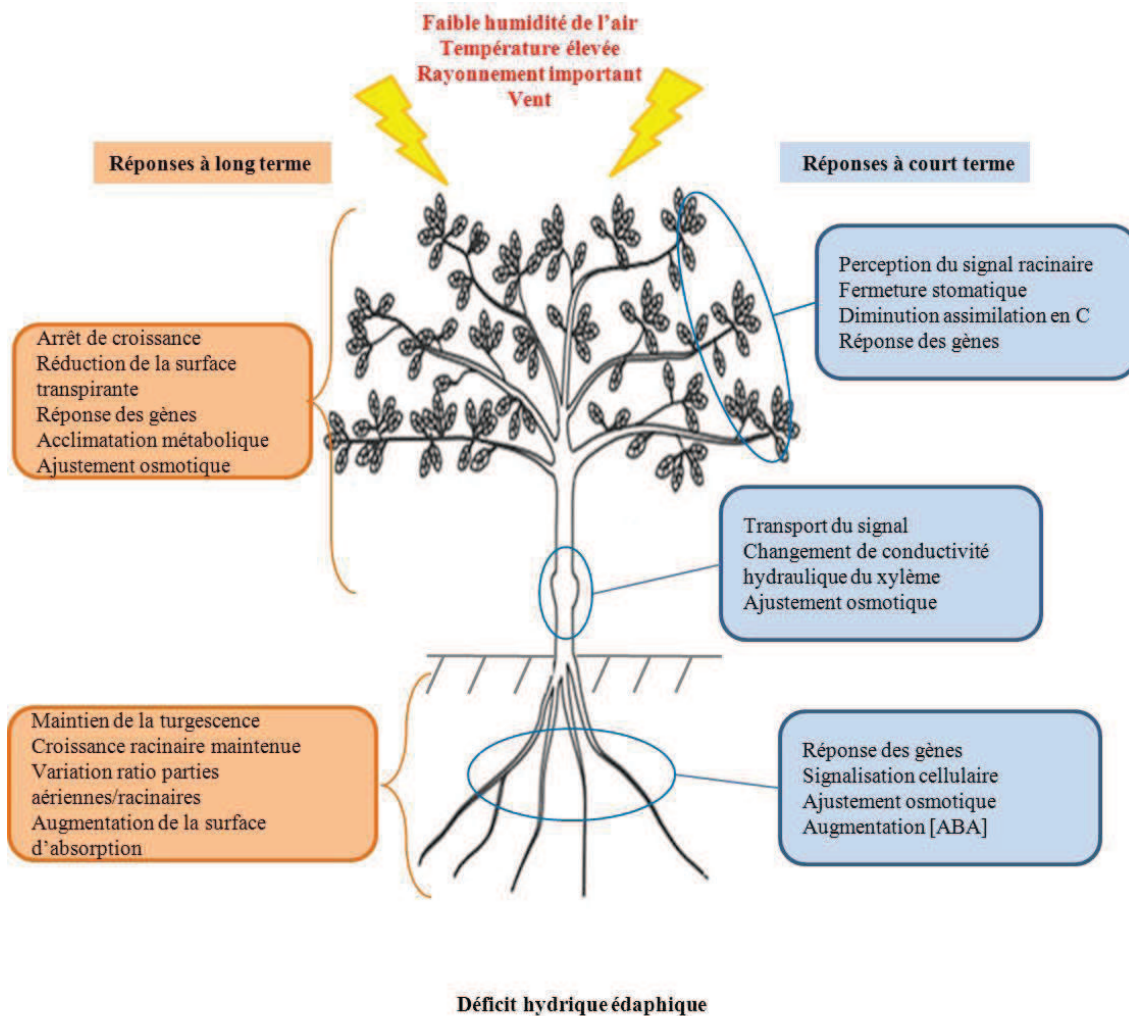


Figure 2. Réponse de la plante aux conditions de sécheresse. En bleu, les réponses à court terme et en rouge, les réponses à long terme (d'après Chaves et al., 2003).

1.1.b. Stratégies adoptées face à la contrainte hydrique

Classiquement, l'ensemble des mécanismes permettant le maintien de la production ou la survie de la plante lors d'une contrainte hydrique édaphique et/ou d'une forte demande

évaporative peuvent être regroupés comme les mécanismes de tolérance à la sécheresse (Levitt, 1972, Turner, 1986).

L'**esquive** est une stratégie qui consiste à réaliser les phases essentielles du cycle de développement avant la période de sécheresse. Dans cette stratégie, la survie et l'adaptation des plantes dépendent fortement du succès de la phase de reproduction. Cette stratégie est surtout présente chez les annuelles des zones arides et concerne peu les ligneux (De Micco et Aronne, 2012).

La stratégie d'**évitement** permet à la plante de traverser des périodes de sécheresse en privilégiant la limitation de la perte en eau, ce qui restreint la chute de potentiel hydrique des tissus. Cette **stratégie isohydrique** est rencontrée chez les plantes annuelles et pérennes et est associée à de nombreux traits adaptatifs (Tardieu et Simonneau, 1998). Les pertes d'eau peuvent être minimisées à court terme par le contrôle de la transpiration par la régulation stomatique et, à plus long terme, par la diminution du rayonnement absorbé grâce à l'enroulement des feuilles, au développement d'une couche dense de trichomes ou à la modification de l'angle des feuilles (Ehleringer and Cooper, 1992 ; Larcher 2000). Elle résulte aussi à plus long terme de la réduction de la surface foliaire et de l'arrêt de croissance (Chaves et al., 2003). De plus, l'absorption d'eau est maximisée en favorisant l'allocation de ressources au profit de la prospection racinaire qui se traduit par un accroissement du root/shoot ratio (Jackson et al., 2000). Cette stratégie « économe en eau », bien que favorable au maintien du statut hydrique du végétal, est pénalisante pour le gain de carbone (Amigues et al., 2006 ; McDowell et al., 2008).

La stratégie de **tolérance** consiste à maintenir les fonctions physiologiques importantes (croissance, transpiration, photosynthèse) malgré les fortes contraintes hydriques. L'homéostasie hydrique et la turgescence résultent alors de l'ajustement osmotique et le gain de carbone peut être maintenu dans une certaine mesure. Cette **stratégie anisohydrique**, qui autorise de plus basses valeurs de potentiel hydrique, est favorable en conditions de contraintes hydriques modérées. Cependant, elle peut s'avérer pénalisante ou menacer la survie en situation de déficit hydrique plus sévère ou durable (McDowell et al., 2008). On peut considérer que l'amélioration génétique des plantes agricoles a historiquement privilégié cette stratégie qualifiée de « dépensière » (Amigues et al., 2006), même si de nos jours un intérêt accru s'attache à l'amélioration pour l'efficacité d'utilisation de l'eau.

Les stratégies décrites ci-dessus ne sont pas exclusives et dans la pratique, les plantes combinent toute une gamme de réponses pour faire face à la diminution des ressources en eau (Chaves et al., 2003). De plus, selon les scénarii de contrainte hydrique rencontrés, les stratégies de la plante peuvent avoir des effets positifs, négatifs ou rester sans effet sur le rendement (Tardieu et Tuberosa, 2010).

I.2. Perception et transduction du signal lié au déficit d'eau dans le sol

Les variations de statut hydrique du sol qui amènent à la fermeture stomatique impliquent la perception de différents signaux et leurs effets à différentes échelles. Lovisolo et al. (2010) indiquent qu'ils sont davantage liés au métabolisme de l'acide abscissique (ABA), aux variations du signal hydraulique, à la régulation et à l'activité des aquaporines (protéines membranaires permettant la circulation d'eau entre les cellules) et/ou aux variations de signaux électriques plutôt qu'à des changements de statut hydrique des feuilles via leur potentiel hydrique.

I.2.a. Des racines aux feuilles

L'hypothèse la plus souvent présentée est qu'en réponse à la contrainte hydrique, l'ABA synthétisé au niveau racinaire est transporté via le xylème jusqu'aux feuilles pour induire une réponse stomatique (Tardieu et Davies, 1992). Cependant, certains travaux rapportent des éléments qui ne sont pas cohérents avec la seule implication de l'ABA racinaire dans la régulation stomatique. En effet, un transport inverse, c'est-à-dire depuis les feuilles vers les racines, a aussi été observé chez la vigne (Loveys, 1984b). Par ailleurs, des gradients d'ABA ont été observés au sein du xylème et des feuilles, avec des concentrations basipètes décroissantes (Soar et al., 2004), ce qui accrédite la possibilité d'une synthèse par les feuilles. De même, une étude conduite sur *Arabidopsis* a démontré que la diminution de la conductance stomatique était liée à l'ABA synthétisé au niveau foliaire et non pas au niveau racinaire (Christmann et al., 2007). Les auteurs de cette dernière étude suggèrent que le signal déclenchant la synthèse d'ABA foliaire pourrait être de nature hydraulique. Cette hypothèse s'appuie sur des résultats montrant

qu'il existe un gradient de conductivité hydraulique dans le système aérien similaire au patron décrit pour l'ABA (Salleo et al. 1982, 1985; Lovisolo et Schubert, 1998).

1.2.b. Action de l'ABA au niveau des cellules de garde

Au niveau des cellules de garde, la fermeture stomatique est inhibée par une protéine phosphatase 2C (PP2C). L'ABA agit à plusieurs niveaux. D'une part, il active les canaux calciques de la membrane plasmique, et d'autre part il est perçu par des récepteurs sensibles à l'ABA, PYR/PYL/RCAR, qui lèvent l'inhibition de la PP2C. Ces événements entraînent l'activation par phosphorylation d'un certain nombre de protéine kinases, comme les Sucrose non-fermenting 1-Related subfamily 2 protein Kinases (SnRK2). Cette activation induit à son tour l'ouverture des canaux anioniques (ex : SLAC1) et potassiques sortants (KAT1, KAT2). L'efflux d'anions résultant de l'activation de SLAC1 induit une dépolarisation de la membrane. L'augmentation du taux d'ABA et du calcium intracellulaire va provoquer la fermeture des canaux potassiques et des pompes à protons. L'efflux du potassium et des anions Cl⁻ à partir des cellules de garde s'accompagne d'une sortie d'eau par les aquaporines. L'ensemble de ces événements se traduit par une perte de turgescence des cellules de garde qui aboutit à la fermeture stomatique et donc à la régulation du flux transpiratoire (Daskowska-Golec et Szarejko, 2013).

1.3. Régulation des pertes en eau : rôle des stomates

Les stomates sont des pores disséminés à la surface des feuilles (inférieure, supérieure, ou les deux) qui permettent les échanges gazeux entre la plante et l'atmosphère. Ils jouent un rôle essentiel dans le contrôle des pertes d'eau par transpiration, et dans l'entrée de CO₂ qui conditionne l'assimilation du carbone par la photosynthèse et permet la croissance des plantes. L'ouverture et la fermeture stomatique sont contrôlées par les variations de la pression de turgescence des cellules de garde entourant les pores. Ces variations peuvent être rapides et permettre à la plante de s'adapter à des changements soudains des conditions climatiques. Les

stomates jouent également un rôle clé dans la modulation du flux d'eau à travers le CSPE, permettant d'adapter ce flux à la disponibilité d'eau du sol et/ou à la demande évaporative. Les stomates sont sensibles à de multiples modifications environnementales, qu'elles soient liées aux facteurs climatiques (rayonnement solaire, température et humidité de l'air, vent) ainsi qu'à la disponibilité de l'eau dans le sol.

Les cinétiques journalières et/ou saisonnières de potentiel hydrique foliaire ont montré une large gamme de comportement des espèces pour la conservation de l'eau dans les tissus (Tardieu et Simonneau, 1998). Ces différences de comportement sont liées au contrôle stomatique. Elles permettent de classer les espèces entre celles à tendance isohydriques (maïs, peuplier, vigne, pommier) et celles à tendance anisohydriques (tournesol, amandier, pêcher) (Valancogne et al. 1997 ; Tardieu et Simonneau, 1998). Les espèces isohydriques ont un contrôle précoce de la fermeture stomatique permettant la conservation des ressources en eau et le maintien du potentiel hydrique foliaire à un niveau stable, quelles que soient la demande évaporative et la disponibilité en eau du sol. Par contraste, les espèces anisohydriques présentent un moindre contrôle stomatique du flux transpiratoire qui se maintient, permettant de plus fortes variations du potentiel hydrique foliaire lors de restrictions en eau du sol et lors d'une plus forte demande évaporative. La sensibilité du rythme de transpiration à la diminution du potentiel hydrique du sol et/ou à la demande de l'atmosphère semblent être les principaux éléments différenciant les espèces isohydriques et anisohydriques (Davies et Zhang, 1991 ; Buckley, 2005). Tardieu et Simonneau (1998) suggèrent que le contrôle stomatique chez les espèces isohydriques serait lié à une interaction entre une signalisation hormonale (avec en particulier l'acide abscissique) et hydraulique, alors que chez les plantes anisohydriques, les stomates répondraient préférentiellement aux signaux racinaires. Les comportements iso- et anisohydriques ne sont cependant pas exclusifs. Il a par exemple été démontré chez la vigne, espèce considérée comme majoritairement isohydrique, qu'une même variété pouvait se comporter comme plutôt isohydrique ou anisohydrique en fonction des conditions de déficit hydrique (intensité et durée), des conditions climatiques (température et déficit de pression de vapeur-VPD) et du porte-greffe (Chaves et al. 2010 ; Lovisolo et al. 2010 ; Domec et Johnson, 2012).

I.4. L'efficacité d'utilisation de l'eau et sa variabilité génétique

L'activité photosynthétique des plantes dépend du flux transpiratoire. En effet, la fermeture stomatique limite l'assimilation atmosphérique du CO_2 et entraîne une diminution des ressources en carbone de la plante que ce soit pour la croissance, pour le remplissage des grains (ou fruits) ou pour la constitution de réserves. La notion d'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE) rend compte de la capacité des plantes à assimiler le carbone en fonction de la consommation en eau. Utilisée en agronomie, l'efficacité d'utilisation de l'eau est un moyen d'améliorer les productions des plantes de grande culture ainsi que des arbres fruitiers pour des apports en eau définis. L'efficacité d'utilisation de l'eau peut être définie à plusieurs niveaux. Elle peut être représentée comme le rapport entre le carbone assimilé (A) et l'eau transpirée par la plante (E) à l'échelle instantanée (on parle alors d'efficacité de transpiration) ou intégrée dans le temps. Dans ce deuxième cas, il est nécessaire de connaître le gain de biomasse pour une période de temps donnée. L'efficacité de l'eau peut aussi être représentée par le ratio entre l'assimilation nette en carbone, A , et la conductance somatique, g_s . Ce ratio est alors nommé efficacité d'utilisation de l'eau intrinsèque, WUE_i . Ce paramètre peut être calculé à partir de la mesure des échanges gazeux à l'échelle de la feuille ou encore estimé par la composition isotopique en carbone (que ce soit la composition isotopique en ^{13}C , $\delta^{13}\text{C}$, ou la discrimination isotopique du carbone, $\Delta^{13}\text{C}$) (Farquhar et Richards, 1984 ; Guehl et al., 1995).

Bien qu'ayant des comportements transpiratoires différents, il a été montré chez la vigne que les valeurs de la WUE_i de cultivars iso- et anisohydriques étaient similaires que ce soit en conditions d'irrigation ou de contrainte hydrique (Lovisol et al., 2010). Néanmoins, d'autres travaux sur vigne ont démontré qu'il peut aussi exister une variabilité génétique du $\delta^{13}\text{C}$ sous l'incidence du stress hydrique au niveau des fruits (Gaudillère et al., 2002) ou au niveau foliaire (Marguerit et al., 2012). De plus, des études portant sur peuplier (Monclus et al., 2006 , 2009) ou fraisier (Grant et al., 2012) ont montré des différences significatives entre plantes stressées et non stressées ainsi qu'une variabilité génétique dans chacun des deux traitements pour le $\Delta^{13}\text{C}$ (ou le $\delta^{13}\text{C}$).

II. Le pommier

II.1. Données économiques

Le pommier est une culture fruitière majeure des régions tempérées dont la culture se situe majoritairement entre les 50° et 35° parallèles dans les 2 hémisphères. C'est la 3^{ème} espèce fruitière la plus cultivée au monde, après les agrumes et les bananes. En 2012, la production mondiale de pommes s'élevait à 76 millions de tonnes environ (source FAO Stat). Près de la moitié de la production mondiale est assurée par la Chine, avec 36 millions de tonnes, tandis que celle de l'Union européenne représente 15% de ce total, avec environ 11 millions de tonnes de pommes produites en moyenne pour la période 2010-12. La production européenne est relativement stable depuis une vingtaine d'années. La France est le troisième producteur d'Europe, après la Pologne et l'Italie, avec 1,4 millions de tonnes produites pour l'année 2012. La production est majoritairement issue de trois grandes régions : le bassin Rhône-Méditerranée, le bassin Val de Loire et le bassin Grand Sud-Ouest (Trillot et al., 2002). Près de 60% de la production est assurée par les cultivars « Golden Delicious » (32%), « Gala » (17%) et « Granny Smith » (9%), mais on observe une diversification variétale croissante, notamment avec le développement des variétés « club » (Cripps Pink, Cripps Red), plus marginalement de terroir (Chantecler), ou encore dédiées au mode de production biologique (Coop 43). Depuis une vingtaine d'années, la superficie occupée par les vergers de pommiers en France est en constante diminution ce qui se répercute sur le potentiel de production (<http://agreste.agriculture.gouv.fr/conjoncture/fruits/pomme/>).

II.2. Aspects taxonomiques, historiques et cytogénétiques

Le pommier cultivé est considéré comme un hybride interspécifique, généralement désigné par *Malus x domestica* Borkh. (Korban et Skirvin, 1984). Cette dénomination est sujette à discussion et on recense beaucoup de synonymes tels que *Pyrus malus* L., *Malus malus* Britt., *Malus sylvestris* Mill. et *Malus pumila* Mill. (Korban et Skirvin, 1984 ; Mabberley et al., 2001;

Juniper et Mabberley, 2006 ; Velasco et al., 2010). Bien que la dénomination *Malus pumila* Mill. ait été préconisée récemment, *Malus x domestica* Borkh. reste la dénomination de référence dans la base de données taxonomiques du NCBI (National Center for Biotechnology Information) et c'est la plus utilisée actuellement (Qian et al., 2010).

Le genre *Malus* appartient à la famille des *Rosaceae*, à la sous famille des *Maloideae* et à la tribu des *Pyreae* (incluant *Pyrus sp.*). Les espèces du genre *Malus* se retrouvent à l'état naturel en Asie et en Europe ainsi qu'en Amérique du Nord. Leurs origines géographiques proviendraient des régions d'Asie mineure et centrale, du Caucase, de l'Himalaya indien, du Pakistan ainsi que des provinces de l'ouest de la Chine (Zhang et al., 1993; Juniper et al., 1999). Les études récentes sur la variété « Golden Delicious » ont apporté de nouveaux éléments sur la structure du génome, l'évolution et la domestication du pommier (Velasco et al., 2010 ; Cornille et al., 2012). Ces éléments permettent ainsi de considérer *Malus sieversii* (Ledeb.) M.Roem. comme l'ancêtre commun de *Malus x domestica* (espèce cultivée) et de *Malus sylvestris*, espèces considérées comme distinctes bien que présentant de fortes similarités moléculaires (Coart et al., 2006). La comparaison de 23 gènes appartenant au genre *Malus* a permis de mettre en évidence que *Malus sieversii* et *Malus x domestica* étaient bien de la même espèce (Velasco et al., 2010). Ces résultats ont été confirmés par Micheletti et al. (2011).

La majorité des variétés de pommiers cultivées sont des diploïdes fonctionnels ($2n=34$) (Brown, 1992). Quelques variétés triploïdes de pommiers ($3x = 51$) sont également cultivées pour la qualité ou la grosseur de leurs fruits (« Reinettes du Canada », « Jonagold »), tandis que le statut tétraploïde est très peu répandu. Le nombre élevé de chromosomes ($x=17$) est supérieur à celui des autres sous-familles des *Rosaceae* ($x = 7$ à 9) (Chevreau et al., 1985). Il est aujourd'hui reconnu que les espèces appartenant à la sous-famille des *Maloideae* ont une origine polyploïde (Evans et Campbell, 2002). Les données de séquençage du génome de la variété « Golden Delicious » (Velasco et al. 2010) à la suite des travaux d'Evans et Campbell (2002) ont confirmé l'hypothèse de l'auto-polyploïdisation. Le génome du pommier proviendrait ainsi de la duplication, relativement récente (moins de 50 millions d'années), du génome d'un taxon ancestral sauvage de *Rosaceae* apparenté à *Gillenia* ($x=9$). Velasco et al. (2010) ont proposé pour sa constitution un modèle parcimonieux impliquant un réarrangement des chromosomes, avec ruptures et fusions, permettant d'expliquer le caryotype actuel des *Pyreae* ($x=17$) à partir d'un

phénomène de polyploïdisation de 2 génomes ($x=9$) (Figure 3). La duplication d'un génome ancestral sauvage explique la forte colinéarité des chromosomes 5 et 10, 3 et 11, 4 et 12, 6 et 14, 13 et 16, et 9 et 17 (Figure 3), tandis que les chromosomes 1, 2, 7, 8 et 15 ne semblent pas dupliqués. La réorganisation du génome des *Pyraea* se serait produite avant la divergence des genres *Pyrus* et *Malus*, et les espèces de ces 2 genres présentent une identité nucléotidique de 96% (Velasco et al., 2010).

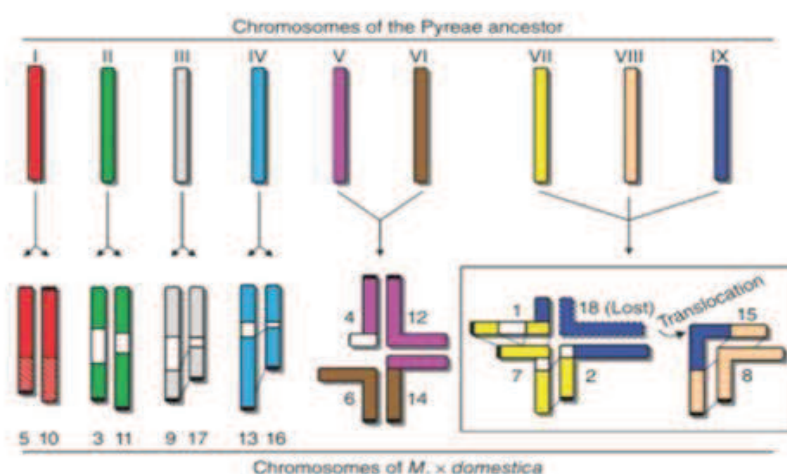


Figure 3. Modèle expliquant la constitution du génome actuel de *Malus*. Le modèle parcimonieux implique un génome ancestral à 9 chromosomes de base évoluant vers le génome actuel de *Malus* à 17 chromosomes. Une duplication du génome, suivie d'un réarrangement des chromosomes, est proposée comme modèle sur la base des données de séquence du génome de la variété « Golden Delicious ». Les couleurs partagées indiquent les homologies entre chromosomes. Les fragments blancs de chromosome indiquent l'absence de portion dupliquée. Les parties hachurées sur les chromosomes 5 et 10 indiquent une homologie partielle (d'après Velasco et al., 2010).

II.3. Effets de la contrainte hydrique chez le pommier

Des bassins importants de culture des arbres fruitiers, Californie, Israël, zone Nord-méditerranéenne, se sont développés selon un modèle d'agriculture intensive, avec l'apport de l'irrigation. Dans ces régions, durant la saison de végétation, les vergers bénéficient d'apports

d'eau constants, pilotés pour maintenir les arbres en situation de confort hydrique. Néanmoins, le problème de la diminution des ressources en eau peut créer une tension entre les activités humaines et les besoins des cultures en période estivale, notamment dans la zone méditerranéenne (Evans et Sadler, 2008). De plus, en région aride et semi-aride (ex : Israël), la survie de vergers est dépendante de la disponibilité en eau pour l'irrigation pendant la majeure partie la saison de végétation (Girona et Naor., 2012).

II.3.a. Effets sur la production

Dans les zones de production fruitière commerciale, les performances en termes de productivité, de taille et de qualité du fruit, de potentiel de stockage et de production à long terme sont fortement dépendantes de l'irrigation et de sa conduite. Plusieurs études ont montré que le calibre des fruits est très sensible à la disponibilité en eau (Naor et al., 1995 ; Naor, 2006 ; Girona et al., 2010) ainsi qu'à la charge en fruits (Naor et al., 2008). La disponibilité en assimilats constitue un facteur limitant de leur grossissement (Naschitz et al., 2010). Par ailleurs, les effets du stress hydrique sont dépendants de la période. En effet, un stress hydrique survenant en début de saison induit une diminution de la taille des fruits, une diminution de la nouaison et une augmentation de la chute des jeunes fruits (Powell, 1974 ; Failla et al., 1992 ; Rufat et al., 2003). Si un stress survient lors des phases précoces de développement, en phase de division cellulaire, les effets seront dépendants de l'intensité du stress. Le stress hydrique agit aussi sur la qualité des fruits. Des résultats contradictoires ont été trouvés concernant l'effet de la contrainte hydrique précoce sur la fermeté des fruits : le stress hydrique subi lors de la phase de division cellulaire peut augmenter, diminuer ou ne pas avoir d'effet sur la fermeté des fruits au moment de la récolte (Ebel et al., 1993, Mills et al., 1994 ; Mpelasoka et al., 2001a). Par ailleurs, l'augmentation de la fermeté des fruits pourrait être une cause indirecte du manque d'eau. En effet, il a été montré qu'un stress modéré survenant lors d'une phase plus avancée de développement des fruits, à l'approche de la maturation, augmente la teneur en sucres solubles et la fermeté des fruits (Behboudian et Mills, 1997).

Généralement, les périodes de stress hydrique coïncident avec les périodes de forte chaleur (augmentation du VPD) et engendrent donc des stress thermiques et oxydatifs pouvant

affecter la production fruitière. Makedza et al. (2013) ont ainsi montré qu'un stress hydrique favorisait les coups de soleil (plage de décoloration liée à la dégradation des pigments) sur la variété «Cripps Pink». D'autre part, Torres et al. (2013) ont montré que la teneur relative en eau des pommes diminuait avec la sévérité des coups de soleil chez deux variétés commerciales «Royal Gala» et «Fuji». L'exposition au soleil induit une accumulation de sorbitol et de glucose et altère la forme et la fermeté des fruits. Cette étude montre aussi une forte augmentation des concentrations internes en éthylène en conditions modérées et sévères d'exposition au soleil, et les auteurs suggèrent que l'éthylène pourrait être responsable de la plus faible croissance de ces fruits par comparaison avec les fruits moins directement exposés.

II.3.b. Effet sur les cycles de développement végétatif et reproducteur

Comme pour la qualité des fruits, les effets du stress hydrique sont dépendants du cycle de développement du pommier. Behboudian et al. (1998) ont montré qu'un stress modéré, se produisant durant les 100 jours après la pleine floraison, induisait une diminution de la croissance végétative, alors qu'un stress sévère après cette période a peu d'effet. Cependant, durant cette dernière période, si le stress se prolonge, il peut influencer la croissance, le retour à fleur et la production de l'année suivante (Ferree and Schmid, 1990 ; Ebel, 1991 ; Larrieu, 2004 ; Girona., 2010a). Néanmoins, bien qu'un stress modéré puisse réduire la croissance de l'arbre l'année suivante, le nombre de bourgeons floraux et la charge en fruit ne sont pas nécessairement affectés (Girona et al., 2008). D'autre part, un stress hydrique sévère peut aussi provoquer une induction florale supérieure et faire entrer la plante dans un cycle d'alternance de production (Mathieu, 2011).

II.3.c. Effet sur la réponse transpiratoire

Le pommier est considéré comme une espèce isohydrique (Landsberg et al., 1975 ; Jones, 1992, Lakso, 2014). Les travaux effectués sur une descendance issue d'un croisement entre « Starkrimson » et « Granny Smith » ont montré une forte réponse stomatique au déficit hydrique

atmosphérique (valeurs élevées de VPD) confirmant le caractère isohydrique de l'espèce. Néanmoins, les travaux de Beikircher et al. (2013) n'excluent pas la possibilité d'un passage du comportement isohydrique au comportement anisohydrique.

La réponse à la contrainte hydrique peut être modulée par l'utilisation de porte-greffes tolérants (Cohen et Naor, 2002 ; Ma et al., 2010). Liu et al (2012) ont testé la réponse de différents traits morphologiques et écophysologiques de la variété « Royal Gala » greffée sur une gamme de porte-greffes. Les résultats ont montré que les pommiers associés avec les porte-greffes réputés les plus tolérants à la sécheresse présentaient une plus faible diminution de l'assimilation, de la transpiration et de la conductance stomatique, et augmentaient de façon proportionnelle leur efficacité d'utilisation de l'eau (WUE plus élevée et valeur moins négative du $\delta^{13}C$) comparativement aux pommiers greffés sur des porte-greffes sensibles à la sécheresse. De plus, des études sur des porte-greffes non greffés ont montré une variabilité génétique pour les échanges gazeux pour différents niveaux de régime hydrique (Atkinson et al., 2000 ; Ma et al., 2010).

Dans une étude sur deux variétés greffées, Massonnet et al. (2007) rapportent qu'il existe une plus faible conductance stomatique maximale, une plus faible transpiration foliaire, ainsi qu'une meilleure efficacité de l'eau intrinsèque (WUE_i) chez le cv. « Braeburn » que chez le cv. « Fuji ». Cependant, une étude portant sur 31 cultivars de pommiers placés en conditions témoin ou sous contrainte hydrique ne révèle pas de différence significative entre cultivars pour la conductance stomatique et le taux de transpiration (T_r) contrairement à la photosynthèse nette (A) (Liu et al., 2012). Néanmoins, cette étude souligne une plus grande sensibilité de g_s et T_r face à la contrainte hydrique du sol et révèle aussi des différences significatives entre cultivars pour la WUE instantanée et à long terme ainsi que pour $\delta^{13}C$.

Un autre facteur pouvant influencer le comportement transpiratoire chez le pommier est la charge en fruits. Wünsche et al. (2000) ont montré que la conductance stomatique (calculée d'après la mesure des flux gazeux de la feuille vers l'atmosphère) et le taux d'assimilation augmentaient avec la charge en fruits de l'arbre. Il apparaît aussi, qu'après la récolte, la transpiration et la photosynthèse tendent à diminuer pour retrouver le niveau des arbres témoins sans fruits (Pretorius et Wand, 2003). Bien que la conductance stomatique soit influencée par l'état hydrique du sol et la charge en fruits, et fortement corrélée au potentiel hydrique minimum

(Naor, 1995, 2006), Doltra et al. (2007) montrent que la valeur minimale du potentiel hydrique de tige, mesurée sur feuille non transpirante pendant la journée, est le meilleur indicateur du statut hydrique des pommiers en conditions de stress. Par ailleurs, Naor et al. (2008) ont montré que le potentiel hydrique minimum diminuait non seulement avec la charge en fruits mais aussi avec l'intensité de la contrainte hydrique appliquée.

II.4. L'amélioration génétique chez le pommier

II.4.a. Cibles actuelles

Les principaux objectifs de sélection et de création variétale chez le pommier concernent actuellement la qualité et l'attrait du fruit, la résistance aux bio-agresseurs ainsi que la régularité de production (Laurens et al., 2000, 2010). De nombreux programmes de sélection visent ainsi la création de nouvelles variétés aux qualités de fruits améliorées (couleur, taille, forme, goût et texture), tout en gardant des capacités de conservation (Gardiner et al., 2007 ; Chagné et al., 2013). Il est important que la balance entre ces critères puisse être assurée tant pour le consommateur que pour le producteur. Afin de réduire les coûts de production et le nombre de traitements phytosanitaires durant la culture, la création de génotypes résistants aux maladies a été considérée comme un objectif de sélection important chez le pommier. Ainsi les résistances à la tavelure et à l'oïdium constituent des critères majeurs pour la sélection des nouvelles variétés (Laurens, 2000 ; Trillot et al., 2002). La résistance à ces deux maladies est en effet considérée par la recherche publique comme cruciale pour les futurs cultivars, tandis que les choix de la profession arboricole priorisent souvent la typicité et la qualité des fruits au détriment de ces traits (Brun et al., 2008). Par ailleurs, des gènes majeurs impliqués dans les résistances aux principaux ravageurs (puceron cendré et puceron vert) et maladies (tavelure et oïdium) ont été mis en évidence (Calenge et al., 2005; Durel et al., 2009 ; Bus et al., 2010). Ceci a permis de développer de nouveaux génotypes porteurs par exemple d'une résistance à la tavelure et présentant une bonne qualité gustative (Laurens et al., 2005). Pour la tavelure toutefois, la résistance introduite, due au gène Vf issu de *M. floribunda*, a été contournée par de nouvelles souches de ce pathogène (Parisi et al., 2004, Caffier et Laurens, 2005) ce qui démontre les limites

d'une démarche basée sur la seule introduction de gènes majeurs de résistance. La stratégie de sélection est maintenant orientée vers le pyramidage de gènes majeurs et de résistances partielles (Gessler et al., 2006 ; Bus et al., 2010 ; Le Van et al., 2013). Cette nouvelle conception de la sélection variétale a également été étendue à l'introduction de nouveaux traits d'intérêt et critères issus de la demande sociétale. Elle aboutit à une combinaison complexe de divers critères de sélection qui peuvent être regroupés dans la notion d'idéotype. Celle-ci, introduite par Dickman (1985), repose sur la sélection de génotypes « idéaux » pour un ensemble de critères agronomiques, environnementaux et sociétaux (Dickman et al., 1994, Costes et al., 2009). Les réflexions conduites sur la notion d'idéotype se doivent toutefois d'intégrer la durée des cycles de sélection depuis la conception jusqu'à la mise sur le marché, qui est de l'ordre de 15 à 20 ans, et parfois plus dans le cas du pommier (Myles, 2013). Il est clair que durant une telle période les caractères ciblés changent, ce qui contraint à une démarche évolutive du sélectionneur, intégrant les nouvelles demandes socio-économiques et/ou critères agronomiques au fur et à mesure de leur émergence.

II.4.b. Prise en compte de la tolérance ou de l'adaptation à la contrainte hydrique

Dans ce contexte, la prise en compte de caractères nouveaux, permettant l'adaptation des plantes au changement climatique en cours, apparaît de plus en plus nécessaire, y compris chez les arbres fruitiers. Il reste néanmoins à définir les caractères d'intérêt à prendre en compte pour construire de nouvelles variétés possédant des caractères de résistance ou de tolérance à de faibles apports d'eau. En effet, chez les arbres fruitiers, le rendement en fruits n'est pas seulement fonction de la production de biomasse comme c'est le cas pour les cultures céréalières ou forestières : dans les vergers commerciaux, le potentiel de production maximale de fruits peut-être réduit de 50% par l'éclaircissage afin de permettre un grossissement optimal des fruits restants et d'assurer la qualité requise pour la commercialisation (Dennis, 2000 ; Bassett, 2013). Par ailleurs, l'application de différentes techniques visant à optimiser l'usage de l'eau d'irrigation permet de préserver les rendements, bien que des résultats contradictoires aient été obtenus ce qui ne permet pas de tirer de conclusions définitives de cette approche (Ebel et al., 2001 ; Mpelasoka et al., 2001 ; Einhorn et Caspari, 2004 ; Leib et al., 2006). L'ensemble de ces éléments montre

aussi que la perte de rendement souvent associée à une meilleure efficacité de l'eau (*WUE*) n'est pas forcément vérifiée pour les arbres fruitiers. Chez le pêcher, Glenn et al. (2010) ont identifié des variétés possédant une forte efficacité d'utilisation de l'eau sans pour autant compromettre la production.

Tardieu (2005) rappelle l'importance de ne pas contre-sélectionner la productivité en recherchant à tout prix une plus forte efficacité d'utilisation de l'eau. Améliorer la *WUE* ne permet pas nécessairement de mieux tolérer la sécheresse (Blum, 2005 ; Christmann et al., 2007). En effet, si les vergers soumis à des périodes de stress récurrents ne sont pas capables de survivre, le bénéfice de l'amélioration ou de la sélection pour une meilleure *WUE* peut être perdu (Blum, 2009, Saledeck et al., 2009 ; Mir et al., 2012). Le turn-over des vergers et leur capacité à tolérer des sécheresses répétées d'une année à l'autre est aussi un facteur à prendre en considération.

Cette mise en perspective sur l'amélioration pour la tolérance aux contraintes abiotiques, dont la mise en œuvre sera requise à relativement brève échéance de façon à préparer de nouveaux matériels génétiques pour les prochaines décennies, est cependant limitée par le manque de méthodologies disponibles pour mesurer les réponses des arbres aux conditions environnementales et par les incertitudes sur les évolutions du climat. Il convient toutefois de noter que des travaux, conduits depuis quelques années par l'USDA de Kearneysville (WV, USA), exploitent la diversité génétique du pommier collectée au Kazakhstan. Ces travaux ont révélé la tolérance au stress hydrique de certaines espèces de *Malus* (Bassett, 2013).

III. Génétique des caractères quantitatifs

La génétique quantitative est la génétique des caractères dont l'observation passe par une mesure. Elle permet l'analyse des caractères à variation continue et à déterminisme complexe, c'est-à-dire gouvernés par plusieurs facteurs génétiques et plusieurs facteurs non génétiques (on parle également de génétique multifactorielle). Cette approche s'applique donc à l'étude des mécanismes de réponse des plantes au stress hydrique qui sont des variables quantitatives. En outre, compte tenu de son origine polyploïde et de la duplication de son génome, la génétique des

caractères chez le pommier résulte majoritairement de déterminismes complexes, gouvernés de façon conjointe par plusieurs zones du génome.

III.1. Notions de génétique quantitative

A une échelle donnée, le phénotype correspond au caractère qui est mesuré et/ou estimé. La mesure est appelée valeur phénotypique. Son expression est gouvernée par le génotype de l'individu et par l'environnement dans lequel il évolue. Le génotype d'un individu à un locus donné (qui est un emplacement physique précis et invariable sur un chromosome) correspond à la combinaison des allèles qu'il possède à ce locus (correspondant à deux gènes homologues pour un individu diploïde). Par extension, le génotype en plusieurs loci est l'ensemble des génotypes à chacun d'entre eux. L'environnement au sens large recouvre l'ensemble des facteurs non-génétiques pouvant influencer l'expression du phénotype, comme les conditions climatiques, les pratiques culturales et les différentes contraintes subies par l'individu.

La génétique quantitative permet de modéliser la part du génotype (G), celles de l'environnement (E) et leur interaction ($G \times E$) dans l'expression du phénotype (P) à travers la relation suivante (Hanson, 1963 ; Comstock et Moll, 1963 ; Gallais, 1989) :

$$P_{ijk} = \mu + G_i + E_k + (G \times E)_{ik} + e_{ijk}$$

où P_{ijk} est la valeur phénotypique de la répétition j du génotype i pour un environnement k , μ est la moyenne des valeurs phénotypiques de la population, G_i est la valeur du génotype i , E_k est l'effet de l'environnement k , $(G \times E)_{ik}$ est l'effet de l'interaction entre le génotype i et l'environnement k , et e_{ijk} est l'effet résiduel. Ce modèle est considéré comme mixte car l'effet E est considéré comme facteur fixe et l'effet G ainsi que l'interaction $G \times E$ comme facteurs aléatoires. A partir de la variance de chacun des termes de ce modèle, il est possible de calculer l'héritabilité au sens large (h^2_b) du caractère considéré. L'héritabilité au sens large correspond à la part de la variabilité phénotypique attribuée aux facteurs génétiques (G) en lien ou non avec l'environnement ($G \times E$). Elle peut être exprimée de la façon suivante (Hanson, 1963 ; Comstock et Moll, 1963 ; Gallais, 1989) :

$$h^2_b = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_G^2 + \sigma_{GE}^2/l + \sigma_e^2/rl},$$

Où l est le nombre de sites et r est le nombre de répétitions de chaque génotype par site. Lorsque l'on considère uniquement l'effet génotypique, l'héritabilité au sens large peut être calculée à partir de la valeur F qui est la statistique de Fisher pour l'effet génotypique dans le modèle considéré : $h^2_b = 1 - (1/F)$ (Gallais, 1989). Une variable est considérée comme héritable lorsque sa valeur d'héritabilité est supérieure à 0,2.

A partir des modèles mixtes qui permettent de décomposer les différents effets de la valeur phénotypique, il est possible d'estimer une valeur génotypique pour la détection de QTL. Cette valeur génotypique est appelée meilleur prédicteur linéaire non biaisé (Best Linear Unbiased Predictor – BLUP). Par exemple, pour un modèle mixte prenant en compte en effets aléatoires (i) l'effet du génotype et (ii) l'interaction de l'effet du génotype avec un facteur modalité d'irrigation à deux niveaux (irrigué vs non irrigué), trois séries de BLUPs seront estimées : une série de BLUPs estimant la valeur génotypique de chacun des génotypes en condition d'irrigation, une série estimant la valeur génotypique en condition de non-irrigation et une série estimant la valeur génotypique de chacun des génotypes indépendamment de la situation d'irrigation.

III.2. La détection de QTL

III.2.a. Principe

La détection de QTL consiste à rechercher des zones du génome (Quantitative Trait Loci – QTL) impliquées dans l'expression d'un caractère (ou phénotype) considéré comme héritable. Nous avons vu précédemment que les loci sont situés à des zones invariantes des chromosomes. Cependant, il peut exister différentes copies d'un même gène à un même locus. Ces différentes formes à un même locus sont appelées allèles. La détection de QTL correspond donc à rechercher des loci au sein du génome (répertorié sur une carte génétique) en se basant sur l'association entre le polymorphisme allélique et la valeur phénotypique (qui peut être la moyenne

génotypique des répétitions ou encore les BLUPs). La détection des QTL nécessite une population en ségrégation présentant une large variabilité pour les caractères considérés, c'est-à-dire issue de parents qui doivent être polymorphes pour ces caractères afin de générer une variabilité génétique au sein de la descendance. De plus, il est nécessaire qu'il existe une carte génétique pour la population d'étude. La carte génétique utilisée dans notre étude comprend essentiellement des marqueurs microsatellites (Single Sequence Repeats - SSR). Ces marqueurs moléculaires sont des séquences nucléotidiques d'ADN présentant des variations (mutations de substitution, réarrangements, insertions ou délétions, ou erreurs dans la réplication des séquences d'ADN répétées en tandem). L'application de ces marqueurs moléculaires dans les populations en ségrégation permet de construire des cartes génétiques dont l'objectif est de baliser le génome. Les marqueurs sont regroupés par chromosomes qui sont alors appelés groupes de liaison (linkage groups, LG) (de Vienne, 1998). Le dernier prérequis nécessite de pouvoir mesurer le caractère d'intérêt sur l'ensemble des individus de la population (Prioul et al., 1997).

Chez les espèces pérennes ligneuses à multiplication végétative, comme le pommier, les cultivars parentaux sont hétérozygotes (présentant deux allèles différents pour un même gène) et, de ce fait, les populations de cartographie utilisées sont généralement des descendances d'individus de première génération (F1). Il s'agit d'une stratégie dite de double pseudo-testcross, initialement proposée par Grattapaglia et Sederoff (1994), dans laquelle 2 cartes parentales sont d'abord construites sur la base des marqueurs polymorphes chez chacun des parents. Ensuite, l'utilisation de marqueurs polymorphes chez les deux parents du croisement -généralement des microsatellites- permet d'effectuer des « ponts » entre les deux cartes, et ainsi de les fusionner en une seule carte dite consensus ou intégrée. Les cartes ainsi construites sont utilisées pour effectuer la détection des QTLs.

III.2.b. Applications

La détection de QTL peut être effectuée à partir d'une approche dite de cartographie par intervalle (Interval Mapping : IM). L'IM se base sur l'utilisation de plusieurs marqueurs et tire parti de l'information issue de la construction de la carte génétique (Lander et Botstein, 1989). La

recherche de QTL est alors effectuée dans les intervalles entre marqueurs en utilisant l'information des marqueurs adjacents. La distance de chacun de ces marqueurs à la position testée est lue sur la carte génétique utilisée puis convertie en taux de recombinaison en inversant la fonction de distance de la carte. Il est alors possible d'estimer les classes alléliques à la position testée en fonction du taux de recombinaison et ainsi de tester une association entre cette position et le phénotype d'intérêt. A chaque position testée, l'IM calcule un LODscore (Logarithm of the odds) indiquant la probabilité de présence du QTL à cette position. Les LODscores sont déterminés sur l'ensemble de la carte chromosomique et ceux dont la valeur dépasse un seuil suggèrent la présence d'un QTL dans cette partie du chromosome. La valeur seuil est définie par un test de permutation qui utilise des sous-ensembles de données permettant d'obtenir une distribution des LODscores maximum pour chaque permutation. En général 1000 permutations sont effectuées.

L'avantage majeur de l'IM est de pouvoir localiser des QTLs sur une carte génétique de façon relativement précise sans nécessiter une densité de marquage élevée (Darvasi et al., 1993). Néanmoins, une carte présentant une faible densité de marqueurs peut conduire à la détection de QTLs ayant de larges intervalles de confiance (supérieur à 20cM), contenant donc de multiples loci pouvant influencer le même caractère (Price, 2006). De plus, avec cette approche, les effets de QTLs proches sur un même groupe de liaison sont confondus.

Afin d'éliminer ce problème, la cartographie de QTLs multiples (Multiple QTL Mapping : MQM) a été développée (Jansen, 1993 ; Zeng, 1993, 1994). Cette approche, qui combine IM et régression multiple, permet de réduire l'erreur résiduelle du modèle en absorbant la variance génétique associée aux QTLs déjà détectés. Pour cela, le marqueur le plus proche du QTL détecté est sélectionné et est intégré au modèle en tant que cofacteur dans le modèle MQM.

A l'issue de la cartographie, les QTLs détectés sont caractérisés par différents paramètres : (i) leur position en cM (unité de mesure de distance sur un groupe de liaison) correspondant au maximum de LODscore, (ii) les intervalles de confiance de leur position généralement déterminés par la distance correspondant à des diminutions de LOD de 1 et 2 points, (iii) le pourcentage de variation phénotypique expliquée par le QTL dans le modèle (R^2), et (iv) les effets alléliques responsables de ce QTL : les additivités femelle et/ou mâle, ou encore un effet de dominance.

III.3. Déterminisme génétique de la réponse au stress chez les ligneux

Chez les plantes pérennes, contrairement aux cultures céréalières, les bases génétiques de la variabilité de transpiration des plantes face à la demande en eau restent peu connues. L'une des variables les plus étudiée est la composition isotopique du carbone dans ses différentes fractions, qui est fortement corrélée à l'efficacité d'utilisation de l'eau intrinsèque WUE_i (A_n/g_{sw}). Farquhar et al. (1989) ont mis en évidence les bases physiologiques de la différence de composition isotopique en ^{13}C , $\delta^{13}C$, dans les différents tissus et organes de la plante, qui est notamment due à l'affinité plus grande de la Rubisco pour le ^{12}C , mais également à la discrimination s'opérant en faveur du ^{12}C lors des transferts. En condition de régulation stomatique et donc de moindre disponibilité en carbone, la Rubisco est moins discriminante vis-à-vis du ^{13}C et fixe proportionnellement plus de $^{13}CO_2$ qu'en condition de pleine irrigation. Le $\Delta^{13}C$ rend compte de l'efficacité d'utilisation de l'eau intrinsèque WUE_i , à l'échelle foliaire et peut via l'efficacité d'utilisation de l'eau à l'échelle intégrée d'une saison ou de plusieurs années, WUE (A_n/E), souvent être négativement corrélé à la production de biomasse bien que ce ne soit pas toujours le cas (Monclus et al., 2005, 2006, 2009). Ces éléments font du $\Delta^{13}C$ une variable d'intérêt pour l'amélioration variétale visant à améliorer la WUE afin de maintenir (ou si possible d'augmenter) les rendements en conditions hydriques défavorables. En environnement naturel, les travaux sur pin maritime (Brendel et al., 2002), sur châtaigner (Casasoli et al., 2004) et sur chêne (Brendel et al., 2008) ont mis en évidence une variabilité naturelle pour le $\delta^{13}C$ dans ces espèces et un certain nombre de QTLs impliqués dans le contrôle de ce caractère ont pu être détectés. Des travaux réalisés en conditions contrôlées sur cotonnier (Saranga et al., 2004) et sur saule (Rönnberg-Wästljung et al., 2005) ont montré l'existence de QTLs communs entre les plants irrigués et stressés, mais aussi de QTLs ne s'exprimant que dans l'une ou l'autre de ces conditions pour des caractères liés à la WUE ($\delta^{13}C$), à la croissance ou au rendement. Plus récemment, les travaux de Marguerit et al. (2012) sur vigne ont permis de mettre en évidence sur une descendance de porte-greffes, en conditions d'alimentation en eau variées, un certain nombre de QTLs liés à la transpiration journalière et à la capacité d'extraction de l'eau du sol.

Les études sur le déterminisme génétique pour le comportement de transpiration sont bien souvent limitées par le choix des caractères et par le temps nécessaire pour les mesurer. Par ailleurs, en condition de plein champ, le phénotypage de la transpiration foliaire exige des conditions environnementales stables pour la durée de l'expérimentation, reproductibles d'une date à l'autre, ainsi que des moyens humains et matériels assez importants. Jones et al. (2009) ont proposé l'introduction de l'imagerie thermique comme méthode performante et sensible pour le phénotypage du comportement stomatique en réponse à la sécheresse en conditions de plein champ.

IV. La télédétection comme outil de phénotypage à haut débit

L'utilisation de l'imagerie pour le phénotypage à haut débit est en plein essor. Son caractère non invasif et non destructif en fait une méthode de choix, permettant aujourd'hui la conception d'outils d'acquisition performants. Le développement de systèmes d'acquisition à différentes échelles (de l'individu à la parcelle) fait l'objet d'une attention toute particulière chez les céréales pour lesquelles des « phénomobiles » ont déjà vu le jour. Il s'agit d'engins équipés d'une rampe instrumentée de capteurs permettant d'acquérir des données dans différents domaines du spectre lumineux et sous différents angles (Comar et al., 2012 ; Andrade-Sanchez et al., 2014). Sur les cultures fruitières il n'existe pas encore de programme équivalent. Cependant, les travaux en verger pour l'évaluation du stress hydrique par imagerie thermique montrent que cette technologie pour le phénotypage de ces cultures est possible. Lorsqu'elle est associée à la télédétection, il est possible de caractériser de façon simultanée un grand nombre d'individus. Cette partie présente les principes généraux de la télédétection ainsi que différents indicateurs utilisés pour le suivi des cultures et leur intérêt pour le phénotypage à haut débit.

IV.1. Principes et notions de télédétection

Le dictionnaire des termes normalisés des sciences et techniques définit la télédétection comme étant : « l'ensemble des connaissances et techniques utilisées pour déterminer des caractéristiques physiques et biologiques d'objets par des mesures effectuées à distance, sans contact matériel avec ceux-ci ». De manière plus restrictive, la télédétection se rapporte à la détection, la mesure ou l'acquisition d'informations sur un objet ou un phénomène via la mesure du rayonnement électromagnétique émis ou réfléchi par l'objet étudié dans un certain domaine de longueurs d'ondes (ex : visible, infrarouge, infrarouge thermique, micro-ondes).

En télédétection, chaque système « vecteur – capteur » peut être caractérisé par une résolution spectrale (nombre et largeur des bandes), spatiale (taille du pixel de l'image) et temporelle (fréquence de revisite). L'ensemble de ces caractéristiques détermine ainsi les potentialités du système pour le suivi des couverts végétaux et l'aide à la gestion des cultures. Le choix du couple « vecteur – capteur » est conditionné par les objectifs à réaliser. L'imagerie satellitaire, par exemple, permet un suivi de l'évolution de la biomasse foliaire à l'échelle des continents sur plusieurs années, alors que l'utilisation de spectroradiomètres portables de terrain permet une prise de mesure à l'échelle de la feuille pour étudier ses propriétés structurales ou biochimiques. Entre ces deux extrêmes, le choix de vecteurs tels que les avions, ULM, drones, ou encore tracteurs permettent des suivis de végétation à l'échelle régionale, locale, de la parcelle ou de la fraction de parcelle. Pour le phénotypage à haut débit, l'utilisation des vecteurs est conditionnée par le type de culture étudiée, les réponses biologiques recherchées et le type de capteur utilisé pour appréhender ces réponses. Néanmoins la haute résolution spatiale recherchée pour ces études nécessite le choix de vecteur légers (ULM, drone) permettant de voler à basse altitude de façon à pouvoir discriminer chaque individu, ce qui restreint le choix des capteurs car les vecteurs légers ne peuvent pas embarquer des systèmes d'acquisition lourds.

Les capteurs permettent de mesurer l'énergie réfléchie ou émise par un objet. La source de cette énergie est généralement naturelle et provient du soleil. On parle alors de télédétection passive. Mais l'énergie peut aussi provenir d'une source artificielle comme c'est le cas pour les radars et lidars qui vont émettre un rayonnement vers l'objet et mesurer le signal réfléchi en retour. On parle alors de télédétection active. La source d'énergie peut aussi provenir de l'objet

lui-même, comme c'est le cas dans le domaine de l'infrarouge thermique. On mesure alors un rayonnement émis.

Selon les domaines de longueurs d'ondes utilisés, il est possible de caractériser les couverts végétaux pour leur état nutritionnel, leur état hydrique ou leur réponse transpiratoire aux facteurs environnementaux (Pinter et al., 2003). La suite de cette partie présentera les domaines optiques réflectifs et infrarouges thermiques ainsi que les principaux indicateurs utilisés pour caractériser les couverts végétaux.

IV.2. Applications de la télédétection aux couverts végétaux

IV.2.a. Domaine optique réflectif (du visible au moyen infrarouge)

La réflectance (ratio entre énergie réfléchie et énergie incidente) des couverts végétaux dépend des propriétés optiques des feuilles (structure et composition biochimiques) et de leur organisation spatiale au sein du couvert. A l'échelle foliaire, la fraction de lumière réfléchie dans le domaine du visible (400 à 700 nm) dépend fortement de la présence des pigments chlorophylliens et accessoires (Figure 4). La lumière est principalement absorbée par les chlorophylles a et b dans les bandes rouges (~640 à 660 nm) et bleues (~430 à 450 nm) du domaine visible et partiellement réfléchie dans la bande verte (~550 nm). A l'inverse, dans le domaine du proche infrarouge (700 à 1300 nm) la lumière est fortement réfléchie à cause des propriétés structurales des feuilles. La combinaison d'une faible réflectance dans le visible et d'une réflectance élevée dans le proche infrarouge est spécifique à la végétation. Dans la troisième région du domaine réflectif, le moyen infrarouge (1300 à 2500 nm), la lumière est principalement influencée par la teneur en eau des tissus foliaires. La réflectance dans cette région du spectre est relativement forte pour les couverts végétaux vigoureux mais elle décroît en cas de déshydratation des tissus foliaires (Pinter et al., 2003).

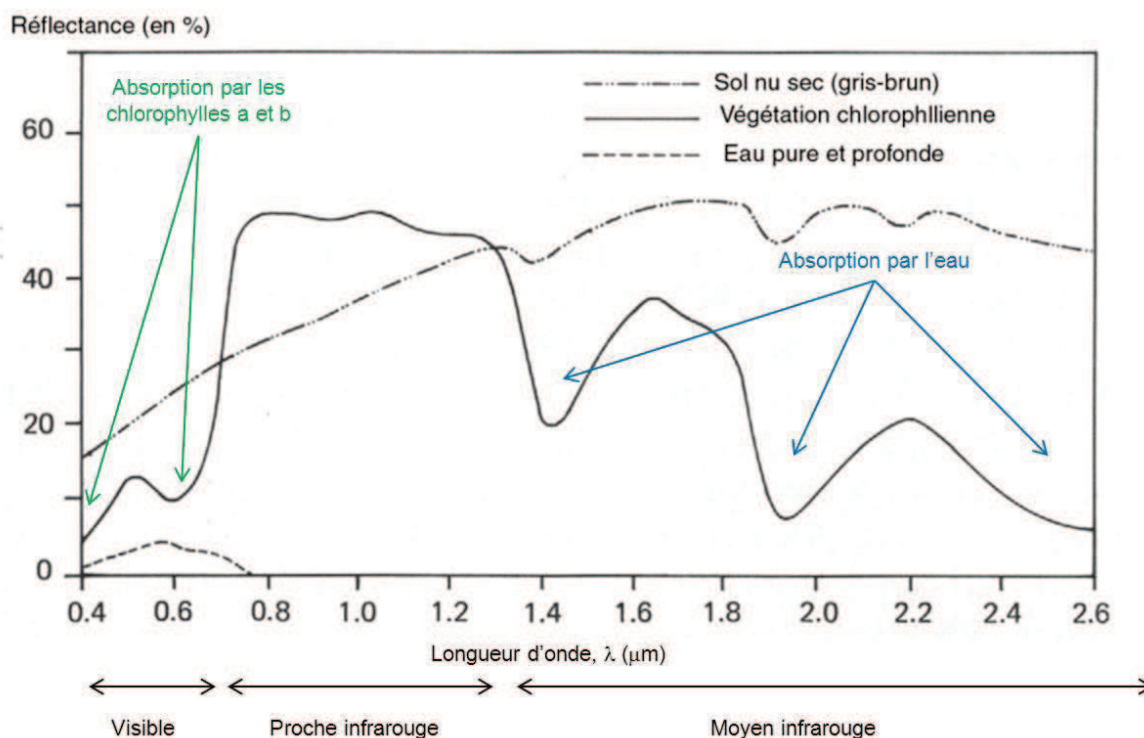


Figure 4. Courbes typiques de la réflectance spectrale de la végétation. Le graphique distingue les spectres de la végétation chlorophyllienne, du sol et de l'eau (d'après Lillesand et Kifer, 1987).

Les mécanismes influençant la réflectance des feuilles sont bien connus (Kumar et al., 2001) mais restent néanmoins difficiles à interpréter à l'échelle de la canopée à cause des nombreuses interactions de la lumière au sein du couvert ainsi qu'avec le sol (Ross, 1981 ; Widlowski et al., 2004 ; Disney et al., 2006). Le principal facteur influençant la réflectance du couvert végétal est sa structure qui est caractérisée par les propriétés optiques des feuilles (épaisseur des feuilles, proportion de mésophile, composition de l'épiderme, nervation ; Comar et al., 2014), par les propriétés du couvert (densité, distribution angulaire des feuilles, agrégation ; Sinoquet et al., 2007).

L'utilisation d'indices de végétation fournit une méthode simple pour interpréter la réponse de la végétation à partir du spectre complexe réémis par la canopée (Pinter Jr et al., 2003). Le *NDVI* (Normalized Difference Vegetation Index), un des indices le plus utilisés en télédétection, est calculé à partir des bandes rouges, R, et proche infrarouge, PIR : $NDVI = (PIR - R) / (PIR + R)$

$R) / (PIR + R)$ (Rouse et al., 1973). Cet indice, à la fois sensible à la teneur en pigments chlorophylliens (traduisant une capacité d'absorption de la lumière) et à la structure du couvert (traduisant une capacité d'interception du rayonnement) (Bégué et al., 2010) est généralement utilisé pour estimer la biomasse des plantes ainsi que leur taux de couverture du sol (Zarco-Tejada et al., 2005). Le *NDVI* a cependant tendance à saturer pour des valeurs de *LAI* (Leaf Area index, indice foliaire) supérieures à 3 ou 4, lorsque le taux de couverture atteint 100% (Sellers, 1985 ; Carlson et Ripley, 1997). Différents indices ont été développés pour éviter le phénomène de saturation du *NDVI* pour les forts *LAI*. Ils peuvent être basés sur le *PIR* comme l'*EVI* (Enhanced Vegetation Index, Huete et al., 2002) ou le *MCARI2* (Modified Canopy Adjusted Ratio Index 2, Haboudane et al., 2004), ou encore uniquement sur les longueurs d'onde du visible comme le *VARI* (Visible Atmospheric Resistant Index, Peng et Gitelson, 2011). Les indices de végétation utilisant des bandes larges sont généralement utilisés pour accéder à l'état de vigueur des plantes, mais peuvent se révéler assez peu sensibles pour caractériser des types particuliers de stress. Par ailleurs, un indice comme le *NDVI*, bien que sensible à la teneur en pigments chlorophylliens est plutôt insensible aux variations physiologiques journalières induites par la chaleur ou le stress hydrique dont les effets ne seront visibles que sur le long terme (Dobrowski et al. 2005 ; Marino et al., 2014). A partir de bandes étroites du spectre lumineux, d'autres indices ont montré de fortes corrélations avec certaines réponses physiologiques des plantes. Par exemple, le *PRI* (Photochemical Reflectance Index) qui permet d'estimer les variations de pigments du cycle des xanthophylles, se montre très sensible aux changements rapides de photosynthèse (Gamon et al., 1997 ; Zarco-Tejada et al., 2012). D'autres indices comme le *SRPI* (Simple Ratio Pigment Index), le *NCPI* (Normalized Pigment Ratio Index) ou le *WI* (Water Index), se sont révélés respectivement corrélés à la teneur en azote, à la proportion de pigments chlorophylliens et à la teneur en eau des feuilles (Peñuelas *et al.*, 1994, 1995). L'utilisation des indices à bandes étroites présente un réel intérêt pour le phénotypage au champ, car ils permettent l'estimation de processus physiologiques fins, notamment pour étudier les effets de la contrainte hydrique. Cependant, ils nécessitent de disposer de capteurs imageurs hyperspectraux onéreux et souvent trop lourds à embarquer sur des vecteurs de type ULM ou drone.

IV.2.b. Domaine de l'infrarouge thermique

En ce qui concerne l'infrarouge thermique, le rayonnement mesuré est celui émis par la surface considérée. La loi de Stefan-Boltzman démontre que l'émission d'un corps noir est fortement dépendante de sa température élevée à la puissance 4. Il en est de même pour les surfaces naturelles, communément appelées « corps gris », pour lesquelles la loi de Stefan-Boltzman intègre la notion d'émissivité. Pour la végétation, l'émissivité varie généralement entre 0.95 et 0.99. Elle est donc très proche de 1.

La température de surface, mesurée à l'échelle de la feuille ou de la canopée par thermographie infrarouge (i.e. par radiothermomètre non imageur ou caméra) est utilisée depuis une trentaine d'années pour le suivi de l'état hydrique des cultures et la gestion d'irrigation des parcelles dans les zones arides et semi arides, et depuis peu pour évaluer divers stress biotiques (Jones, 1999 ; Chaerle et al., 2009). En effet, la température foliaire est dépendante du flux transpiratoire qui est lui-même régulé par les stomates. Une diminution de la conductance stomatique entraîne une diminution de la dissipation d'énergie et ainsi une augmentation de la température foliaire. Comme il est décrit précédemment, la transpiration est influencée par les facteurs environnementaux. En condition de plein champ, leur prise en compte est nécessaire pour l'interprétation de la température foliaire ou de la canopée comme indicateur du statut hydrique de la plante ou du couvert végétal. Penman-Monteith (1965) décrit l'évapotranspiration des couverts végétaux à partir du bilan d'énergie :

$$\lambda E = \frac{\Delta(R_n - G) + \frac{\rho C_p}{r_a} VPD}{\Delta + \gamma(1 + \frac{r_c}{r_a})}$$

Dans cette équation, E est l'évapotranspiration du couvert ; λ , la densité de flux de chaleur latente ; Δ , la pente de la relation considérée ici comme linéaire entre la pression de vapeur saturante et la température ; R_n , le rayonnement net ; G , le flux de chaleur du sol ; ρ , la densité de l'air à pression constante ; C_p , la chaleur spécifique à pression constante ; r_a , la résistance aérodynamique du couvert ; γ , la constante psychrométrique ; r_c la résistance du couvert végétal et VPD , le déficit de pression de vapeur.

Parmi les nombreux indices développés à partir de la mesure infrarouge thermique pour le suivi de l'état hydrique des cultures, le crop water stress index, *CWSI*, est de loin le plus largement utilisé. Idso et al. (1981) ont développé l'approche empirique du *CWSI* et Jackson et al. (1981) en ont posé les bases théoriques. Contrairement aux indices développés antérieurement, celui-ci est le premier à prendre en compte les facteurs environnementaux. Le *CWSI* est lié au ratio entre évapotranspiration réelle ($E_{réel}$) et maximale (E_{max}) et varie entre 0 (pleine irrigation) et 1 (couvert végétal non transpirant). Il est calculé suivant la relation :

$$CWSI = 1 - \frac{\lambda E_{réel}}{\lambda E_{max}} = \frac{\gamma \left(\frac{r_c - r_{cp}}{r_a} \right)}{\Delta + \gamma \left(1 + \frac{r_c}{r_a} \right)} = \frac{(T_{min} - T_a) - (T_c - T_a)}{(T_{min} - T_a) - (T_{max} - T_a)}$$

Equation dans laquelle r_{cp} est la résistance minimum du couvert, T_{min} , T_{max} et T_c sont les températures respectives de feuilles pleinement transpirantes (*lower baseline* ou non-water-stressed baseline), non-transpirantes (*upper baseline*), T_c la température foliaire à un instant donné, et T_a la température d'air.

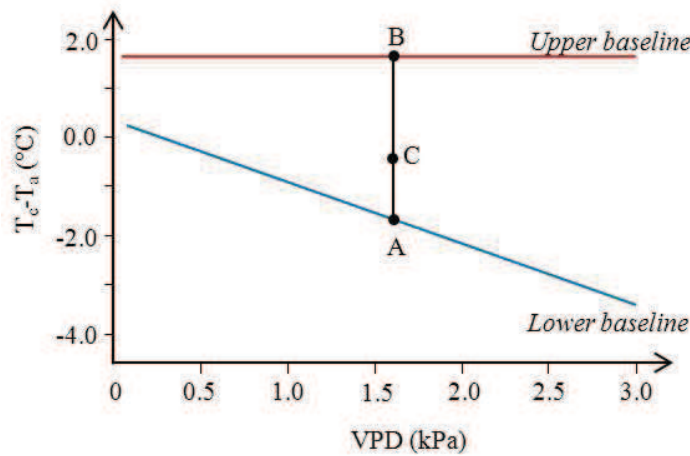


Figure 5. Exemple de relation entre VPD et $T_c - T_a$ pour le calcul du *CWSI* empirique. Pour tout point C compris entre les *lower* et *upperbaselines*, le *CWSI* correspond au ratio entre AC et AB. Il varie entre 0 (pas de stress) et 1 (plein stress).

L'approche empirique développée par Idso et al. (1981) a été très largement utilisée car elle nécessite un nombre limité de données de terrain et son calcul est simple. En effet, la limite

inférieure ($T_{min} - T_a$) correspond aux températures de surface observées sur un feuillage irrigué à E_{max} en fonction des variations du déficit de pression de vapeur de l'air (VPD). La limite supérieure ($T_{max} - T_a$) correspond à la valeur moyenne des températures maximum d'un feuillage complètement stressé (Figure 5). L'utilisation du *CWSI* nécessite certains prérequis comme des conditions atmosphériques stables (peu de vent et pas de nuages), un climat chaud et sec pour la précision, une acquisition de la mesure 1 à 2 heures après le midi solaire (Idso et al., 1981, Jackson et al., 1981 ; Gardner et al., 1992b) ainsi qu'une mesure de température de la surface foliaire ou de canopée non influencée par le sol (cet indice est donc en principe restreint aux cultures couvrantes). Cet indice est cependant moins adapté aux zones humides ou tempérées du fait de trop faibles gammes de VPD (Payero et al., 2005 ; Lebourgeois et al., 2010).

Le *CWSI* est généralement calculé grâce à des mesures de proxi-détection effectuées à l'aide de radio-thermomètres installés in situ, visant la canopée avec plus ou moins d'angle de visée (pour éviter de voir le sol). Son application concerne généralement les grandes cultures car elles possèdent un couvert relativement homogène. Des travaux sur arbres fruitiers ont montré que l'application sur pêcher était réalisable (Wang et Gartung, 2010) mais que sur pommier, du fait de la trop grande hétérogénéité de couvert, le *CWSI* ne constituait pas un bon indicateur du statut hydrique des arbres (Andrews et al., 1992).

De récents travaux ont montré que l'utilisation de l'imagerie aérienne permettait l'application du *CWSI* à l'échelle des vergers sur différentes espèces fruitières. La réussite de ces études tient au fait de la haute résolution des images thermiques (25cm à 50cm), due à la basse altitude de vol (150 à 370m) et aux caméras thermiques à haute résolution, ainsi qu'aux espèces utilisées qui présentent des canopées denses et bien développées (olivier : Berni et al., 2009a ; Calderon et al., 2013 ; amandier, abricotier et pêcher : Gonzalez-Dugo et al., 2013 ; vigne : Zarco-Tejada et al., 2013). Ces éléments ont permis de différencier des pixels purs de végétation et ainsi d'utiliser des valeurs de température de végétation non bruitées par le signal thermique du sol.

Cependant sur les couverts discontinus, la présence de sol vu au travers du feuillage peut rendre plus compliquée l'interprétation du signal thermique comme indicateur du statut hydrique des arbres. En effet, l'acquisition des images aérienne dans l'infrarouge thermique sur des couverts discontinus peut engendrer de nombreux pixels mixtes dont la température reflétera

celle d'un mélange entre sol et végétation, en proportions variables. Moran et al. (1994) ont proposé une adaptation du *CWSI* pour ces couverts végétaux en intégrant le taux de couverture du sol pour l'estimation du ratio entre évapotranspiration réelle ($E_{réel}$) et maximale (E_{max}). Ces auteurs se sont appuyés sur la forme trapézoïdale formée par le nuage de points reliant les valeurs de $T_s - T_a$ (en abscisse) et le taux de couverture (en ordonnée) qui peut être approché par un indice de végétation (*NDVI* par exemple) (Figure 6). La base évasée du trapèze représente la gamme possible des températures de sol en fonction de sa teneur en eau et sa partie haute représente les variations de températures de couverts végétaux bien développés en fonction de leur état de transpiration. Toutes les variations de températures en fonction du taux de couverture sont supposées être contenues au sein du trapèze. Les quatre angles du trapèze représentent quatre situations extrêmes en termes de couverture de sol (végétation bien développée/sol nu : angles 1 et 2 vs 3 et 4) et de statut hydrique (irrigué/non irrigué : angles 1 et 3 vs 2 et 4). La prise en compte du taux de couverture dans les bases théoriques du *CWSI* permet de définir la température des quatre angles du trapèze $(T_s - T_a)_n$.

Pour les couverts denses et bien irrigués, la relation est:

$$(T_s - T_a)_1 = \frac{r_a(R_n - G)}{C_v} * \frac{\gamma \left(1 + \frac{r_{cp}}{r_a}\right)}{\Delta + \gamma \left(1 + \frac{r_{cp}}{r_a}\right)} - \left(\frac{VPD}{\Delta + \gamma \left(1 + \frac{r_{cp}}{r_a}\right)} \right)$$

Pour les couverts denses en situation de déficit hydrique:

$$(T_s - T_a)_2 = \frac{r_a(R_n - G)}{C_v} * \frac{\gamma \left(1 + \frac{r_{cx}}{r_a}\right)}{\Delta + \gamma \left(1 + \frac{r_{cx}}{r_a}\right)} - \left(\frac{VPD}{\Delta + \gamma \left(1 + \frac{r_{cx}}{r_a}\right)} \right)$$

Pour les sols nus bien irrigués, avec une résistance de canopée, $r_c=0$:

$$(T_s - T_a)_3 = \frac{r_a(R_n - G)}{C_v} * \frac{\gamma}{\Delta + \gamma} - \left(\frac{VPD}{\Delta + \gamma} \right)$$

Pour les sols nus secs, $r_c = \infty$:

$$(T_s - T_a)_4 = \frac{r_a(R_n - G)}{C_v}$$

Les limites gauches (1-3) et droites (2 – 4) qui définissent les bornes T_{min} et T_{max} pour le calcul du WDI :

$$WDI = 1 - \frac{\lambda E_{réel}}{\lambda E_{max}} = \frac{(T_s - T_a) - (T_{min} - T_a)}{(T_{min} - T_a) - (T_{max} - T_a)}$$

Cette approche possède cependant certaines limites. En effet, Moran et al. (1994) montrent que l'hypothèse de base de linéarité de la réponse de la température par rapport aux taux de couverture de sol n'est valable que pour lorsque les couverts végétaux ont un taux de recouvrement supérieur à 30-40%. De plus, le WDI a été développé pour l'imagerie satellitaire ou aéroportée dont les angles de visée ne dépassent généralement pas 20° de part et d'autre de la verticale (Moran et al., 1997). Ceci limite son domaine directionnel d'application et sous-entend que les variations directionnelles d'ensoleillement ne sont pas considérées, ce qui impose donc d'acquérir les images thermiques à des heures où le soleil est assez haut dans le ciel. Luquet et al. (2004) ont montré que plus la végétation était éparse, plus l'effet de l'angle de visée était important sur la valeur de WDI et que l'heure d'acquisition (midi solaire ou midi solaire + 2) avait une incidence sur l'estimation du WDI .

Le WDI est assez peu utilisé dans la littérature en comparaison avec le $CWSI$. Le paramétrage assez lourd de son approche théorique peut-être un frein à son utilisation. Différents auteurs ont montré qu'il était possible de délimiter manuellement le trapèze sur la base des valeurs extrêmes de $T_s - T_a$ et de $NDVI$ (Vidal et Devaux-Ros, 1995 ; Clarke, 1997). Cependant, cette approche empirique nécessite que les images de la zone d'étude recouvrent les valeurs extrêmes de taux de couverture du sol par la végétation et une large gamme de variation de température de ces couverts végétaux.

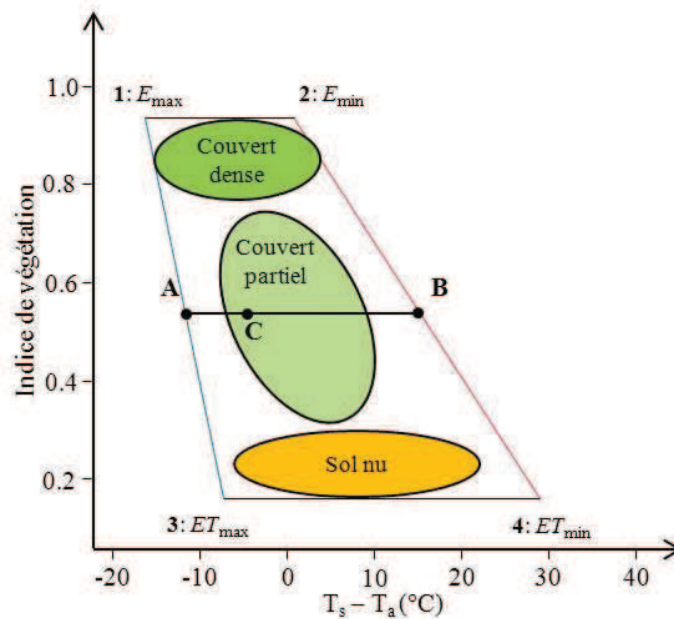


Figure 6. Illustration de la forme hypothétique du trapèze. Pour un point donné, C, situé à l'intérieur du trapèze, le *WDI* est égal au ratio AC/AB . *E*: transpiration ; *ET*: évapotranspiration (d'après Moran et al., 1994 ; Petropoulos et al., 2009).

IV.3. Variabilité génétique pour les caractères issus de la télédétection

L'application des indices de télédétection pour le phénotypage au champ a déjà fait l'objet de quelques études. Ces expérimentations concernent surtout la télédétection de proximité via l'utilisation de tracteurs ou autres véhicules motorisés permettant de se déplacer tout au long des micro-parcelles ou des rangs de culture. Les espèces ciblées sont les grandes cultures telles que le maïs, l'orge, le blé ou encore le coton. Ces travaux ont montré que des indices de végétation tels que le *NDVI*, le *MCARI2* présentaient de fortes corrélations avec la biomasse accumulée (Comar et al., 2012 ; Andrade-Sanchez et al., 2014). Par ailleurs, les travaux actuels montrent en général de fortes héritabilités pour les indices de végétation (Babar et al., 2006 ; Andrade Sanchez et al., 2014). Ces travaux ont montré que ces indices permettaient de révéler une variabilité génétique dans l'estimation de la biomasse accumulée à différents stades phénologiques.

Concernant l'utilisation de l'infrarouge thermique, la variable la plus utilisée chez les céréales semble être la variable simple $T_s - T_a$ qui peut aussi présenter une forte variabilité génétique

(Mason et al., 2013 ; Rebetzke et al., 2013). Cependant, bien que les indices tels que le *CWSI* (Grant et al., 2012) ou l'indice de conductance stomatique, *Ig* (Jones et al., 2009) aient pu montrer des différences de comportement transpiratoire entre des traitements stressés et non stressés, leur utilisation pour les analyses quantitatives n'a pas encore été rapportée.

V. Objectifs de la thèse

Dans le contexte des changements climatiques actuels, avec des épisodes de sécheresse qui vont devenir plus fréquents, la disponibilité en eau pour les usages agricoles devient une préoccupation majeure. De ce fait, il devient nécessaire d'évaluer les impacts des contraintes abiotiques en agriculture. Une des voies possibles passe par l'amélioration génétique, et plus précisément, par la sélection de nouvelles variétés capables de maintenir leurs rendements dans un contexte de restriction hydrique et/ou ayant une plus grande tolérance vis-à-vis de celle-ci. Cet objectif d'amélioration est d'autant plus justifié pour les espèces fruitières qu'elles n'ont pas été sélectionnées pour ces traits, et que l'on peut s'attendre à des pertes de production dans les contextes agronomiques non optimaux avec les variétés actuelles.

L'étude de la variabilité des réponses à la sécheresse et la connaissance de ses bases génétiques est nécessaire pour mieux comprendre le lien existant entre phénotype et génotype, ce qui intègre l'évaluation des interactions avec l'environnement. Les avancées actuelles dans le séquençage à haut débit des génomes permettent aujourd'hui un accès à des données génomiques de masse, y compris sur ces espèces. Les méthodes de phénotypage restent cependant peu efficaces en termes d'acquisition de données à haut débit ce qui constitue un goulot d'étranglement pour la recherche des déterminismes génétiques des réponses au stress.

Ce travail de thèse a donc eu pour objectif d'évaluer la contribution de l'imagerie multi-spectrale au phénotypage en verger de la réponse du pommier pour les caractères liés à la transpiration et à la vigueur. Le choix de l'imagerie aéroportée a été fait en s'inspirant des avancées de l'agriculture de précision, qui rend les technologies plus accessibles (capteurs efficaces à des prix abordables), et aussi parce qu'elle permet d'acquérir des informations

spectrales dans les domaines du visible, du proche-infrarouge et de l'infrarouge thermique de façon quasi instantanée à l'échelle de verger, avec une résolution d'images suffisante pour distinguer les individus entre eux.

Les objectifs ainsi définis nous ont permis de définir une stratégie d'étude en trois volets principaux consistant à :

- Mettre au point **une méthode d'extraction des variables phénotypiques** impliquant une **approche simplifiée pour l'interprétation du signal thermique sur couvert discontinu** et d'évaluer **la pertinence des variables construites** au regard de variables acquises in planta (Chapitre 3 - **Article 1**)
- Etudier la **contribution de l'imagerie aéroportée** pour caractériser la **variabilité génétique** de la **réponse à la contrainte hydrique** de la population d'étude STK x GS pour des variables ayant trait à la vigueur et au comportement transpiratoire des arbres, pour 2 années consécutives (Chapitre 3 - **Article 2**)
- Analyser les **déterminismes génétiques** impliqués dans **la réponse à la contrainte** hydrique à partir des **variables phénotypiques** issues des **images** et de variables **agronomiques**, variables permettant ensuite **d'amorcer une recherche de mécanismes candidats et une classification des hybrides** (Chapitre 3 - **Article 2**, Annexe 5).

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

I. Matériel végétal

La population de pommiers d'étude est une descendance F1 constituée 122 hybrides, issue du croisement des variétés « Starkrimson » et « Granny Smith » (STK x GS). Les travaux précédents réalisés au sein de l'équipe d'accueil ont permis de caractériser cette population pour sa variabilité génétique pour des traits liés à la vigueur, l'architecture (Segura et al., 2006 ; 2007), l'alternance de production (Guitton et al., 2012), la conductance hydraulique (Lauri et al., 2011) ainsi qu'à la régulation stomatique en réponse au stress atmosphérique (Regnard et al., 2009). Le parent femelle, STK, est caractérisé par un port érigé avec de nombreux rameaux courts et présentant des angles de branchements relativement fermés alors que le parent mâle, GS, est caractérisé par un port tombant avec de longs rameaux et présentant des angles de branchement ouverts. La variabilité architecturale de la descendance a été un point important à prendre en considération dans ce travail de thèse car elle a déterminé le choix de l'indice de stress dérivé de l'imagerie thermique pour étudier le comportement transpiratoire de la descendance.

II. Dispositif expérimental

Le site d'étude est localisé au sein de la station expérimentale de l'INRA de Melgueil (situé dans le sud de la France ; N43°36, E03°58). En février 2007, quatre réplicats des 122 hybrides et de leurs deux parents ont été greffés sur porte greffe M9 et distribués de façon aléatoire un rang sur deux (deux rangs contiguës possèdent les mêmes génotypes, Figure 7, Annexe 3). Les 520 arbres ont été plantés sur 10 rangs et orientés nord-ouest / sud-est avec un espacement de 5m entre les rangs et de 2m entre les arbres d'un même rang. Un couvert de fétuques élevées (*Festuca arundinacea*) est présent dans les inter-rangs sur une largeur de 2,5m. Un entretien régulier de cet inter-rang herbé a été effectué afin d'éviter un recouvrement des zones de terre situées sous les pommiers. De plus au sein des rangs de pommier, le sol a été désherbé afin de prévenir le développement des adventices. Lors des premières années de croissance tous les rameaux longs situés sous une hauteur de 1m ont été supprimés pour prioriser

le développement de l'axe principal. Chaque année, un éclaircissage chimique et manuel a été réalisé afin de limiter la production de fruits et éviter la casse des branches. Le contrôle des maladies et des ravageurs a été réalisé avec des méthodes classiques conformes aux pratiques professionnelles.

L'irrigation a été assurée par un système de micro-asperseurs installés dans les rangs de pommiers (1 distributeur / arbre). En début de saison végétative, l'irrigation a été appliquée sur l'ensemble des rangs pour assurer une pluviométrie de 3mm/jour et a ensuite été ajustée en fonction de la demande évaporative. Le suivi de l'irrigation a été réalisé avec des sondes tensiométriques situées au centre de la parcelle ainsi qu'au pied de certains arbres. Chaque année, à partir de la deuxième semaine de juillet (8 juillet), l'irrigation a été maintenue sur la moitié des arbres (2 réplicats/génotype), alors que l'irrigation a été stoppée sur l'autre moitié, permettant l'apparition d'une contrainte hydrique progressive. Les arbres ont été soumis à cette contrainte durant une période de 7 à 8 semaines.

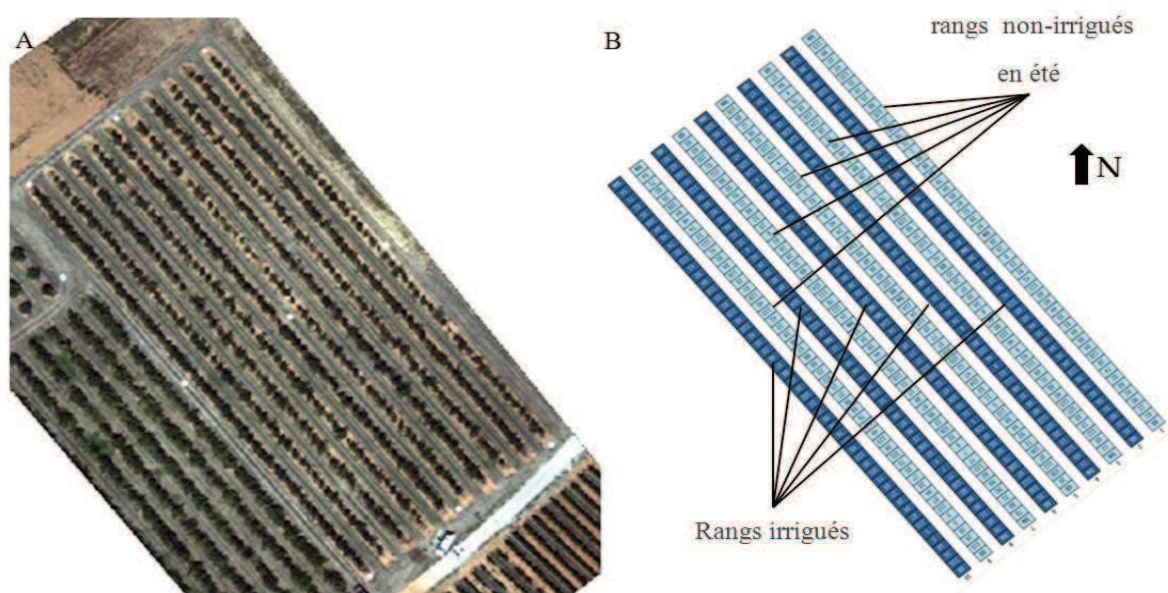


Figure 7. Photographie du verger expérimental (A, photos à 300m d'altitude) et plan de la parcelle (B, présentant la disposition des hybrides).

Une centrale micro-météorologique, située au centre de la parcelle, a permis la mesure du rayonnement global (R_g), du rayonnement photosynthétiquement actif (PAR), de la température

(T_a) et de l'humidité de l'air (HR), de la vitesse de vent (u) et des précipitations. Les capteurs sont situés à 3,20m au-dessus du sol au niveau de la frondaison des arbres. Les données sont scannées toutes les 30 secondes, moyennées sur un intervalle de temps de 10 minutes et stockées par une centrale d'acquisition Campbell Scientific CR10X. Une cartographie de résistivité du sol a été réalisée en mars 2009 montrant que le sol de la parcelle (aux profondeurs de 0 à 50cm et de 50 à 100cm) pouvait être considéré comme spatialement homogène pour sa capacité de rétention en eau (Annexe 1). Par ailleurs les analyses pédologiques ont révélé un sol ne présentant pas de discontinuité majeure (Annexe 2). Les horizons L1 (0 à 30cm) et L5 (30 à 65 cm) présentent une texture équilibrée, enrichie en argile, peu caillouteuse et légèrement calcaire (Annexe 2).

III. Descripteurs utilisés pour les plantes

Des mesures de routine ont été effectuées chaque année sur les arbres de la parcelle par l'équipe d'accueil. Tous les mois de février, le diamètre du tronc de chacun des arbres a ainsi été mesuré 15cm au-dessus du point de greffe. D'autre part, les fruits ont été récoltés pendant la dernière quinzaine du mois d'Août avant la reprise d'irrigation, indépendamment de la date réelle de maturité (à partir de mi-septembre). Pour chaque arbre, le nombre de fruits ainsi que leur poids frais (kg/arbre) ont pu être déterminés.

En 2011, des mesures de potentiels hydriques de tige ont été réalisées à l'aide d'une chambre à pression sur 12 à 20 arbres juste après le survol de la parcelle (une à deux heures avant le midi solaire). Pour ce faire, deux heures avant le vol, des feuilles à l'ombre situées près du tronc ont été sélectionnées sur un échantillon d'arbres irrigués et non irrigués puis confinées dans des sacs en plastique recouverts par des feuilles d'aluminium dans le but de stopper la transpiration et d'éliminer le gradient de potentiel hydrique entre la feuille et la branche. Les mesures de potentiel hydrique de tige ont été effectuées dès le passage de l'avion et elles ont été réalisées pendant un intervalle de temps variant d'une heure à une heure et demie.

IV. Campagnes d'acquisition d'images 2010 et 2011

Ce travail de thèse a porté sur les campagnes d'acquisition réalisées en 2010 et 2011. Trois vols ont été réalisés chaque année durant la période estivale. En 2010, le premier vol a eu lieu le 16 juillet, 8 jours après l'arrêt de l'irrigation et les deuxième et troisième vols ont eu lieu le 3 et 17 août, respectivement 26 jours et 40 jours après l'arrêt de l'irrigation. En 2011, les vols se sont déroulés le 21 juin (17 jours avant arrêt de l'irrigation) le 22 juillet et le 11 août (respectivement 14 et 34 jours après l'arrêt de l'irrigation). Le tableau 1 présente les détails des conditions environnementales au moment des vols pour les deux années. Ces vols ont permis d'acquérir des images dans les domaines du visible (Rouge, Vert et Bleu - RVB), du proche infrarouge (PIR) et de l'infrarouge thermique (IRT). Les images RVB et PIR ont été acquises à une résolution de 3cm et celles dans l'IRT à une résolution de 30cm pour une altitude de vol de 300m.

Les vols ont été effectués par la société l'Avion Jaune®. Le système d'acquisition des images RVB et PIR a consisté en deux appareils photographiques numériques Canon® (Eos 400D ou 500D, Tokyo, Japan) dont l'un a été modifié pour la prise de vue dans le proche infrarouge (Lebourgeois et al., 2008). Les images thermiques ont été acquises à l'aide d'une caméra thermique FLIR B20HSV (FLIR Systems Inc., Wilsonville, USA). Les détails des réglages des différents capteurs, des conditions de vol ainsi que les résolutions initiales des images sont présentées dans le tableau 2. Les capteurs visibles, PIR et IRT étaient disposés dans l'ULM ou l'hélicoptère de façon à effectuer des acquisitions au-dessus de l'essai avec une visée verticale. Des exemples d'acquisition d'images dans le PIR et IRT sont visibles à la fin de cette section (Figure 11).

Au moment des vols, le dispositif au sol était composé de :

- 9 mires (cibles) recouvertes d'aluminium géo-référencées à l'aide d'un DGPS (GPS différentiel). Ces cibles mises en place sur des points fixes comparables d'une date à l'autre. La géolocalisation des images acquises sur la base de ces mires a permis d'assembler et/ou superposer les images acquises dans les différentes longueurs d'ondes ;

- une cible « chaude » (bâche bleu foncé, 4x3m) et une cible « froide » (polystyrène, 2x2.4m) dont les températures ont été mesurées au sol par un radio-thermomètre portable (Fluke 574) au moment du vol afin de les comparer avec les données de températures issues des images thermiques, pour la campagne de 2011.

Tableau 1. Conditions environnementales des six vols réalisés en 2010 et 2011. Les valeurs Ψ_s sont les potentiels hydriques de sol de 6 arbres représentatifs, moyennés pour les profondeurs de 30 et 60cm, pour les traitements WW et WS.

Variables	Units	16/07/2010	03/08/2010	17/08/2010	21/06/2011	22/07/2011	11/08/2011
Solar time	hh:mm	11:40	10:40	09:50	10:00	10:00	09:20
R_g	W.m ⁻²	- -	782.20 (114.23)	472.83 (33.89)	770.67 (3.27)	599.27 (102.85)	705.00 (0.00)
T°_{air}	°C	29.72 (0.12)	28.08 (0.42)	23.78 (0.30)	26.91 (0.19)	26.58 (0.33)	26.85 (0.49)
HR	%	44.06 (1.44)	32.97 (1.03)	37.88 (2.57)	58.72 (0.75)	27.96 (0.33)	31.80 (-1.86)
VPD	kPa	2.34 (0.04)	2.55 (0.10)	1.83 (0.11)	1.47 (0.04)	2.51 (0.06)	2.41 (0.14)
u	m.s ⁻¹	2.01 (0.07)	2.72 (0.26)	1.86 (0.10)	1.99 (0.36)	1.73 (0.28)	0.78 (0.32)
Ψ_s WW	MPa	-0.065 (0.054)	-0.053 (0.028)	-0.066 (0.036)	-0.022 (0.012)	-0.046 (0.039)	-0.024 (0.036)
Ψ_s WS	MPa	-0.099 (0.035)	-0.133 (0.017)	-0.172 (0.022)	-0.031 (0.021)	-0.078 (0.037)	-0.130 (0.048)

Tableau 2. Systèmes d'acquisition des images en 2010 et 2011. Réglages des capteurs et altitudes de vol pour chacune des acquisitions aériennes ; résolution des images dans le visible (RGB), le proche infrarouge (NIR) et l'infrarouge thermique (TIR).

	16/07/2010	03/08/2010	17/08/2010	21/06/2011	22/07/2011	11/08/2011
Flight altitude	350m	330m	480m	300m	300m	300m
Sensors						
RGB	Canon 400D Canon 400D	Canon 500D Canon 500D	Canon 500D Canon 500D	Canon 500D Canon 500D	Canon 500D Canon 500D	Canon 500D Canon 500D
NIR	modified (745nm filter) Imageur	modified (745nm filter) Imageur	modified (745nm filter) Imageur	Modified (745nm filter) Imageur	modified (745nm filter) Imageur	modified (745nm filter) Imageur
TIR	FLIR B20HSV	FLIR B20HSV	FLIR B20HSV	FLIR B20HSV	FLIR B20HSV	FLIR B20HSV
Setting						
RGB Sensibility	ISO 100	ISO 100	ISO 100	ISO 100	ISO 100	ISO 100
Shutter speed	1/1250	1/2000	1/2000	1/2000	1/2000	1/2000
Aperture	F5	F2.8	F2.8	F3.5	F3.5	F3.5
NIR Sensibility	ISO 100	ISO 100	ISO 100	ISO 100	ISO 100	ISO 100
Shutter speed	1/1250	1/2000	1/2000	1/2500	1/2000	1/2000
Aperture	F5	F2.8	F2.8	F3.5	F3.5	F3.5
Initial pixel size (cm)						
RGB	5*5	3*3	5*5	3*3	3*3	3*3
NIR	5*5	3*3	5*5	3*3	3*3	3*3
TIR	30*30	35*35	53*53	30*30	30*30	30*30
Atmospherical correction for TIR image	no	no	no	Yes	Yes	Yes

V. Traitement des images

Cette partie présente les différentes étapes du prétraitement des images acquises permettant d'en extraire une information spectrale caractérisant chacun des arbres de la parcelle (Figure 8). La mise au point méthodologique a représenté une part importante de la thèse et elle a conditionné les résultats obtenus. Deux logiciels principaux ont été utilisés pour travailler sur les images : ArcGIS Desktop 10.0 (Esri) et Erdas Imagine 9.3 software (Intergraph Corporation, Huntsville, USA).

Entre l'acquisition des images et l'extraction de l'information spectrale utile pour le phénotypage, un certain nombre d'étapes ont été nécessaires afin de pouvoir analyser les données. Les premières étapes concernent l'extraction des données des capteurs, l'orthorectification (avec pour références les mires aluminisées) pour l'ensemble des images acquises dans les différents domaines du spectre (visible, proche infrarouge ou infrarouge thermique). Ces étapes ont été réalisées par l'Avion Jaune®. Les étapes de normalisation radiométriques (RVB et PIR), de corrections atmosphériques (IRT) présentées dans la suite de cette partie concernent les trois dates de l'année 2011, qui ont servi à la réalisation du premier article (Chapitre 3 - Article 1). Les résultats de ces normalisations sont présentés à titre d'exemple. Les étapes de création d'images multicouche ainsi que de définition des zones d'intérêt qui ont été choisies pour extraire les valeurs phénotypiques pour chacun des arbres de la parcelle sont présentées à la suite de cette partie.

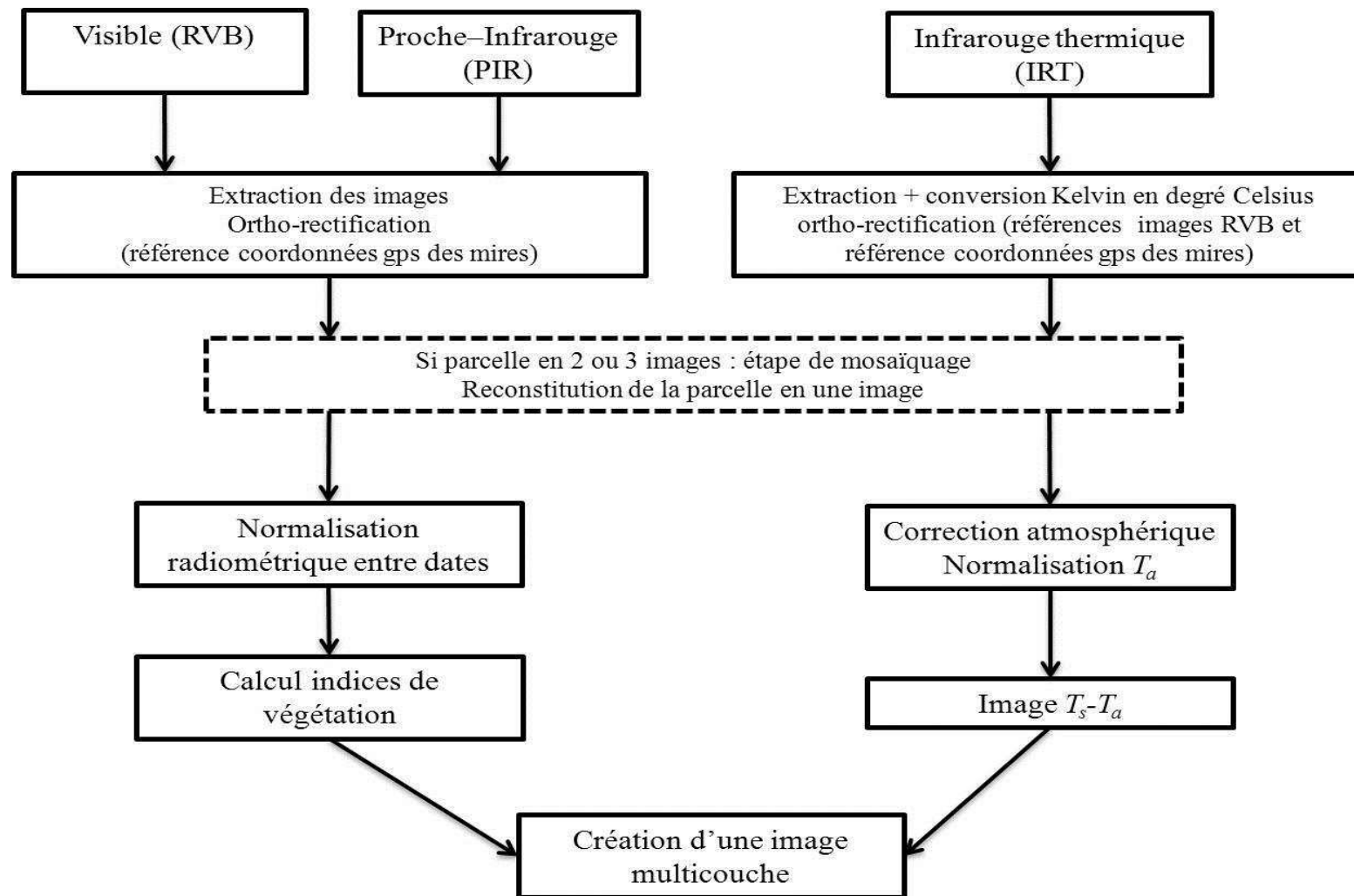


Figure 8. Flowchart retraçant les étapes de ce traitement depuis leur extraction jusqu'à la création d'une image multicouches à partir d'images prise par avion.

V.1. Normalisation radiométrique relative aux images visible et proche infra-rouge

La normalisation radiométrique consiste à égaliser les images acquises dans une longueur d'onde donnée sous différentes conditions d'éclairement et/ou à partir de capteurs ayant une sensibilité différente (dans notre cas les capteurs CANON 400D et 500D), de façon à les rendre comparables d'une date d'acquisition à une autre. Cette étape est nécessaire lorsque ni le coefficient de calibration absolu, ni la mesure de la radiation incidente n'est disponible. Une méthode empirique basée sur l'utilisation de cibles invariantes sombres et claires dans l'image a été utilisée (Schott et al., 1988 ; Lebourgeois et al., 2008). Les cibles choisies dans la scène d'étude peuvent être des routes, des aires de stationnement ou des bâtiments.

Dans notre cas il a été assez difficile de définir des cibles invariantes sur les images acquises. En effet, le verger d'étude est situé au milieu d'autres cultures sans présence d'infrastructures permettant d'être utilisées comme cibles potentielles. Les cibles qui ont été considérées sont donc :

- Les cibles initialement prévues pour les corrections atmosphériques (polystyrène blanc et bâche bleue sombre),
- Quatre zones de sol nu de teintes différentes,
- Une borne en béton,
- Une voiture de couleur sombre et mate présente lors des trois dates.

Pour chacune des classes de cibles, les valeurs des pixels de ces cibles ont été extraites après avoir vérifié que leur réponse spectrale était bien homogène pour obtenir les valeurs de pixel en compte numérique (CN) pour chaque bande spectrale (rouge, vert, bleu et proche infrarouge : R, G, B et PIR). La deuxième date d'acquisition de 2011 (22/07/2011) a été définie comme référence. Pour chaque longueur d'onde une régression a été effectuée entre les valeurs de CN des cibles de la date de référence et les valeurs de ces mêmes cibles aux dates 1 et 3 (Figure 9). Les droites de régressions obtenues ont ensuite été utilisées comme fonction de correction entre les dates à corriger et la date de référence.

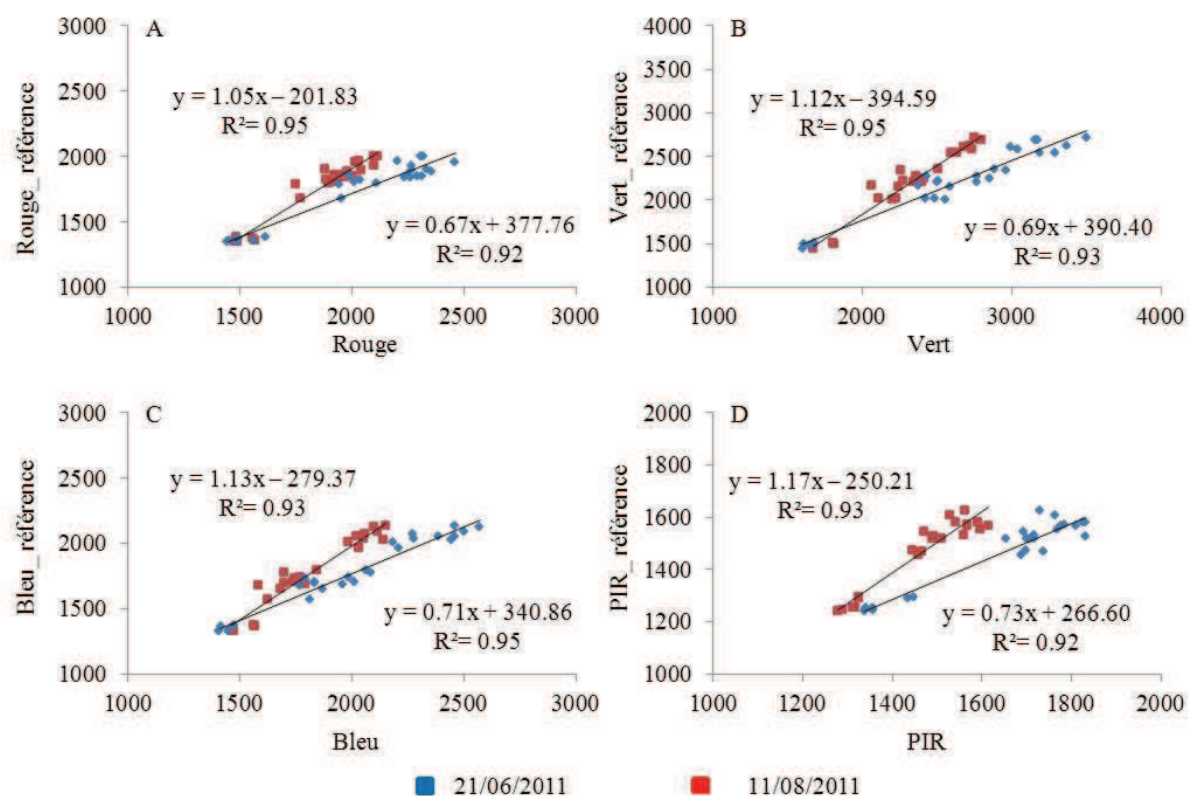


Figure 9 : Droites de régressions pour les corrections radiométriques entre dates. Les graphes présentent les valeurs de compte numérique (CN) des cibles invariantes à la date de référence (22/07/2011) et les CN de ces mêmes cibles aux deux autres dates d'acquisition pour chaque bande spectrale :rouge, vert, bleu et proche infrarouge (A, B, C, D).

Afin d'appréhender l'ampleur de la correction appliquée pour la normalisation radiométrique, un coefficient de variation moyen a été calculé avant et après la correction, pour chaque type de cible, et pour chaque bande spectrale en prenant en compte les trois dates (Tableau3). Dans la majorité des cas, la normalisation radiométrique a permis de réduire le coefficient de variation et donc la variabilité inter-dates des cibles invariantes. Les droites de corrections ont alors pu être appliquées aux bandes RVB et PIR à la date 1 et à la date 3 afin de créer de nouvelles images normalisées et comparables entre elles.

Tableau 3. Coefficients de variation (%) moyens entre les trois dates. Valeurs avant et après corrections radiométriques pour chacune des cibles invariantes et dans chacune des bandes spectrales.

		Rouge	Vert	Bleu	PIR
Corrections					
voiture	avant	5.4	7.5	5.6	3.4
	après	2.5	3.8	3.8	1.3
polystyrène	avant	15.1	15.2	14.0	10.5
	après	14.1	17.1	15.8	9.6
bache	avant	6.6	10.0	8.7	4.8
	après	2.8	3.8	4.7	1.1
sol nu	avant	8.2	10.0	7.6	6.1
	après	4.8	5.2	3.9	3.5
chemin 1	avant	5.1	5.9	4.2	6.1
	après	3.9	4.9	3.5	2.8
chemin 2	avant	10.7	12.5	9.3	8.8
	après	3.3	3.3	2.3	3.0
chemin 3	avant	9.2	10.5	7.5	6.8
	après	2.4	3.4	3.0	1.5
béton	avant	6.5	7.4	5.4	6.1
	après	2.7	3.5	2.6	0.4

V.2. Corrections atmosphériques des images infra-rouge thermique

L'atmosphère joue un rôle important sur l'interprétation du signal thermique. En effet, les images aériennes acquises dans l'infrarouge thermique présentent des températures de surface différentes de celles observées simultanément au sol. Ceci est lié à la présence de l'atmosphère entre la cible et le capteur qui reçoit : (i) le signal émis par la surface, qui est atténué par l'atmosphère, (ii) une part d'émission atmosphérique incidente réfléchi par la surface observée et atténuée par l'atmosphère et (iii) une part d'émission propre à l'atmosphère. La différence de température captée et observée est aussi influencée par la distance du capteur à la surface observée (Suguira et al., 2007). La méthode de correction atmosphérique utilisée dans ce travail de thèse s'appuie sur celle proposée par Lebourgeois et al. (2008b).

A chaque date de vol les températures acquises au sol sur les cibles « froide » (polystyrène), « chaude » (bâche) et sur du sol nu ont été comparées à celles obtenues à partir des images thermiques. A partir de ces données une régression linéaire a été calculée entre la

température acquise au sol et la température de surface issue de l'image. L'équation de la droite de régression a été ensuite appliquée aux images thermiques afin de les corriger des effets de l'atmosphère. La température de l'air mesurée sur la parcelle au moment du vol est enfin soustraite à chaque pixel de l'image IRT corrigée des effets de l'atmosphère pour créer une image représentant la variable $T_s - T_a$.

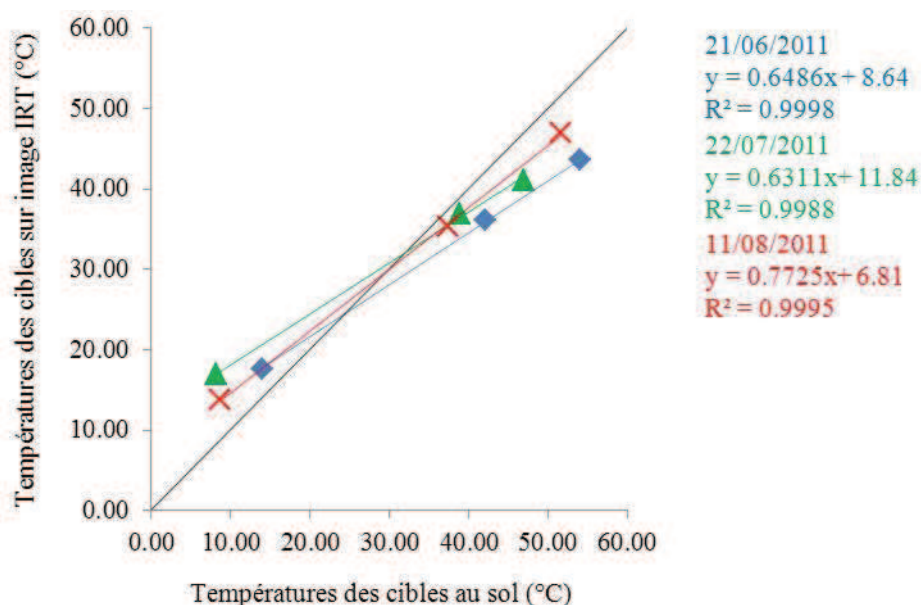


Figure 10. Relation entre les températures de surface acquises au sol sur des cibles (polystyrène, bâche, sol nu) et celles issues des images thermiques.

V.3. Calcul des indices spectraux

Au cours de cette thèse plusieurs indices spectraux ont été calculés pour caractériser le couvert des pommiers de l'essai en termes de vigueur et de comportement transpiratoire ainsi que leur réponse à la contrainte hydrique. Chacune des bandes des images RVB et PIR acquise par les capteurs numériques constitue une bande large du spectre lumineux et a restreint le choix des indices de végétation à ceux qui ont déjà été calculés à partir de larges bandes dans la littérature. Trois indices de végétation ont donc été calculés.

- Normalized Difference Vegetation Index (*NDVI*, Rouse et al., 1973). Cet indice a été calculé à partir des bandes rouge et proche-infrarouge :

$$NDVI = (PIR - R) / (PIR + R)$$

- Vegetation Atmospherically Resistance Index (*VARI*, Peng et Gitelson, 2011). Cet indice a été calculé à partir des bandes vertes et rouges :

$$VARI = (G - V) / (G + V)$$

- Simple Ratio Pigment Index (*SRPI*, Lebourgeois et al., 2012). Cet indice a été calculé à partir des bandes bleues et rouges :

$$SRPI = B / R$$

A partir des images thermiques, un premier indice, $T_s - T_a$, décrit précédemment a été utilisé et a permis avec le *NDVI* de construire le trapèze VIT (Vegetation Index – Temperature) pour le calcul du *WDI*. Les détails de cette construction sont abordés dans le premier chapitre de résultats (Chapitre 3 - Article 1).

V.4. Création d'une image multicouche

Chacune des images étant géo-référencée, il est possible d'empiler les clichés des différentes bandes spectrales pour créer une image à n couches (RVB, PIR, $T_s - T_a$ et indices spectraux) à chacune des dates. Avant cette opération, la résolution initiale des images RVB, PIR et de l'image des indices de végétation (3 à 5 cm) a été dégradée pour rejoindre celle des images thermiques (30 ou 40 cm selon les dates) afin d'obtenir pour chaque pixel de l'image multicouches une matrice de n valeurs.

V.5. Création d'une zone d'intérêt dans chaque arbre pour l'extraction des valeurs spectrales

Une fois les corrections et les normalisations effectuées sur les images RVB, PIR et IRT, et celle des indices spectraux calculés, il reste à extraire les valeurs des pixels pour les différentes couches des images pour chacun des 520 arbres de la parcelle. Pour cela, une zone d'intérêt de 60cm de rayon a été tracée à partir du centre de la couronne des arbres (dénommée zone tampon 60) (Figure 11 A). La taille de la zone tampon a été choisie car elle représentait un compromis entre les arbres les plus volumineux et les plus faibles en dimension de couronne. Chaque zone tampon a été identifiée avec (i) la position de l'arbre sur la parcelle, (ii) son numéro de rang et (iii) son numéro de génotype. A partir de la zone tampon 60, les valeurs maximum, minimum, moyenne et l'écart-type des valeurs de pixels de chaque arbre ont été extraites pour chaque couche de l'image.

Au cours de ce travail de thèse, une autre zone tampon, dénommée « zone tampon large » a été créée manuellement, entourant la zone tampon 60 de chaque arbre (Figure 11 B). La zone tampon large possède les mêmes caractéristiques en termes d'identifiants que la zone précédente. Elle diffère de celle-ci par le fait qu'elle englobe la totalité de l'arbre ainsi qu'une partie du sol nu des rangs et inter-rangs. La réunion des 520 zones « larges » a permis de constituer une zone tampon large pour l'ensemble de la parcelle, dont la géométrie est commune à toutes les images. Elle a permis de réduire le nombre de pixels de sol nu de l'image pour la construction des trapèzes vegetation index / temperature (VIT) et de permettre le calcul du *WDI*. Les résultats obtenus sont présentés dans le premier chapitre de résultats (Chapitre 3, Article 1). Par ailleurs, les valeurs de différents indices spectraux (moyennes de *NDVI*, $T_s - T_a$ et *WDI* et l'écart type de $T_s T_a$) des zones tampon 60 et large ont été extraites pour évaluer l'impact de ces 2 zones sur les valeurs des indices spectraux. Ces résultats ont fait l'objet d'une affiche scientifique au congrès EPSO de Fribourg en 2012 (Annexe 5).

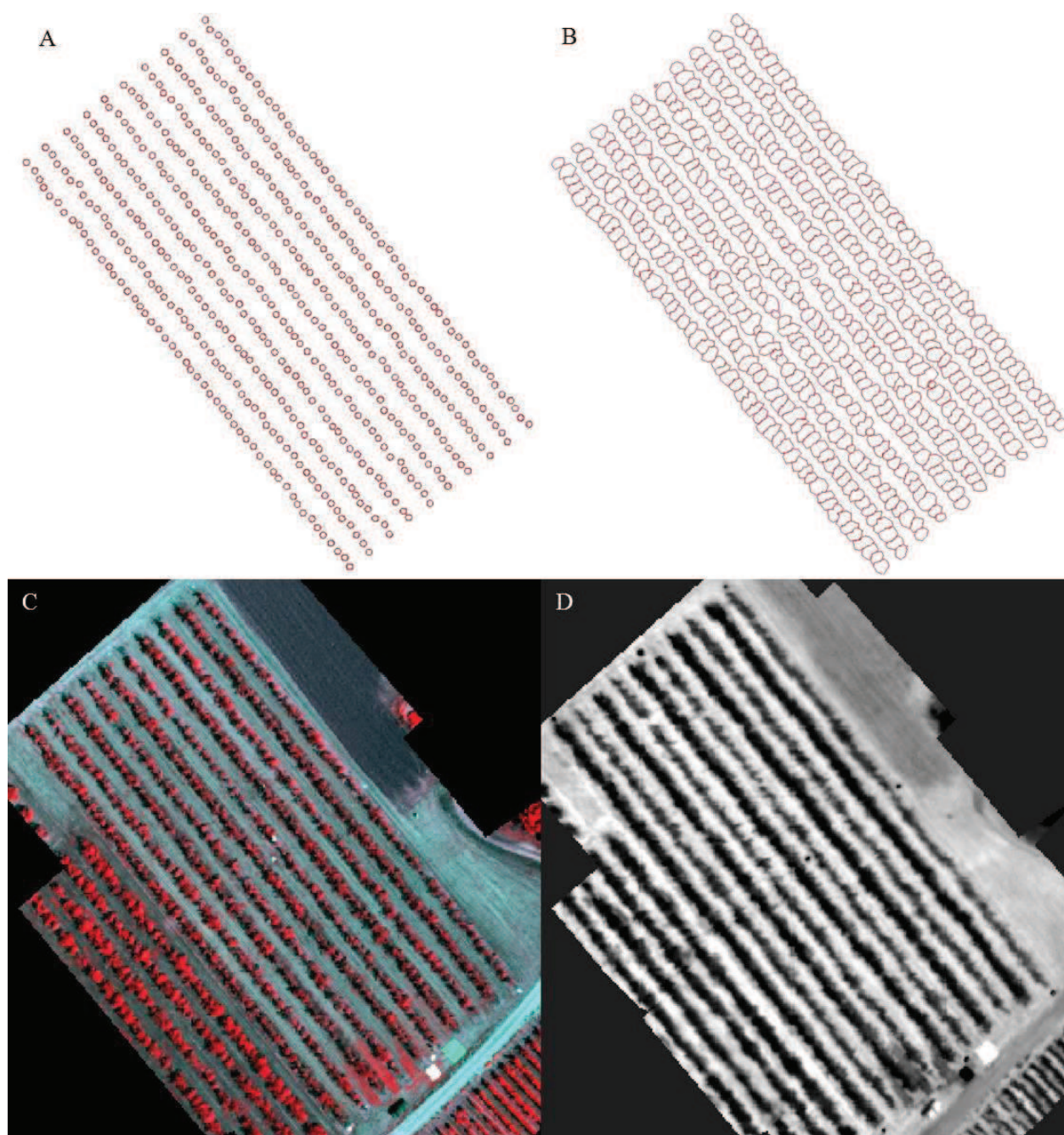


Figure 11. Zone tampon permettant d'extraire les variables phénotypiques. Les zones 60 (A) et large (B) permettant d'extraire les variables phénotypiques (indices spectraux) pour chacun des arbres de la parcelle. (C), composition colorée en fausses couleurs (PIR, R, V) de la parcelle et (D), image de T_s-T_a au 11/08/2011, date pour laquelle les pommiers des rangs non stressés (froids, en gris très sombre) et stressés (chauds, gris plus clair) sont particulièrement différenciés.

VI. Analyse génétique

Sur la base de six dates de collecte d'images et d'indicateurs plantes, réparties sur deux années d'observation, un grand nombre de variables ont pu être analysées. Ces variables se répartissent en trois catégories : indices de végétation (*NDVI*, *SRPI*, *VARI*), indice de stress (*WDI* et $T_s - T_a$), et variables acquises in planta (diamètre à la base des troncs, fructifications annuelles et potentiel hydrique de tige à la mi-journée). Pour chaque variable, des différentiels entre arbres de contrôles et arbres stressés ont aussi été calculés. Au final, trente-six variables ont été définies.

La stratégie d'étude a consisté (i) à analyser les corrélations entre variables, (ii) à construire des modèles linéaires mixtes pour chacun d'entre elles (iii) à extraire les Best Linear Unbiased Predictors (BLUPs) de ces modèles et (iv) à procéder à une détection de QTL sur la base d'une carte génétique préalablement réalisée dans l'équipe.

L'analyse des corrélations a porté sur le jeu de donnée complet des deux années. Cette analyse a pris en compte la valeur génétique moyenne de chacune des variables pour les arbres stressés et irrigués confondus, pour les arbres irrigués et stressés pris séparément ainsi que pour le différentiel entre les deux conditions. Le coefficient de corrélation de Pearson a été utilisé pour cette analyse.

La phase de modélisation avait pour objectif de prendre en compte les effets de dates et d'années en facteurs fixes sur les variables phénotypiques, les effets génotypiques étant quant à eux considérés comme aléatoires. Les interactions entre facteurs ont également été considérées et une phase de sélection du « meilleur » modèle pour chaque variable a été réalisée sur la base des critères bayésiens AIC et BIC. Les analyses de génétique quantitative ont permis de tester la significativité d'un effet du génotype et d'extraire le « Best Linear Unbiased Predictor » (BLUP) correspondant, pour chaque variable analysée. De plus, l'héritabilité au sens large, correspondant au rapport de variance génétique sur la variance phénotypique totale, a été calculée pour chaque variable, sur la base des estimations des effets génétiques, d'interactions et résiduels de ces modèles.

La dernière étape de cette démarche a consisté à détecter des Quantitative Trait Loci (QTL), en mettant en correspondance les variations phénotypiques et génotypiques à celles des marqueurs moléculaires dont l'hétérozygotie et la ségrégation avait permis le

positionnement sur une carte génétique consensus de la population d'étude. La détection de QTL a été réalisée de façon classique en recherchant des effets significatifs entre classes alléliques aux marqueurs, puis le long des groupes de liaison, par interval mapping (IM). Lorsque plusieurs QTL étaient révélés pour une variable, un modèle linéaire a été construit pour tester l'existence d'interaction entre les marqueurs les plus proches de chacun des QTLs (ou effet d'épistasie). Les effets des classes alléliques ont été examinés de façon à dégager les effets parentaux majeurs, de même que les pourcentages de la variance phénotypique ou génotypique expliquée par chaque QTL, ou par leur ensemble, pour un trait donné. Cette étape s'est achevée par l'exploration de quatre zones QTLs qui ont été détectées pour les réponses à la restriction hydrique (différence S / NS) et dont les intervalles de confiance étaient suffisamment étroits pour screener la séquence correspondante du génome de référence de Golden Delicious. Cette exploration a été focalisée sur la recherche des gènes impliqués dans la régulation de la fermeture des stomates, notamment ceux relatifs à la voie de l'acide abscissique. Elle s'est révélée fructueuse et a permis de mettre en évidence une première liste de gènes candidats pour ces mécanismes. L'ensemble de ces analyses est détaillée dans le 2^{ème} article de la partie résultats (Chapitre 3).

Chapitre 3 : Résultats

I. Indicateurs de stress issus de l'imagerie thermique aéroportée pour le phénotypage au champ d'une population d'arbres hétérogènes pour sa réponse à la contrainte hydrique

Résumé : Le phénotypage au champ de la réponse des plantes à la contrainte hydrique constitue un goulot d'étranglement pour les programmes d'amélioration génétique. L'imagerie thermique aéroportée peut contribuer à dépasser cette limite dans la mesure où elle permet d'évaluer le statut hydrique d'un grand nombre d'individus simultanément. Cependant, la présence de pixels mixtes sol-plante dans les images acquises sur les couverts hétérogènes complique l'interprétation de la température de végétation. L'indice de stress hydrique WDI (Water Deficit Index = $1 - ET_{réelle}/ET_{max}$) proposé par Moran et al. (1994) pour lever cette difficulté a été comparé dans ce travail à l'indice ($T_s - T_a$) calculé comme la différence entre la température de surface du couvert (T_s) et celle de l'air (T_a). Comme la paramétrisation des équations théoriques permettant de calculer le WDI est délicate, surtout quand cet indice concerne des génotypes présentant une forte hétérogénéité architecturale, une procédure statistique simplifiée, basée sur la régression quantile, a été proposée pour délimiter les bornes d'un trapézoïde dans un graphique représentant les valeurs d'un indice de végétation en fonction de $T_s - T_a$. La sensibilité de l'indice WDI aux variations des valeurs de référence humide et sèche (bornes latérales du trapèze) a été évaluée en fonction du caractère plus ou moins resserré de l'intervalle de confiance. Les différents indicateurs de stress étudiés, établis à partir d'une série d'images multispectrales aéroportées acquises dans les domaines VIS, PIR et IRT (Visible, proche infrarouge et infrarouge thermique) sur une population de 122 pommiers hybrides sous deux régimes d'irrigation a permis de discriminer significativement les deux statuts hydriques induits. A chacune des dates d'acquisition, la méthode de calcul du WDI par régression quantile a permis une délimitation plus aisée du trapèze, tandis que le calcul théorique de ses bornes latérales a donné des résultats peu probants, avec superposition de l'une ou l'autre des bornes au nuage de points, aboutissant à des valeurs non fiables de l'indice. Au champ, une fois la contrainte hydrique établie, les différents indicateurs de stress ($WDI_{quantile}$, $WDI_{théorique}$ et $T_s - T_a$) acquis lors des journées de vol ont pu être corrélés linéairement avec les potentiels hydriques minimaux de tige mesurés *in planta* sur des feuilles non transpirantes, pour un sous-ensemble de génotypes de la population. L'indice $T_s - T_a$ s'est montré très sensible à la demande évaporative de l'atmosphère, ce qui limite sa pertinence pour les comparaisons temporelles. En conclusion, le WDI calculé par régression quantile s'avère le plus approprié pour une utilisation dans le cadre du phénotypage.

RESEARCH PAPER

Stress indicators based on airborne thermal imagery for field phenotyping a heterogeneous tree population for response to water constraints

Nicolas Virlet¹, Valentine Lebourgeois², Sébastien Martinez³, Evelyne Costes³, Sylvain Labbé⁴ and Jean-Luc Regnard^{1,*}

¹ Montpellier SupAgro, UMR 1334 Amélioration Génétique et Adaptation des Plantes méditerranéennes et tropicales, TA-A-108/03, Avenue Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5, France

² CIRAD, UMR Territoires, Environnement, Télédétection et Information Spatiale, Station Ligne-Paradis, 7 Chemin de l'IRAT, 97410 Saint-Pierre, France

³ INRA, UMR 1334 AGAP, TA-A-108/03, Avenue Agropolis, Avenue Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5, France

⁴ IRSTEA, UMR TETIS, Remote Sensing Centre, 500 rue J. F. Breton, 34093 Montpellier Cedex 5, France

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: regnard@supagro.inra.fr

Received 5 February 2014; Revised 5 February 2014; Accepted 15 June 2014

Abstract

As field phenotyping of plant response to water constraints constitutes a bottleneck for breeding programmes, airborne thermal imagery can contribute to assessing the water status of a wide range of individuals simultaneously. However, the presence of mixed soil–plant pixels in heterogeneous plant cover complicates the interpretation of canopy temperature. Moran's Water Deficit Index ($WDI = 1 - ET_{act}/ET_{max}$), which was designed to overcome this difficulty, was compared with surface minus air temperature ($T_s - T_a$) as a water stress indicator. As parameterization of the theoretical equations for WDI computation is difficult, particularly when applied to genotypes with large architectural variability, a simplified procedure based on quantile regression was proposed to delineate the Vegetation Index–Temperature (VIT) scatterplot. The sensitivity of WDI to variations in wet and dry references was assessed by applying more or less stringent quantile levels. The different stress indicators tested on a series of airborne multispectral images (RGB, near-infrared, and thermal infrared) of a population of 122 apple hybrids, under two irrigation regimes, significantly discriminated the tree water statuses. For each acquisition date, the statistical method efficiently delineated the VIT scatterplot, while the limits obtained using the theoretical approach overlapped it, leading to inconsistent WDI values. Once water constraint was established, the different stress indicators were linearly correlated to the stem water potential among a tree subset. $T_s - T_a$ showed a strong sensitivity to evaporative demand, which limited its relevancy for temporal comparisons. Finally, the statistical approach of WDI appeared the most suitable for high-throughput phenotyping.

Key words: Drought, evapotranspiration, *Malus × domestica* Borkh., phenomics, remote sensing, surface temperature, temperate fruit species, vegetation index, water deficit index (WDI).

Introduction

According to current climate change models for the 21st century, increases in average temperatures are expected, with longer or more frequent episodes of extreme temperatures and drought, notably in the Mediterranean basin (IPCC, 2007; Giorgi and Lionello, 2008). Climate change will lead to a reconsideration of

breeding programmes for many crops, and new traits will need to be taken into account. As water is a major factor in plant productivity, optimizing water use by improving plant water use efficiency and/or stress tolerance will become an increasingly important issue for many crops (Hamdy *et al.*, 2003;

Condon *et al.*, 2004). Breeding programmes focused on these targets are currently being developed for the cereal crops that are of major importance for food purposes, such as wheat, rice, and maize (Braun *et al.*, 2010; Fischer *et al.*, 2011; Masuka *et al.*, 2012). Such studies are rarely performed for woody perennials, although some studies on genetic determinism of traits related to water use and drought tolerance improvement have been undertaken for forest trees [e.g. in *Populus*, Dillen *et al.* (2008) and Monclus *et al.* (2009); in *Quercus*, Brendel *et al.* (2008) and Roussel *et al.* (2009)]. Water use and/or drought sensitivity in fruit trees also need to be thoroughly studied because sustainability of fruit production is highly dependent on the availability of water resources (Šircelj *et al.*, 2007). However, for these species, water resource research to date has focused on irrigation scheduling and crop management rather than on plant breeding for better use of water (Naor, 2006; Wang and Gartung, 2010).

Thermal infrared (TIR) remote sensing is increasingly being used to assess crop transpiration and water stress in annual crops and fruit crops (Berni *et al.*, 2009; Alchanatis *et al.*, 2010; González-Dugo *et al.*, 2012). As the temperature of any plant organ depends on the balance between incoming energy and energy loss, including the latent heat loss resulting from transpiration, measurement of leaf temperatures permits estimation of the flux of water loss and stomatal regulation (Jones *et al.*, 2009). Typically, an increase in the difference between the leaf surface temperature and the air temperature is interpreted as a sign of a decrease in transpiration flux, i.e. a decrease in the ratio of actual to potential transpiration. Nevertheless, as plant stomatal control can be more or less pronounced and can occur over the short term, the regulation of water loss by stomatal closure and the importance of transpiration limitation under water deficits depend on plant species. Tardieu and Simonneau (1998) classified plant behaviours into two main categories, isohydric and anisohydric, based on stomatal regulation. Facing water deficits, isohydric plants efficiently reduce stomatal conductance (g_{sw}) in the presence of decreasing soil water potential (Ψ_s) and/or drier atmospheric conditions, which contributes to saving water and maintaining a relatively constant midday leaf water potential (Ψ_l) regardless of drought conditions (McDowell *et al.*, 2008). In contrast, anisohydric plants allow the midday Ψ_l to decrease with both higher evaporative demand and lower Ψ_s , while maintaining a stomatal aperture, which favours carbon acquisition (McDowell *et al.*, 2008). As genetic variability of stomatal regulation can be expressed at the intraspecific level [e.g. in grapevine, Gaudillère *et al.* (2002); in apple, Massonnet *et al.* (2007)], TIR imagery appears to be a promising technique for phenotyping plant tolerance to water stress [in grapevine and rice, Jones *et al.* (2009); in potato, Prashar *et al.* (2013)]. More generally, phenotyping based on multi-spectral or hyper-spectral imagery shows promise as a non-invasive method of screening a wide range of individuals in a short period of time. This potentially high-throughput approach is compatible with next-generation sequencing technologies, which allow genome-wide and high-density genotyping (Berger *et al.*, 2010; Fiorani and Schurr, 2013).

Numerous indices have been developed to assess crop water stress from canopy surface temperature (T_s) data acquired

in signal or imagery mode, from aerial platforms (satellites, aircraft, and unmanned aerial vehicles) or sensors installed directly in fields to observe crop canopies (White *et al.*, 2012). T_s minus air temperature (T_a) is a raw variable that is easy to extract from images, but it is sensitive to radiative conditions, wind speed, and vapour pressure deficit (Maes and Steppe, 2012). Temporal comparisons of plant responses to drought based on this variable require that ambient conditions are controlled (Berger *et al.*, 2010) or remain mostly unchanged during experiments (Idso *et al.*, 1981). The crop water stress index (CWSI) is one of the most commonly used indices in field water stress studies and irrigation scheduling applications. It takes into account the ambient meteorological conditions, including the vapour pressure deficit, which also influences the canopy temperature. CWSI was empirically developed by Idso *et al.* (1981) and theoretically defined by Jackson *et al.* (1981). With this index, the upper and lower limits of the differences in the canopy and air temperatures can be used to estimate the minimum and maximum evaporation and represent dry and wet references, respectively. Based on the CWSI concept, Jones *et al.* (2009) developed the stomatal conductance index (I_g), which estimates stomatal conductance from the canopy temperature and some meteorological parameters, and these authors assessed the potential of TIR imaging to phenotype the response of crops to water constraints. However, the application of CWSI is limited to full-cover vegetation, and I_g requires measurements and calibrations (wet and dry references) at the leaf level, which may depend on genotype and limits their applications for high-throughput phenotyping.

The presence of mixed soil–plant pixels is a recurring problem when thermal imagery is applied to phenotyping heterogeneous covers (Möller *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2009; Hackl *et al.*, 2012). It is generally considered that using the vegetation surface temperature directly is risky, because the weight of mixed or soil pixels in porous plant cover can create a shift towards the soil surface temperature (Jackson *et al.*, 1981). Various image preprocessing methods based on filtering of RGB images can be applied to exclude mixed pixels. However, these methods are time-consuming and can also be subjective because they depend on the threshold chosen (Giuliani and Flore, 2000; Jones *et al.*, 2002; Möller *et al.*, 2007; Hackl *et al.*, 2012). An automated procedure that uses a watershed segmentation analysis to select pure vegetation pixels in TIR images of palm trees has recently been proposed by Cohen *et al.* (2012). However, as shown by Hackl *et al.* (2012), distinguishing pure pixels of vegetation from mixed soil–plant pixels does not always improve the quality of the regression between canopy temperature and plant water status indicators such as the leaf water potential in maize for cover fractions above 60%.

To overcome these limitations, Moran *et al.* (1994) developed the Vegetation Index–Temperature (VIT) concept, which facilitates the application of CWSI to partial vegetation cover. The VIT concept is based on the trapezoidal shape formed by the relationship between the difference between the surface and air temperature ($T_s - T_a$) and a vegetation index (VI) that represents the crop cover fraction. The vertices of the trapezoid correspond to (1) well-watered full-cover vegetation, (2) water-stressed full-cover vegetation, (3) saturated bare

soil, and (4) dry bare soil, as shown in Fig. 1. Theoretically, all variations of crop water stress for different vegetation cover should plot within this trapezoid, even if linearity of the lateral boundaries constitutes a simplifying assumption (notably for low vegetation cover) (Maes and Steppe, 2012). For each point inside the trapezoid, the Water Deficit Index (WDI) can be calculated on the basis of the distances to the left and right boundaries, which are considered to be wet and dry references, respectively. By using this approach, the $T_s - T_a$ of a given plant is corrected from soil effects by VI according to the cover porosity. Like CWSI, WDI is related to the ratio of actual (ET_{act}) to maximum (ET_{max}) evapotranspiration ($WDI = 1 - ET_{act} / ET_{max}$) and it takes the VPD into account. The value of WDI that is normalized between the left and right boundaries ranges from 0 for a well-watered crop transpiring at the maximum rate to 1 for a severely water-stressed, non-irrigated crop.

Theoretical calculation of the trapezoid envelope vertices requires information on numerous physical and meteorological parameters and knowledge of the vegetation type (Moran *et al.*, 1996). Consequently, this method is not easy to use operationally because of difficulties in its parameterization (Vidal and Devaux-Ros, 1995; Clarke, 1997) and because some inputs can be sensitive to local conditions or to the crop structure (Heilman *et al.*, 1996; Rana and Katerji, 1998). When using this approach for phenotyping, large variability in the plant architecture of the studied population may further complicate the parameterization of the theoretical equations. Moreover, the parameters' values are generally typical values derived from the literature and not adapted to every type of crop or variety. The trapezoidal shape of the scatterplot can also be manually delineated based on VI and $T_s - T_a$ pixel values (Vidal and Devaux-Ros, 1995; Clarke, 1997). However,

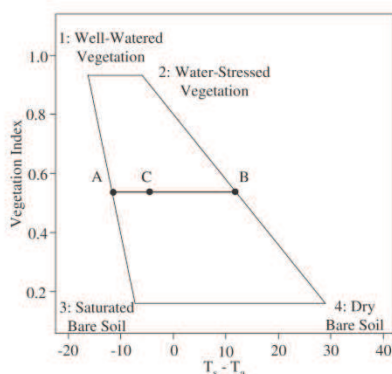


Fig. 1. The hypothetical trapezoidal shape developed by Moran *et al.* (1994) resulting from the relationship between the plant surface temperature (T_s) minus the air temperature (T_a) and the vegetation index (NDVI or SAVI) used to represent the crop cover fraction. Vertices 1 to 4 represent extreme states of vegetation development and the evaporation/ transpiration rate. For a given point C in the scatter plot, WDI is equal to the ratio between AC and AB. WDI values vary from 0 for well-watered conditions (fully transpiring vegetation) to 1 for water-stressed (no transpiration).

to be relevant, this empirical approach requires that TIR and vegetation index images encompass the extreme $T_s - T_a$ and VI values of dry/wet vegetation and soil. This requirement can be satisfied when working at a low spatial resolution with satellite images covering large areas, but a well-designed field set-up is necessary when imagery of higher spatial resolution (generally applied to smaller areas) is chosen, allowing each individual to be distinguished in phenotyping studies.

In this study, a statistical approach based on quantile regression is proposed to facilitate the delineation of the trapezoidal shape of the VIT scatterplot. This new approach is assumed to allow the application of WDI to field phenotyping of a tree population showing heterogeneous vegetation cover in response to water constraints. This statistical method as well as the theoretical method and the basic index, $T_s - T_a$, were tested on airborne multispectral images (RGB, near-infrared, and thermal infrared) of a population of 122 apple hybrids, characterized by their architectural variability (Segura *et al.*, 2008). The statistical and theoretical methods were compared with respect to their ability to delineate the VIT scatterplot under different environmental conditions, and their ease of implementation in the context of high-throughput phenotyping. The sensitivity of the WDI to changes in wet and dry references was tested by varying the levels of quantile within the statistical approach. The different stress indicators were compared in order to assess (i) their sensitivity in response to soil drought and (ii) their relevance to efficiently reflect the evolution of tree water status in comparison to the stem water potentials.

Materials and methods

Field experiments and meteorological measurements

The studied apple tree population consisted of progeny derived from a 'Starkrimson' × 'Granny Smith' cross and was characterized by strong variability in tree vigour, architectural traits (Segura *et al.*, 2008), biennial bearing (Guitton *et al.*, 2012), hydraulic traits (Lauri *et al.*, 2011), and stomatal and photosynthetic traits in response to vapour pressure deficit (Regnard *et al.*, 2009). In February 2007, four replicates of 122 hybrids and their two parents were grafted onto M9 rootstock and randomly distributed in an experimental field at the INRA Melgueil experimental station (in the southeast of France, N43°36', E03°58'). The 520 trees were planted along 10 rows oriented northwest-southeast, with an inter-row spacing of 5 m and a 2 m spacing within the rows. A tall fescue (*Festuca arundinacea*) cover, 2.5 m wide, was sown in April 2007 in the inter-rows to create grass alleys. The grass was regularly mowed, and its border approached the vertical projection of the largest tree canopies. Within the tree rows, the soil was chemically weeded in the spring to prevent adventitious plant development. The field plot was irrigated using a system of microsprayers located in the rows, with one 20 l h⁻¹ emitter per tree. A summer drought treatment was applied on two repetitions per genotype beginning on 8 July (corresponding to day of year, DOY, 189) to 5 rows out of 10, resulting in progressive water stress (WS) for these trees because the summer rainfall was very limited (Fig. 2). The five WS rows were alternated with five other rows of trees that were well watered (WW). Irrigation of the WW trees was scheduled on the basis of the soil water potential (ψ , at 30 cm and 60 cm depths) measured in a representative area of the field. It was performed twice a week from DOY 131 to 203 using an amount of water corresponding to ~3 mm per day and then three times a week from DOY 204 onward with an amount of water corresponding to ~6.5 mm per day (Fig. 2).

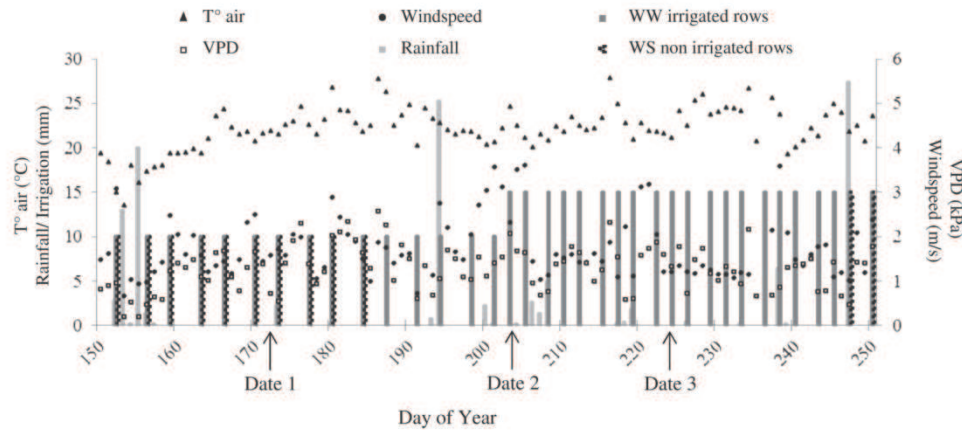


Fig. 2. Meteorological and water management data relative to the field phenotyping experiment during the 2011 summer season. Black arrows represent the airborne image acquisition dates (dates 1, 2, 3). Air temperature, VPD and wind speed are averaged for each day.

Table 1. Environmental conditions for each image acquisition date^a

Variable	Units	Date 1	Date 2	Date 3
Solar time	hh:mm	10:00	10:00	09:20
R_g	$W m^{-2}$	770.67 (3.27)	599.27 (102.85)	705.00 (0.00)
T_{air}	$^{\circ}C$	26.91 (0.19)	26.58 (0.33)	26.85 (0.49)
RH	%	58.72 (0.75)	27.96 (0.33)	31.80 (1.86)
VPD	kPa	1.47 (0.04)	2.51 (0.06)	2.41 (0.14)
u	$m s^{-1}$	1.99 (0.36)	1.73 (0.28)	0.78 (0.32)
Ψ_s WW	MPa	-0.022 (0.012)	-0.046 (0.039)	-0.024 (0.036)
Ψ_s WS	MPa	-0.031 (0.021)	-0.078 (0.037)	-0.130 (0.048)

^a Atmospheric values are means (and SD) over intervals of 12 min, corresponding to three periods of flight over the experimental plot. Ψ_s values are average measurements taken at soil depths of 30 and 60 cm for six WW trees and six WS trees just before the flights.

The trees were left unpruned during the entire experiment. Control of pests and diseases, tree fertilization, and fruit thinning were performed by conventional means, consistent with professional practices, throughout the study. Automated soil resistivity profiling conducted in March 2009 showed that the soil of the trial plot (at depths of 0–50 cm and 50–100 cm) could be considered spatially homogeneous in terms of its water-holding capacity.

The environmental conditions were monitored using meteorological sensors that recorded the global radiation (R_g), air temperature (T_a), air humidity (RH), air vapour pressure deficit (VPD), wind speed (u) and rainfall. These data were scanned every 30 s, averaged over 10-min intervals, and stored using a Campbell Scientific CR10X data logger. During the airborne image acquisition, the data collected were averaged over 2-min intervals. Table 1 presents the values of R_g , T_a , RH, and u , averaged over the 12-min image acquisition periods during three flights, the corresponding VPD values, and the average values of Ψ_s measured for six WW trees and six WS trees at 30- and 60-cm depths just before the flights.

Image acquisitions

The image acquisition system consisted of an ultra-light aircraft equipped with two EOS 500D (Canon[®], Tokyo, Japan) commercial

digital cameras (15.1 Megapixel CMOS sensor) with 35-mm lenses and one FLIR B20HSV (FLIR Systems Inc., Wilsonville, USA) thermal infrared camera (320 × 240 matrix). The spectral sensitivity of the two digital cameras was measured in the laboratory with a monochromatic source 1.2 nm wide (Déliot et al., 2005). One camera acquired visible images in the red, green, and blue (RGB) bands. The second was modified according to Lebourgeois et al. (2008, 2012) to obtain images in the near-infrared band (NIR). The settings of the two cameras (aperture, F3.5; shutter speed, 1/2000; and sensitivity, ISO100) remained unchanged throughout the experiment, except on the first acquisition date (shutter speed of the NIR camera: 1/2500). Images were acquired in raw format and, after correction of vignetting effects, digital numbers (DN) for each spectral band were retrieved by decoding the images, as described in Lebourgeois et al. (2008). For the TIR camera, the radiation detected over the spectral range of 7.5–13 μm was considered equivalent to the surface temperature, assuming a target emissivity equal to unity. As the TIR images were acquired 2 h before solar noon with a narrow-angle lens (72 mm) and a vertical view, the effects of shadows and directional radiance were minimized (Jones et al., 2009). The TIR images acquired had a radiometric resolution of 0.1 $^{\circ}C$ and an absolute precision of 2 $^{\circ}C$. All cameras pointed in the same vertical direction, and their shutters were synchronized to a single trigger.

Three flights were performed during the summer of 2011, on DOY 172 (date 1, 17 days before the beginning of the drought treatment), 203, and 223 (dates 2 and 3, and 14 and 34 days, respectively, after the beginning of the drought treatment). Consequently, on the first acquisition date, the WS trees had not yet been subjected to water constraint. The image acquisitions took place in the early phase of stomatal regulation, at approximately 10:00 GMT, early enough to prevent atmospheric disturbance caused by thermal wind that frequently arises after this hour. The images were acquired at an elevation of 300 m and had a 3 cm resolution in RGB and NIR, and a resolution of 30 cm in TIR (40 cm for the third acquisition date). At this altitude, the orchard (100 × 60 m) was covered by 1 or 2 images.

Nine aluminium targets were distributed around the periphery and within the experimental field for image geolocation (Fig. 3). A differential Global Positioning System (DGPS) was used to determine the precise position of each target, which was easily located in the thermal images due to the low emissivity of aluminium. Ground surface temperatures were acquired simultaneously for a cold target (Styrofoam: 2 × 2 m), bare soil, and a hot target (dark plastic cover: 4 × 4 m) via airborne acquisition to correct for atmospheric effects on the airborne TIR images. Temperature measurements at the ground level in the field

were performed using a Fluke 574 hand-held infrared thermometer (Fluke Corporation, Everett, USA) with a resolution of 0.1°C and a precision of 0.75°C.

Measurement of stem water potential

Stem water potential was chosen for use as a measure of the trees' water status (Doltra *et al.*, 2007). Measurements of stem water potential ($\psi_{H, stem}$) were performed using a pressure chamber (Model 3005 Soilmoisture Equipment Corp., Santa Barbara, USA) on 12 trees on dates 1 and 2 and on 20 trees on date 3. Shaded leaves located near the trunk were selected and confined in a plastic bag covered by aluminium foil for 2 h before the measurement to stop transpiration and eliminate any water potential gradient between the leaf, stem, and branches (Goldhamer and Fereres, 2001). Pressure chamber measurements began immediately after the airborne image acquisitions, and required 1–1.5 h to accomplish.

Spectral image preprocessing and vegetation index computation

The image preprocessing operations were performed with Erdas Imagine 9.3 software (Intergraph Corporation, Huntsville, USA). A vignetting correction was applied to the NIR images according to the method described by Lebourgeois *et al.* (2008). Geometric distortions in the RGB and NIR images were corrected using orthorectification based on a second-order polynomial model and the geo-located aluminium targets as references. To correct the effects

of (i) differences in solar radiation on the different dates and (ii) a quicker shutter speed on date 1 for the NIR camera, a radiometric normalization based on invariant field targets was performed for dates 1 and 3 in each spectral band, with date 2 as a reference, so that the acquisitions would be comparable from one date to another.

After orthorectification based on both the RGB and NIR images and the geo-located aluminium targets, the TIR images were corrected for atmospheric effects using ground surface temperatures acquired for the bare soil and hot and cold targets, as described previously. $T_s - T_a$ images were obtained by subtracting the air temperature acquired simultaneously from each pixel value of the TIR images.

The normalized difference vegetation index (NDVI; Rouse *et al.*, 1973) was used to estimate the crop cover fraction and was calculated as follows: $NDVI = (NIR - R) / (NIR + R)$, where R and NIR are the digital values recorded by the cameras in the red and near-infrared bands, respectively. Bidirectional reflectance distribution heterogeneity was generally assumed to be effectively normalized through band ratio indices (Colwell, 1974). In our case, the images were acquired at 10:00 GMT (high sun elevation), with a limited lens field of view (35 mm); thus, the calculated NDVI was assumed to limit most of these directional effects. As NIR and R corresponded to DN, the range of NDVI values obtained in this study did not correspond well to the typical values mentioned in the literature for NIR and R that correspond to reflectance values. The spatial resolution of the NDVI images was degraded from 3 to 30 cm to match the TIR image resolution on dates 1 and 2 and from 3 to 40 cm to match the TIR image resolution on date 3.

For each of the 520 trees, a zone of interest larger than the crown, common to each of the three dates and containing balanced

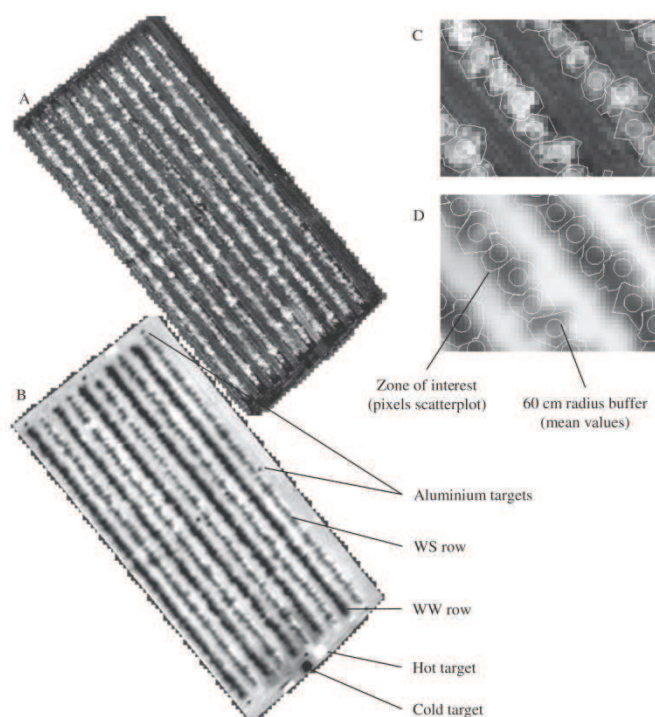


Fig. 3. NDVI (A, C) and $T_s - T_a$ (B, D) images of the apple orchard on date 2. Zones of interest, larger than individual tree canopies, were manually drawn and merged to compute the field study mask, with delineation based on NDVI images (C) and then applied to $T_s - T_a$ images (D). For each individual tree, a 60-cm-radius buffer (representative zone) was located at the tree centre.

proportions of ground and tree vegetation, was manually drawn to serve as a study mask (Fig. 3). This study mask was used to avoid the influence of the distribution of the scatterplot in the determination of the left and right envelopes, using a statistical method to limit the weight of dry grass or bare soil pixels for the inter-rows. After merging the 520 zones, the pixel values of NDVI and $T_s - T_a$ were extracted from the resulting mask of the whole field plot and used to obtain the VIT scatterplot for each date. Representative NDVI and $T_s - T_a$ values were also extracted for each individual tree from a circular buffer with a 60-cm radius around the centre of the tree. Given the 30 or 40 cm resolution of the images, each buffer contained 12–16 pixels. For each tree, mean NDVI and $T_s - T_a$ were used to compute statistical and theoretical WDI values (hereafter referred to as WDI_qr and WDI_t, respectively) for each tree and each date.

Theoretical approach to WDI calculation

In the theoretical VIT approach developed by Moran et al. (1994), vertices of the trapezoid constitute four extreme states of vegetation cover and water status, as described previously (Fig. 1). WDI is computed as the ratio of distances AC/AB, where AC and AB correspond to $[(T_s - T_a) - (T_s - T_{a,min})]$ and $[(T_s - T_{a,max}) - (T_s - T_{a,min})]$, respectively. $(T_s - T_{a,min})$ and $(T_s - T_{a,max})$ represent the wet and dry references, respectively, of WDI. These temperature references depend on the NDVI value (Fig. 1). For each vertex, the $(T_s - T_a)_i$ value (the subscript i refers to vertices 1 to 4 in Fig. 1) is based on physical energy balance equations and can be computed as follows:

For well-watered dense vegetation:

$$(T_s - T_a)_1 = \frac{r_a(R_n - G)}{C_v} \times \frac{\gamma \left(1 + \frac{r_{cp}}{r_a}\right)}{\Delta + \gamma \left(1 + \frac{r_{cp}}{r_a}\right)} - \left(\frac{VPD}{\Delta + \gamma \left(1 + \frac{r_{cp}}{r_a}\right)} \right) \quad (1)$$

where r_a is the aerodynamic resistance (s m^{-1}), R_n is the net radiation (W m^{-2}), G is the soil heat flux density (W m^{-2}), C_v is the volumetric heat capacity of air ($\text{J } ^\circ\text{C}^{-1} \text{m}^{-3}$), γ is the psychrometric constant ($\text{kPa } ^\circ\text{C}^{-1}$), r_{cp} and r_{cs} are the canopy resistances to vapour transfer for fully transpiring and fully stressed cover, respectively (s m^{-1}), VPD is the air vapour pressure deficit (kPa), and Δ is the slope of the saturated vapour pressure–temperature relationship ($\text{kPa } ^\circ\text{C}^{-1}$). The parameters γ and Δ are computed from equations in the FAO 56 database.

For water-stressed dense vegetation:

$$(T_s - T_a)_2 = \frac{r_a(R_n - G)}{C_v} \times \frac{\gamma \left(1 + \frac{r_{cs}}{r_a}\right)}{\Delta + \gamma \left(1 + \frac{r_{cs}}{r_a}\right)} - \left(\frac{VPD}{\Delta + \gamma \left(1 + \frac{r_{cs}}{r_a}\right)} \right) \quad (2)$$

For water-saturated bare soil, where canopy resistance $r_c = 0$:

$$(T_s - T_a)_3 = \frac{r_a(R_n - G)}{C_v} \times \frac{\gamma}{\Delta + \gamma} - \left(\frac{VPD}{\Delta + \gamma} \right) \quad (3)$$

and for dry bare soil, where $r_c = \infty$:

$$(T_s - T_a)_4 = \frac{r_a(R_n - G)}{C_v} \quad (4)$$

The net radiation R_n was computed from the classical expression for the surface radiation budget:

$$R_n = (1 - \alpha) \times R_s + R_a - \varepsilon \sigma T_s^4 \quad (5)$$

In eqn 5, α is the surface albedo [assumed to be equal to 0.18, 0.16, and 0.24 for vegetation, saturated bare soil, and dry bare soil, respectively, according to Bsaibes et al. (2009)], R_s is the incoming shortwave solar radiation (W m^{-2}), R_a is the atmospheric radiation, computed as described by Brutsaert (1975) and equal to 0.83 for our conditions, ε is the surface emissivity (0.98, 0.95, and 0.92 for vegetation, saturated bare soil, and dry bare soil, respectively; Fuchs and Tanner, 1968; Mira et al., 2007), σ is the Stefan–Boltzmann constant ($5.67 \times 10^{-8} \text{ W m}^{-2} \text{ K}^{-4}$) and T_s is the radiative surface temperature (K). The soil heat flux density G was computed from R_n with G equal to $0.15 \times R_n$ for vegetation, $0.3 \times R_n$ for saturated bare soil and $0.5 \times R_n$ for dry bare soil (Idso et al., 1975).

The aerodynamic resistance r_a in eqns 1 to 4 was computed as defined by Thom and Oliver (1977). The equation proposed by these authors is well suited to low-wind speed conditions (Jackson et al., 1988) and was therefore adopted for use in this study because the measured wind speed u was always less than 2 m s^{-1} during the image acquisitions (see Table 1):

$$r_a = 4.72 \times \frac{\left(\ln \left(\frac{z - d}{z_0} \right) \right)^2}{1 + 0.54u} \quad (6)$$

In eqn 6, z is the anemometer height (3.2 m), u is the wind speed (m s^{-1}), d is the zero-plane displacement (e.g. for apple trees, 2.49 m; Mihailović et al., 2010), z_0 is the roughness parameter (e.g. for apple trees, 0.24 m; Mihailović et al., 2010), and h is the maximum vegetation height (3.5 m). The values r_{cp} and r_{cs} depend on stomatal closure and can be determined from the stomatal resistance (r_s) and the maximum leaf area index (LAI): $r_c = r_s / \text{LAI}$ (Moran et al., 1994). A value of 4 was assumed for the maximum LAI. The minimum stomatal resistance in the WW condition (r_{cp}) was taken to be 38 s m^{-1} [cv. Granny Smith in Liu et al. (2012)] and the maximum value was taken to be 1171 s m^{-1} in the WS condition (r_{cs}) (team data, unpublished).

Statistical approach to WDI calculation

Quantile regression is a method for describing the relations between variables for all portions of a probability distribution (Koenker and Bassett, 1978). This method was used in this study in order to easily define wet and dry references of the trapezoid envelope of $T_s - T_a$ vs NDVI for each acquisition date. The left and right boundaries (oblique lines 1–3 and 2–4 corresponding to the wet and dry references, respectively, as shown in Fig. 1) were obtained by calculating the quantile regression of $T_s - T_a$ as a function of NDVI. We applied six quantile levels for the left (0.1, 0.5, 1, 2, 3, and 4%) and right (99.9, 99.5, 99, 98, 97, and 96%) boundaries, thereby delimiting 99.8, 99, 98, 96, 94, and 92% of the scatterplot. The horizontal upper and lower limits of the scatterplot were determined from the maximum and minimum observed values of NDVI. WDI values were calculated for each pair of left and right boundaries obtained from the different quantiles and designated as WDI_n (n representing the interval percentage). The calculations were carried out using the quantreg software package (R Development Core Team 2008), developed by Koenker (2008).

Statistical analysis

Analyses were performed for 464 trees, i.e. for 116 genotypes replicated four times. Six genotypes, for which one of the four replicates died, were not taken into account. All the experimental data were analysed with the R software v.2.13.2. After normality and homoscedasticity tests, analyses of variance (ANOVA) were performed to test (i) the effect of WDI computation method on responses of WW and WS trees, (ii) the drought effect at each date for NDVI and the different water stress indicators, and (iii) the date effect on WW and WS trees for the same variables. The quality of the linear regressions between $T_s - T_a$, WDI_qr and WDI_t and the plant stem water

potential was assessed using the coefficient of determination (R^2) for each date and all dates confounded.

Results

VIT trapezoid envelope computation

Plots of NDVI versus $T_s - T_a$ for the three dates are presented in Fig. 4 for each pixel of the study mask (VIT scatterplot: grey points). The theoretical method was applied to delineate the VIT scatterplot for the three image acquisition dates (Fig. 4A, C, and E, respectively). The left boundary correctly delineated the scatterplot (grey points) for dates 1 and 2 only (Fig. 4A and C). In contrast, the left boundary overlapped the scatterplot for date 3 (Fig. 4E), excluding approximately one quarter of the scatterplot. The right boundary delineated the right part of the scatterplot satisfactorily for date 3 (Fig. 4E) but overlapped it for dates 1 and 2 (Fig. 4A and C). The theoretical left and/or right boundaries did not satisfactorily delineate the scatterplot for any of the acquisition dates. However, for dates 1 and 2, the majority of the points representing the average values of NDVI and $T_s - T_a$ per tree (white and black circles) were included in the trapezoid. In contrast, for date 3, a number of the average values of NDVI and $T_s - T_a$ for the WW trees were located outside the left border of the theoretical envelope, leading to out-of-range WDI values (see below).

With the statistical method (Fig. 4B, D, and F), various trapezoid limits were obtained depending on the quantile levels used. Lines delimiting the left and right boundaries overlapped the scatterplot slightly, increasingly as the percentage of the scatterplot used in the quantile regression decreased. However, for each date, the computed boundaries delimited all the average values of NDVI and $T_s - T_a$ per tree. The left boundaries obtained with the different quantile levels used in the regression converged at the upper left part of the scatterplot (corresponding to vertex 1; see Fig. 1) while the right boundaries diverged at the upper right part of the scatterplot for each date (vertex 2, Fig. 1). The values for the WW trees were mostly located in the upper left part of the scatterplot, near the convergence point (Fig. 4B, D, and F). In contrast, the values for the WS trees were located in the upper right half of the scatterplot, near the different right boundaries whose divergences could affect the WDI values of the WS trees. When different water regimes were established, on dates 2 and 3, data points corresponding to WW and WS trees appeared clearly separated.

Influence of left and right boundaries

Influence of the trapezoid boundaries, obtained using the statistical method, on WDI distribution and mean values was studied for each date for the WW and WS trees using boxplots (Fig. 5A, C, and E; and Fig. 5B, D, and F, respectively). Regardless of the unsatisfactory results obtained using theoretical trapezoid delineation, the WDI_t values obtained were also included in these comparisons.

The ranges of tree WDI values obtained by the theoretical method (WDI_t) were larger than the ranges obtained from

the different quantile regressions for date 1 (Fig. 5A and B) and were comparable to the ranges of WDI₉₂ values for dates 2 and 3 (Fig. 5C, D, E, and F). The means of WDI_t values were significantly higher than those of the different WDI_{qr} values for dates 1 and 2, whatever the water regime (Fig. 5A, B, C, and D), and lower for date 3 (Fig. 5E and F). The low and even negative values of WDI_t obtained in WW trees for date 3 can be explained by the overlapping of the left theoretical boundary on a portion of the points corresponding to the WW trees (Fig. 4E). The mean WDI_t presented inconsistent values regardless of the water treatment applied: the mean values obtained on date 1 for the WW and WS trees (0.55 and 0.57), before water stress, were unexpectedly greater than that for the WS trees (0.38) on date 3 (when water stress was well established).

The range of statistical WDI values computed from the different quantile regression (WDI_{qr}) for each date decreased as the percentage of the scatterplot taken into account increased, for both the WW and the WS trees. When only the mean WDI_{qr} value of each quantile was considered, no significant differences were observed for the WW trees for any of the three dates (Fig. 5A, C, and E) or for WS trees for the well-watered conditions on date 1 (Fig. 5B). In contrast, on dates 2 and 3, the mean WDI_{qr} values of the WS trees decreased significantly when the percentage of the scatterplot increased (Fig. 4D and F). It remained nevertheless higher than in WW trees.

Influence of environmental conditions: drought and date effects

The effects of irrigation regime and observation date on WW and WS trees are presented in Table 2, considering different phenotypic variables. As these effects were similar on all the WDI_{qr} values, only the WDI_{qr} computed for the maximum and minimum quantile used are presented.

The drought effect was tested considering the different experiment dates separately. For date 1 (DOY 172), where irrigation regime in WW and WS tree was not differentiated (see ψ_s in Table 1), no significant differences were observed for any of the variables. The effect of drought was significant only for date 3 for NDVI with lower value for WS trees. The drought effect was significant ($P \leq 0.001$) for dates 2 and 3, with an increase in the values of each variable related to water status, $T_s - T_a$, WDI_{qr}, and WDI_t.

The date effect is analysed thereafter for WW and WS trees separately (Table 2). For NDVI, a date effect was observed, with a significant increase of mean values from date 1 to date 3, whatever the water regime. The temporal increase of NDVI values between these dates was slightly less in WS trees (+0.024) than in WW trees (+0.039). Concerning $T_s - T_a$, the mean value observed for date 1 for WW trees (about 6°C) was more elevated than those observed on the same trees for dates 2 and 3 (nearing 0°, Table 2). $T_s - T_a$ mean values of WS trees for dates 2 and 3, where WS trees were submitted to soil drought, presented similar and non-significantly different values with date 1 (around 6°C), where WS trees were still irrigated.

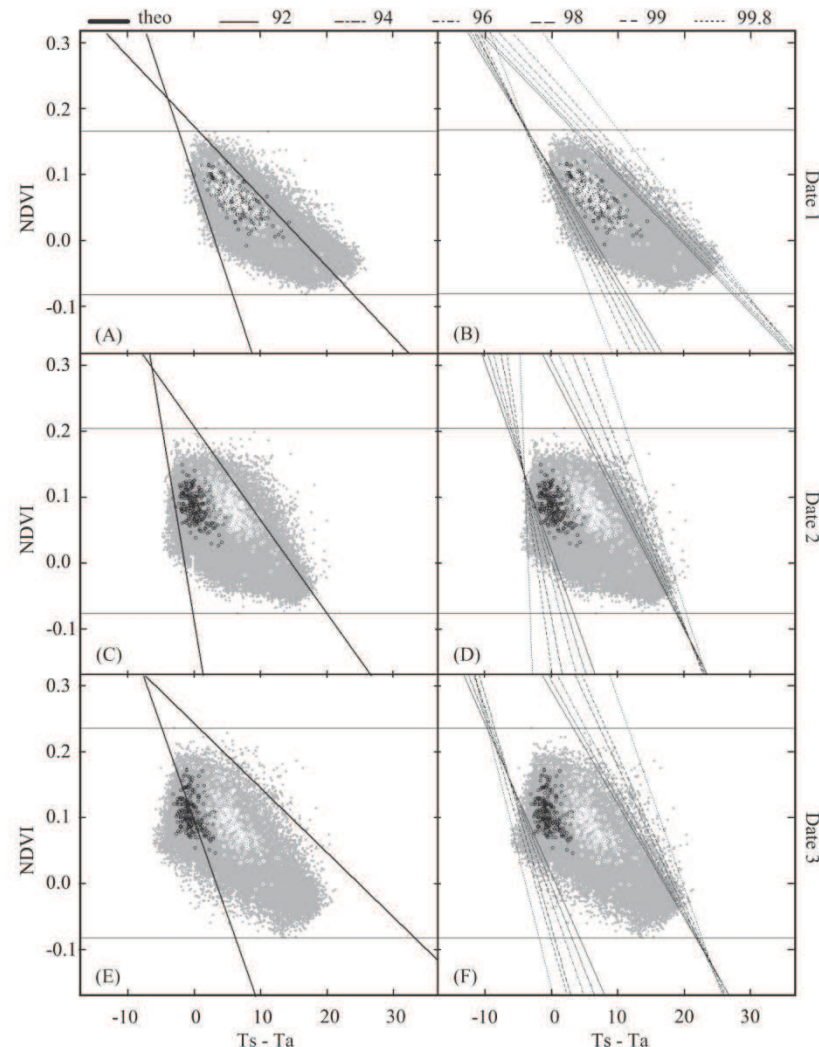


Fig. 4. Envelopes of VIT trapezoids obtained using the theoretical approach (A, C, and E) and quantile regression (B, D, and F) for the three flights over the field plot on dates 1 (A, B), 2 (C, D), and 3 (E, F). Grey points represent pixel values inside the study mask for NDVI (y-axis) and $T_s - T_a$ (x-axis). Black and white circles represent the average y/x values for individual WW and WS trees, respectively.

A significant date effect was observed for the different WDI computation methods (Table 2). For WW trees, significant variations were observed, the lowest WDI values being observed for date 2 (0.22). For WS trees, a significant increase of mean WDI_{qr} was observed on dates 2 and 3 compared to date 1. For WDI₉₂, mean value was slightly but significantly higher for date 2 than for date 3 (0.65 and 0.62, respectively) while the WDI_{99.8} mean values were

equal for dates 2 and 3. WDI_t also presented a date effect for WW and WS trees. As stated previously in Fig. 4, this variable showed meaningless variations. Mean WDI_t decreased significantly in the WW trees, from date 1 to date 3, while it was significantly higher for date 2 in the WS trees. Mean WDI_t value of WS trees for date 3 was significantly lower than the value obtained for date 1, where WS trees were still well-irrigated.

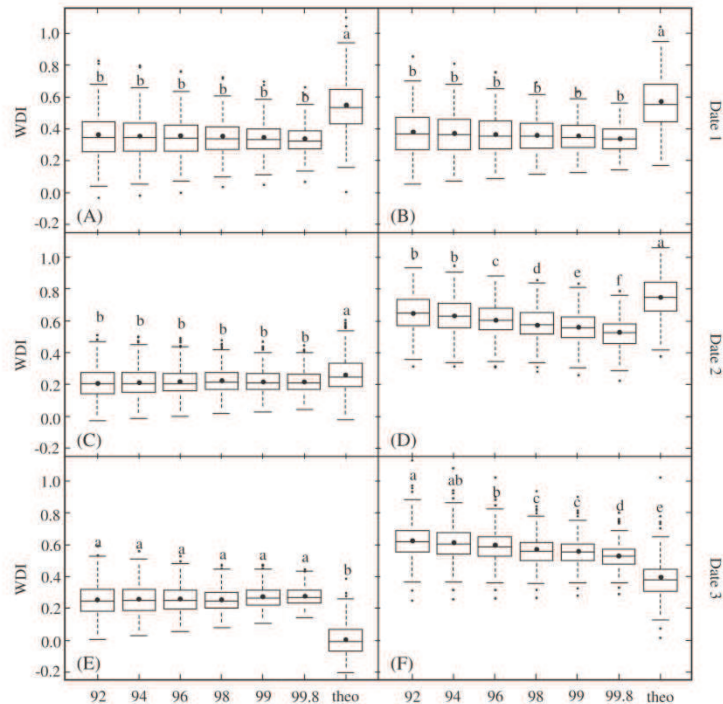


Fig. 5. Distribution of WDI values (116 genotypes $\times$ 2 replicates) for the theoretical (theo) and statistical (quantile regression using 92–99.8% of scatter plot) methods for the three dates: dates 1 (A, B), 2 (C, D), and 3 (E, F), and for the two irrigation regimes, WW and WS. Each box plot shows the median value, the 1st and 3rd quartiles, and the 1st and 9th deciles. Mean values of WDI are represented by closed black circles inside box plots. For each irrigation regime and each date, lower-case letters identify mean WDI values that are significantly different from each other (NK test; $\alpha = 0.05$).

Table 2. ANOVA testing the soil drought and date effects for WW and WS trees on NDVI, $T_s - T_w$, WDI_92, WDI_99.8, and WDI_t variables*

		NDVI	$T_s - T_w$	WDI_92	WDI_99.8	WDI_t
Date 1	WW	0.072 (0.023) ^c	6.05 (1.87) ^a	0.36 (0.11) ^a	0.34 (0.07) ^a	0.55 (0.13) ^a
	WS	0.074 (0.025) ^c	6.08 (1.84)	0.37 (0.09) ^c	0.34 (0.06) ^b	0.57 (0.11) ^b
	Drought effect	ns	ns	ns	ns	ns
Date 2	WW	0.090 (0.022) ^b	0.38 (1.00) ^b	0.22 (0.07) ^c	0.22 (0.05) ^c	0.27 (0.08) ^b
	WS	0.087 (0.027) ^b	6.01 (1.67)	0.65 (0.09) ^a	0.52 (0.07) ^a	0.75 (0.10) ^a
	Drought effect	ns	***	***	***	***
Date 3	WW	0.111 (0.024) ^a	-0.37 (0.92) ^c	0.25 (0.08) ^b	0.27 (0.04) ^b	0.00 (0.07) ^c
	WS	0.098 (0.031) ^a	5.81 (1.54)	0.62 (0.09) ^b	0.52 (0.05) ^a	0.38 (0.10) ^c
	Drought effect	***	***	***	***	***
Date effect	WW	***	***	***	***	***
	WS	***	ns	***	***	***

* Values are means (and SD) for the water regimes for each date. Significant *P*-values are represented as follows: * for $P \leq 0.05$, ** for $P \leq 0.01$ and *** for $P \leq 0.001$; ns, not significant. According to the post-hoc Student-Newman-Keuls test ($\alpha = 0.05$) different letters indicate when significant differences exist between dates for each variable, lower-case and upper-case letters being relative to WW and WS trees, respectively.

Image-based stress indicators versus stem water potential (ψ_H stem)

Linear regressions of ψ_H stem against $T_s - T_w$, WDI_qr, and WDI_t were established for a subset of 12 trees for date 1 (all

well watered), six WW and six WS trees for date 2, and 10 WW and 10 WS trees for date 3 (Fig. 6). For date 1 (Fig. 6A to D), $T_s - T_w$, WDI_qr, and WDI_t were not correlated with ψ_H stem, whose range of variation was very limited (-0.70 to -1.35 MPa) because WS trees were not yet submitted to

water stress. Linear regressions between $\psi_{H\text{ stem}}$ and $T_s - T_a$ showed significant negative correlations once water constraint was established on the WS population (for dates 2 and 3; Fig. 6E and I). Similarly, on the same dates, WDI_qr and WDI_t were significantly correlated with $\psi_{H\text{ stem}}$ (Fig. 6F, G, and H and Fig. 6J, K, and L) regardless of the computation method considered. For date 2 (Fig. 6E to H), i.e. for conditions of moderate water constraint, the R^2 values corresponding to the regressions between $\psi_{H\text{ stem}}$ values and those of image-based indicators were significant ($P \leq 0.01$) and ranged between 0.56 and 0.61. For date 3 (Fig. 6I to L), i.e. for conditions of more severe water constraint, leading to a larger range of $\psi_{H\text{ stem}}$ values, R^2 was 0.76 for $T_s - T_a$, 0.79 for WDI_92 and WDI_99.8, and 0.80 for WDI_t. All these correlations were highly significant ($P \leq 0.001$). When the data set was considered all dates confounded, linear regression between $\psi_{H\text{ stem}}$ and $T_s - T_a$ showed less significant correlation (Fig. 6M; $P \leq 0.01$; $R^2 = 0.19$) than regression between

$\psi_{H\text{ stem}}$ and WDI_qr (Fig. 6N–O; $P \leq 0.001$; $R^2 = 0.52$ to 0.57) while correlation between $\psi_{H\text{ stem}}$ and WDI_t was no more significant (Fig. 6P; $R^2 = 0.06$).

Discussion

Remotely sensed images were acquired for different dates and irrigation regimes at an altitude of 300 m, and the whole orchard trial was covered by one or two TIR images with a 30- to 40-cm pixel size. This intermediate image resolution made it possible to phenotype the whole experimental plot using a series of snapshots and to work at the tree level, with individuals distinguishable from each other (Berni et al., 2009).

Limits of $T_s - T_a$ as a water stress indicator

The canopy surface temperature considered for each tree was an average of numerous leaf temperatures, located within a

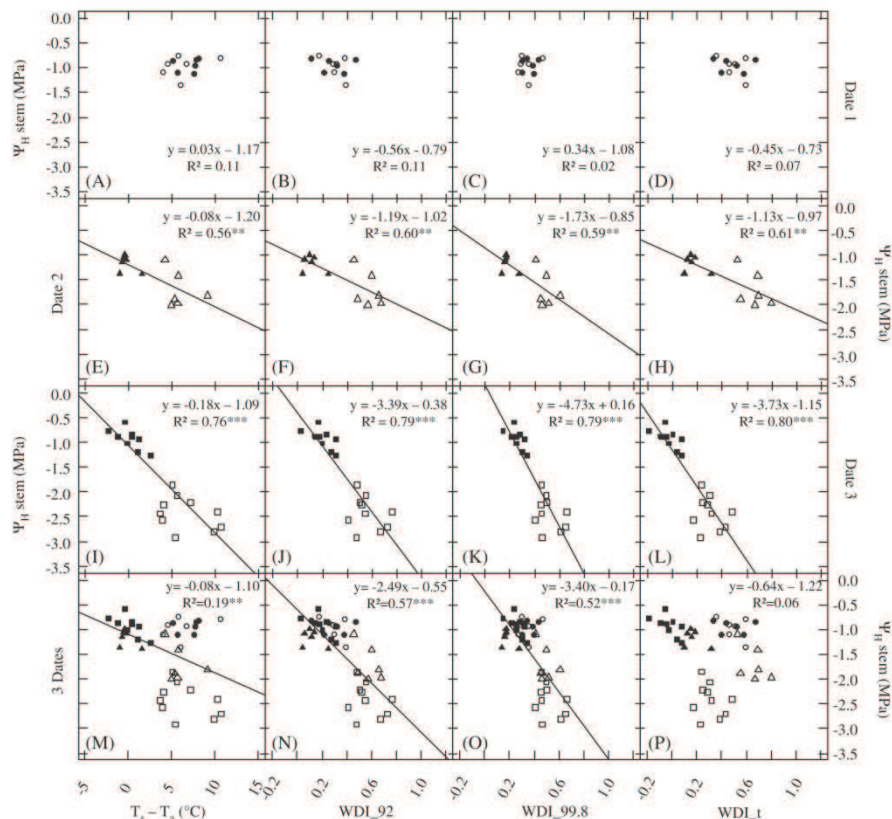


Fig. 6. Linear regressions between stem water potential ($\psi_{H\text{ stem}}$) and $T_s - T_a$ (A, E, I, and M), WDI_92 (B, F, J, and N), WDI_99.8 (C, G, K, and O) and WDI_t (D, H, L, and P) for the three flight dates separately (date 1, A, B, C, and D; date 2, E, F, G, and H; date 3, I, J, K, and L), or confounded (M, N, O, and P). Closed symbols correspond to WW trees and open symbols correspond to WS trees. Circles, triangles, and squares correspond to dates 1, 2, and 3, respectively. Significant regression P -values are represented as follows: * for $P \leq 0.05$, ** for $P \leq 0.01$, and *** for $P \leq 0.001$.

representative canopy central zone, thus buffering the effects of leaf angular distribution (Jones *et al.*, 2009). Indeed it is often preferable to use thermal measurement of the canopy surface instead of particular leaves (Maes and Steppe, 2012).

When the experiment dates were considered separately, the mean T_s-T_a values of WS trees compared to those of WW trees were consistent with the irrigation regime applied and showed a significantly higher canopy temperature when water was withheld. Differences between mean T_s-T_a of WW and WS trees were consistent with the diminution of soil water potential ψ_s , thus enabling discrimination between water-constrained and well-irrigated trees.

Nevertheless, as described in the literature (Maes and Steppe, 2012), our results also highlighted difficulties in the interpretation of T_s-T_a variations across time. Indeed, surface temperatures for date 1 were higher than those observed later, particularly in WW trees. This probably resulted from the lower evaporative demand for date 1 (VPD = 1.47 kPa) compared to dates 2 and 3 (VPD = 2.51 and 2.41 kPa, respectively), while T_s-T_a was lower for dates 2 and 3 in WW trees, as a likely consequence of higher transpiration rates. As the effect of soil drought was opposite, with a 6°C temperature rise in WS compared to WW trees for dates 2 and 3, both effects could compensate, explaining why T_s-T_a revealed no significant differences between dates in the WS treatment. As a consequence, this sole stress indicator is not reliable for temporal analysis of soil drought response.

Another point described in the literature concerns the proportion of soil viewed through the vegetation which can be a source of error in interpretation of T_s-T_a (Jackson *et al.*, 1981; Moran *et al.*, 1994). Tree values of T_s-T_a were averaged inside a buffer zone of 60 cm radius. Presence of soil and mixed pixels inside this buffer zone, due to genotypic differences in vegetation cover fraction and structure, can create a bias in estimation of water status for the smallest trees or in those whose architecture is porous. As the raw T_s-T_a variable is not corrected from soil temperature, this can be a source of error in phenotypic analyses (White *et al.*, 2012).

Limits of the WDI theoretical approach

In our conditions, applying the theoretical method for delineating the VIT scatterplot did not yield satisfactory results. For the three dates of the experiment, the theoretical envelopes overlapped either the left or the right border of the VIT scatterplot. Computation of WDI_t produced values that were underestimated and out of the expected range for date 3. Although a theoretical approach enabled relative comparisons of WS and WW trees for a given date, comparisons between dates yielded contradictory results.

These difficulties may be explained by heavy model implementation and numerous sources of error caused by estimation of some parameters, especially in the context of high-throughput phenotyping. The energy transfer between soil and vegetation can differ between the full-cover fraction of a field crop and the partial-cover vegetation of an orchard. Heilman *et al.* (1996) suggested that a large variation in the soil energy balance (vertices 3 and 4, Fig. 1) can result from its

sensitivity to the wind speed u , the aerodynamic resistance r_a , and the surface temperature T_s when crops are trellised and/or organized in rows. This is typically the case in an orchard or a vineyard (Galleguillos *et al.*, 2011). Moreover, the net radiation R_n , which depends on the albedo a and emissivity ε , is sensitive to the surface composition and row orientation (Van de Griend and Owe, 1993; Zarco-Tejada *et al.*, 2005). Another limit to the application of the theoretical determination of WDI for the purpose of phenotyping is the architectural variability of the vegetation cover at the individual plant level. Indeed, the trees differed in height (1.5 to 3.5 m) and in vegetation density ($0 < \text{NDVI} < 0.18$). One way to improve the theoretical energy balance model for a heterogeneous population would be to parameterize this model for the most contrasted genotypes in response to water constraints. Nevertheless, implementing the theoretical model would require a previous identification of extreme genotypes of the population before phenotyping and measurements of the canopy physical characteristics (the aerodynamic and stomatal resistance, r_a and r_s , the height, h , the net radiation, R_n , and the soil heat flux, G).

Contribution of the statistical approach

Quantile regression enabled scatterplot delineation at each of the three dates of experimentation. Our results showed that the quantile percentage of the scatterplot used to define the left and right boundaries influenced the WDI values. A reduction in the scatterplot percentage resulted in an increase in the range of variation of WDI values and a significant increase in the mean WDI values for trees submitted to water constraints (Table 2). These variations can mainly be attributed to divergence of the right limits at the upper right side of the scatterplot. Like WDI_t and T_s-T_a , WDI_{qr} enabled differentiation between WW and WS trees when a contrasting irrigation regime was applied at a given date (dates 2 and 3), whatever the quantile applied. Moreover, use of WDI_{qr} as a stress indicator in WS trees produced mean tree values that were consistent with evolution of ψ_s for the three dates (Table 1) compared to values of WDI_t and T_s-T_a .

Assessing the WDI_{qr} values in more depth would require the determination of the actual to maximal evapotranspiration ratio for each tree of the population in the orchard, which seems unrealistic. Nevertheless, the statistical method used to delineate the VIT trapezoid yielded typical WDI values for the trees, in the range of 0 to 1, at least for the quantile panel tested. Moreover, quantile regression was relatively easier to implement in regard to the theoretical method.

Water stress indicator and sensitivity to environmental conditions

For apple trees, $\psi_{H\text{ stem}}$ constitutes a robust estimator of plant water status (Naor 2006; Doltra *et al.*, 2007). In our case, on dates 2 and 3, which presented contrasting hydric conditions, the stem water potential was well correlated with the different water stress indicators (T_s-T_a , WDI₉₂, WDI_{99.8}, and WDI_t). However as described in the previous section, T_s-T_a

and WDI_t values were inconsistent with soil drought for some dates. This resulted in a poor correlation of these indicators with stem water potential when all dates were confounded (Fig. 6). Concerning WDI_{qr}, although variation in the quantile levels could impact its values, the quality of the relationship between ψ_H stem and WDI_{qr} was little affected, considering dates 2 and 3 separately. For a temporal comparison WDI_{qr} thus appeared as the most robust index as shown by the highest correlation with ψ_H stem in comparison to T_s-T_a and WDI_t.

Stable WDI_{qr} values computed for the WS trees for dates 2 and 3 were not fully consistent with the variations of ψ_H stem, which indicated increasing water stress in the WS trees between these two dates, and revealed a possible underestimation of the water stress by WDI_{qr} at date 3. One possible explanation is the time of image acquisition, which was slightly earlier in the day on date 3 (9:20 GMT) than on date 2 (10:00 GMT), i.e. at an earlier phase of daily stomatal regulation for date 3, while subsequent measurement of the stem water potential reflected the daily minimum ψ_H stem in both cases. Another possibility is that the development of the fruit sink strength increasingly stimulated photosynthetic activity and carbon acquisition, allowing a concomitant continuation of transpiration and a decrease in ψ_H stem; low midday stem water potentials in apple trees, decreasing with increasing crop loads, have been shown by Naor *et al.* (2008). This can create an upper limit on the highest WDI values observed, even after water stress was established. A third possibility is the influence of a lower soil water potential ψ_s at date 3 than at date 2 (see Table 1), producing a shift in ψ_H stem toward more negative values. These three hypotheses are non-exclusive.

Conclusion

This study confirmed that thermal infrared imagery contributes interestingly to the phenotyping of crop response to water stress. Based on multispectral images acquired, the VIT concept constitutes a relevant approach that takes the environmental conditions and vegetation cover fraction into account. Moreover it allows a characterization of the water status of a whole tree population with heterogeneous architectural traits and an irregular cover fraction. To avoid the difficulties of parameterization of the theoretical WDI model and allow more operational phenotyping, a simplified statistical approach based on quantile regression has been proposed to delineate the boundaries of the VIT scatterplot needed for WDI computation. Regardless of the percentage of the scatterplot used (from 92 to 99.8%) to delineate the VIT trapezoid, the resulting WDI_{qr} was well correlated to the stem water potential.

Unlike with a WDI theoretical approach or T_s-T_a , a WDI statistical approach produced values consistent with temporal variations of water status. The range of WDI_{qr} values (0.20 to 0.65) indicates its sensitivity to water constraint, and a next step will be exploring the genetic variability of this response within the tree population. Further investigations will also attempt to evaluate the daily dynamics of stomatal regulation of the 122 hybrids in response to water

constraints through yielding successive images during the same day and assessing the potential of a WDI statistical approach at this time scale. This analysis could contribute to discriminating the genotypic stomatal behaviours (isohydric vs anisohydric). Thanks to its relatively simple implementation, the quantile regression approach shows promise as an efficient tool for thermal imagery and use in phenotyping studies.

Funding

The PhD scholarship of Nicolas Virlet was granted by Montpellier SupAgro and the Languedoc Roussillon Region.

Acknowledgements

We thank S. Feral, R. Marty, and A. Jolivet for their contributions to the establishment of the experiment and the field measurements. We also thank the Avion Jaune® Company for its expertise in airborne imagery. We are grateful to L. Prévot for rich discussions about the theoretical basis of WDI.

References

- Alchanatis V, Cohen Y, Cohen S, Möller M, Sprinstin M, Meron M, Tsipris J, Saranga Y, Sela E. 2010. Evaluation of different approaches for estimating and mapping crop water status in cotton with thermal imaging. *Precision Agriculture* **11**, 27–41.
- Berger B, Parent B, Tester M. 2010. High-throughput shoot imaging to study drought responses. *Journal of Experimental Botany* **61**, 3519–3528.
- Berni JAJ, Zarco-Tejada PJ, Sepulcre-Cantó G, Fereres E, Villalobos F. 2009. Mapping canopy conductance and CWI in olive orchards using high resolution thermal remote sensing imagery. *Remote Sensing of Environment* **113**, 2380–2388.
- Braun HJ, Altin G, Payne T. 2010. Multi-location testing as a tool to identify plant response to global climate change. In: Reynolds MP, ed. *Climate change and crop production*. CABI: Wallingford, UK, 115–138.
- Brendel O, Le Thiec D, Scotti-Saintagne C, Bodénès C, Kremer A, Guehl JM. 2008. Quantitative trait loci controlling water use efficiency and related traits in *Quercus robur* L. *Tree Genetics & Genomes* **4**, 263–278.
- Brutsaert W. 1975. Derivable formula for long-wave radiation from clear skies. *Water Resources Research* **11**, 742–744.
- Bsaibes A, Courault D, Baret F *et al.* 2009. Albedo and LAI estimates from FORMOSAT-2 data for crop monitoring. *Remote Sensing of Environment* **113**, 716–729.
- Clarke TR. 1997. An empirical approach for detecting crop water stress using multispectral airborne sensors. *HortTechnology* **7**, 9–16.
- Cohen Y, Alchanatis V, Prigojin A, Levi A, Soroker V. 2012. Use of aerial thermal imaging to estimate water status of palm trees. *Precision Agriculture* **13**, 123–140.
- Colwell JE. 1974. Vegetation canopy reflectance. *Remote Sensing of Environment* **3**, 175–183.
- Condon AG, Richards RA, Rebetzke GJ, Farquhar GD. 2004. Breeding for high water-use efficiency. *Journal of Experimental Botany* **55**, 2447–2460.
- Déliot P, Duffaut J, Lacan A. 2005. Characterization and calibration of a high-resolution multispectral airborne digital camera. In: *20th Congress of the International Commission for Optics*. Changchun, China, 21–26 Aug 2005. 603104:1–603104.10.
- Dillen SY, Marron N, Koch B, Ceulemans R. 2008. Genetic variation of stomatal traits and carbon isotope discrimination in two hybrid poplar families (*Populus deltoides* 'S9-2' x *P. nigra* 'Ghoy' and *P. deltoides* 'S9-2' x *P. trichocarpa* 'V24'). *Annals of Botany* **102**, 399–407.
- Doltra J, Oncins JA, Bonany J, Cohen M. 2007. Evaluation of plant-based water status indicators in mature apple trees under field conditions. *Irrigation Science* **25**, 351–359.

- Fiorani F, Schurr U. 2013. Future scenarios for plant phenotyping. *Annual Review of Plant Biology* **64**, 267–291.
- Fischer KS, Fukai S, Kumar A, Leung H, Jongdee B. 2011. Field phenotyping strategies and breeding for adaptation of rice to drought. *Frontiers in Physiology* **3**, 1–21.
- Fuchs M, Tanner CB. 1968. Surface temperature measurements of bare soils. *Journal of Applied Meteorology* **7**, 303–305.
- Gaudillère JP, van Leeuwen C, Ollat N. 2002. Carbon isotope composition of sugars in grapevine, an integrated indicator of vineyard water status. *Journal of Experimental Botany* **53**, 757–763.
- Giorgi F, Lionello P. 2008. Climate change projections for the Mediterranean region. *Global and Planetary Change* **63**, 90–104.
- Giuliani R, Flore JA. 2000. Potential use of infra-red thermometry for the detection of water stress in apple trees. *Acta Horticulturae* **537**, 383–392.
- Goldhamer DA, Fereres E. 2001. Irrigation scheduling protocols using continuously recorded trunk diameter measurements. *Irrigation Science* **20**, 115–125.
- González-Dugo V, Zarco-Tejada P, Berni JAJ, Suárez L, Goldhamer D, Fereres E. 2012. Almond tree canopy temperature reveals intra-crown variability that is water stress-dependent. *Agricultural and Forest Meteorology* **154**, 156–165.
- Galleguillos M, Jacob F, Prévot L, French A, Lagacherie P. 2011. Comparison of two temperature differencing methods to estimate daily evapotranspiration over a Mediterranean vineyard watershed from ASTER data. *Remote Sensing of Environment* **115**, 1326–1340.
- Guittou B, Kelner JJ, Velasco R, Gardiner SE, Chagne D, Costes E. 2012. Genetic control of biennial bearing in apple. *Journal of Experimental Botany* **63**, 131–149.
- Hackl H, Baresel JP, Mistele B, Hu Y, Schmidhalter U. 2012. A comparison of plant temperatures as measured by thermal imaging and infrared thermometry. *Journal of Agronomy and Crop Science* **198**, 415–429.
- Hamdy A, Ragab R, Scarascia-Mugnozza E. 2003. Coping with water scarcity: Water saving and increasing water productivity. *Irrigation and Drainage* **52**, 3–20.
- Heilman JL, McInnes KJ, Gesch RW, Lascano RJ, Savage MJ. 1996. Effects of trellising on the energy balance of a vineyard. *Agricultural and Forest Meteorology* **81**, 79–93.
- Idso SB, Aase JK, Jackson RD. 1975. Net radiation - soil heat flux relations as influenced by soil water content variations. *Boundary-Layer Meteorology* **9**, 113–122.
- Idso SB, Jackson RD, Pinter PJ, Reginato RJ, Hatfield JL. 1981. Normalizing the stress-degree-day parameter for environmental variability. *Agricultural Meteorology* **24**, 45–55.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). 2013. *Climate change 2013: the physical science basis. Summary for policymakers*. WMO: Geneva, Switzerland, 1–36.
- Jackson RD, Idso SB, Reginato RJ, Pinter PJ. 1981. Canopy Temperature as a Crop Water Stress Indicator. *Water Resource Research* **17**, 1133–1138.
- Jackson RD, Kustas WP, Choudhury BJ. 1988. A reexamination of the crop water stress index. *Irrigation Science* **9**, 309–317.
- Jones HG, Serraj R, Loveys BR, Xiong L, Wheaton A, Price AH. 2009. Thermal infrared imaging of crop canopies for the remote diagnosis and quantification of plant responses to water stress in the field. *Functional Plant Biology* **36**, 978–989.
- Jones HG, Stoll M, Santos T, de Sousa C, Chaves MM, Grant OM. 2002. Use of infrared thermography for monitoring stomatal closure in the field: application to grapevine. *Journal of Experimental Botany* **53**, 2249–2260.
- Koenker R. 2008. Censored quantile regression redux. *Journal of Statistical Software* **27**, 1–26.
- Koenker R, Bassett G. 1978. Regression quantiles. *Econometrica* **46**, 33–50.
- Lauri PÉ, Gorza O, Cochard H, Martinez S, Celton JM, Ripetti V, Lartaud M, Bry X, Trottier C, Costes E. 2011. Genetic determinism of anatomical and hydraulic traits within an apple progeny. *Plant, Cell and Environment* **34**, 1276–1290.
- Lebourgeois V, Bégué A, Labbé S, Houliès M, Martine JF. 2012. A light-weight multi-spectral aerial imaging system for nitrogen crop monitoring. *Precision Agriculture* **13**, 525–541.
- Lebourgeois V, Bégué A, Labbé S, Mallavan B, Prévot L, Roux B. 2008. Can commercial digital cameras be used as multispectral sensors? A crop monitoring test. *Sensors* **8**, 7300–7322.
- Liu BH, Cheng L, Ma FW, Zou YJ, Liang D. 2012. Growth, biomass allocation, and water use efficiency of 31 apple cultivars grown under two water regimes. *Agroforestry Systems* **84**, 117–129.
- Maes WH, Steppe K. 2012. Estimating evapotranspiration and drought stress with ground-based thermal remote sensing in agriculture: a review. *Journal of Experimental Botany* **63**, 4671–4712.
- Massonnet C, Costes E, Rambal S, Dreyer E, Regnard JL. 2007. Stomatal regulation of photosynthesis in apple leaves. Evidence for different water-use strategies between two cultivars. *Annals of Botany* **100**, 1347–1356.
- Masuka B, Araus JL, Das B, Sonder K, Cairns JE. 2012. Phenotyping for abiotic stress tolerance in maize. *Journal of Integrative Plant Biology* **54**, 238–249.
- McDowell N, Pockman WT, Allen CD *et al.* 2008. Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? *New Phytologist* **178**, 719–739.
- Mihailović DT, Lazic J, Lesny J, Olejnik J, Lalić B, Kapor D, Cirisan A. 2010. A new design of the LAPS land surface scheme for use over and through heterogeneous and non-heterogeneous surfaces: numerical simulations and tests. *Theoretical and Applied Climatology* **100**, 299–323.
- Mira M, Valor E, Boluda R, Caselles V, Coll C. 2007. Influence of soil water content on the thermal infrared emissivity of bare soils: Implication for land surface temperature determination. *Journal of Geophysical Research: Earth Surface* doi: 10.1029/2007JF000749
- Möller M, Alchanatis V, Cohen Y, Meron M, Tsipris J, Naor A, Ostrovsky V, Sprintsin M, Cohen S. 2007. Use of thermal and visible imagery for estimating crop water status of irrigated grapevine. *Journal of Experimental Botany* **58**, 827–838.
- Monclus R, Villar M, Barbaroux C *et al.* 2009. Productivity, water-use efficiency and tolerance to moderate water deficit correlate in 33 poplar genotypes from a *Populus deltoides* x *Populus trichocarpa* F1 progeny. *Tree Physiology* **29**, 1329–1339.
- Moran MS, Clarke TR, Inoue TR, Vidal A. 1994. Estimating crop water deficit using the relation between surface-air temperature and spectral vegetation index. *Remote Sensing of Environment* **49**, 246–263.
- Moran MS, Rahman AF, Washburne JC, Goodrich DC, Weltz MA, Kustas WP. 1996. Combining the Penman-Monteith equation with measurements of surface temperature and reflectance to estimate evaporation rates of semiarid grassland. *Agricultural and Forest Meteorology* **80**, 87–109.
- Naor A. 2006. Irrigation scheduling and evaluation of tree water status in deciduous orchards. *Horticultural Reviews* **32**, 111–165.
- Naor A, Naschitz S, Peres M, Gal Y. 2008. Responses of apple fruit size to tree water status and crop load. *Tree Physiology* **28**, 1255–1261.
- Prashar A, Yildiz J, McNicol JW, Bryan GJ, Jones HG. 2013. Infra-red thermography for high throughput field phenotyping in *Solanum tuberosum*. *PLoS One*, **8**, e65816. DOI:10.1371/journal.pone.0065816
- Rana G, Katerji N. 1998. A measurement based sensitivity analysis of the Penman-Monteith actual evapotranspiration model for crops of different height and in contrasting water status. *Theoretical and Applied Climatology* **60**, 141–149.
- Regnard JL, Segura V, Merveille N, Durel CE, Costes E. 2009. QTL analysis for leaf gas exchange in an apple progeny grown under atmospheric constraints. *Acta Horticulturae* **814**, 369–374.
- Rouse JW, Hass RH, Schell JA, Deering DW. 1973. Monitoring vegetation systems in the Great Plains with ERTS. In: *3rd ERTS Symposium*. NASA SP-351, I, 309–317.
- Roussel M, Dreyer E, Montpied P, Le-Provost G, Guehl JM, Brendel O. 2009. The diversity of ¹³C isotope discrimination in a *Quercus robur* full-sib family is associated with differences in intrinsic water use efficiency, transpiration efficiency, and stomatal conductance. *Journal of Experimental Botany* **60**, 2419–2431.
- Segura V, Cilas C, Laurens F, Costes E. 2008. Dissecting apple tree architecture into genetic, ontogenetic and environmental effects:

mixed linear modelling of repeated spatial and temporal measures. *New Phytologist* **178**, 302–314.

Šircelj H, Tausz M, Grill D, Batić F. 2007. Detecting different levels of drought stress in apple trees (*Malus domestica* Borkh.) with selected biochemical and physiological parameters. *Scientia Horticulturae* **113**, 362–369.

Tardieu F, Simonneau T. 1998. Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. *Journal of Experimental Botany* **49**, 419–432.

Thom AS, Oliver HR. 1977. Penmans equation for estimating regional evaporation. *Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society* **103**, 345–357.

Van De Griend AA, Owe M. 1993. On the relationship between thermal emissivity and the normalized difference vegetation index for natural surfaces. *International Journal of Remote Sensing* **14**, 1119–1131.

Vidal A, Devaux-Ros C. 1995. Evaluating forest-fire hazard with a Landsat TM derived water-stress index. *Agricultural & Forest Meteorology* **77**, 207–224.

Wang D, Gartung J. 2010. Infrared canopy temperature of early-ripening peach trees under postharvest deficit irrigation. *Agricultural Water Management* **97**, 1787–1794.

White JW, Andrade-Sanchez P, Gore MA *et al.* 2012. Field-based phenomics for plant genetics research. *Field Crops Research* **133**, 101–112.

Zarco-Tejada PJ, Berjón A, López-Lozano R, Miller JR, Martín P, Cachorro V, González MR, de Frutos A. 2005. Assessing vineyard condition with hyperspectral indices: Leaf and canopy reflectance simulation in a row-structured discontinuous canopy. *Remote Sensing of Environment* **99**, 271–287.

II. Imagerie multispectrale aéroportée au champ pour l'analyse des déterminismes génétiques relatifs à des traits morphologiques et de transpiration : application à une population hybride de pommier en réponse à la contrainte hydrique

Résumé :

- Le phénotypage de la réponse d'arbres adultes à la contrainte hydrique est limité par le bas débit des mesures et l'hétérogénéité du couvert. Dans cette recherche, l'objectif est de dépasser ces limitations en appliquant une nouvelle méthodologie consistant à utiliser l'imagerie multispectrale aéroportée pour comparer un grand nombre d'individus au champ. Les résultats sont mis en relation et complétés par des mesures *in planta*.
- Une population hybride de pommiers issue du croisement Starkrimson x Granny Smith et comprenant 122 hybrides a été soumise sur un même porte-greffe à des régimes hydriques différenciés pendant deux années. Les images aériennes acquises dans les bandes spectrales du visible, du proche infrarouge et de l'infrarouge thermique, à raison de trois dates par année, ont permis le calcul d'indices de végétation et de stress hydrique. La vigueur et la production de fruits de chaque arbre ont également été mesurées. L'analyse génétique a été conduite au moyen de modèles linéaires mixtes, en considérant les effets de la date et de l'année pour vingt-six variables phénotypiques, qui incluaient les réponses différentielles des génotypes en conditions irriguées ou de sécheresse.
- Les résultats montrent une valeur élevée de l'héritabilité (sens large) pour la plupart des variables, et dix-huit QTLs (quantitative trait loci) indépendants des dates ont été détectés sur neuf des dix-sept groupes de liaison de la carte génétique consensus du croisement étudié. La plupart de ces QTLs expliquent 15 à 20% de la variance. Pour quatre de ces zones QTL, plus particulièrement révélées par le stress hydrique, des gènes candidats putatifs impliqués dans la fermeture stomatique ont été identifiés.
- En conclusion, l'imagerie spectrale aéroportée s'avère être une méthode pertinente pour la recherche des déterminismes génétiques contrôlant les réponses des arbres adultes soumis à la contrainte hydrique au champ. Il est proposé que la voie de l'acide abscissique soit plus particulièrement étudiée pour de futures analyses fonctionnelles de ces réponses.

Multi-spectral airborne imagery at field opens the way to genetic determinism of morphological traits and transpiration behavior of an apple tree hybrid population in response to drought

Nicolas Virlet^{1a}, Evelyne Costes^{1b}, Jean-Jacques Kelner^{1a} and Jean-Luc Regnard^{1a*}

^{1a} Montpellier SupAgro, UMR AGAP 1334, TA-A-108/03, Av. Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5, France

^{1b} INRA, UMR AGAP 1334, TA-A-108/03, Av. Agropolis, 34398 Montpellier Cedex 5, France

Virlet Nicolas: virletnico@gmail.com

Costes Evelyne: costes@supagro.inra.fr

Kelner Jean-Jacques: kelner@supagro.inra.fr

***Corresponding author:** Regnard Jean-Luc: regnard@supagro.inra.fr

Tel/fax: +33 (0)4 67 61 75 04/ +33(0)4 67 61 55 96

Total word count: 6778

Introduction: 1227

Materials and Methods: 1991

Results: 1712

Discussion: 1796

Acknowledgments: 59

Tables 6 and Figures: 1

Supporting Information: 2 Tables and 1 Figure

Abstract

- Phenotyping adult tree response to water constraint for genetic studies is limited by the usual measurement throughput and plant heterogeneous cover. Here, we aimed at overcoming this bottleneck, applying a new methodology using airborne multispectral imaging and *in planta* measurements to compare a high number of individuals at field.
- 122 hybrids (Starkrimson x Granny Smith population), on a same rootstock, were submitted to contrasting summer water regimes over two years. Aerial images acquired in visible, near- and thermal-infrared at three dates each year allowed calculating vegetation and water stress indices. Tree vigor and fruit production were also assessed. Linear mixed models considered date and year effects on twenty-six variables, including the differential response of genotypes between control and drought conditions.
- Broad-sense heritability of most variables was high, and eighteen quantitative traits loci independent of the dates were detected on nine linkage groups of the consensus genetic map. Most QTL explained 15 to 20% of variance. Within four QTL zones revealed by stress conditions, putative candidate genes involved in the stomatal closure were identified.
- Airborne multispectral imaging was proved relevant to investigate the genetic control of adult tree response. Further functional analyses in apple tree will focus on abscisic acid pathway.

Keywords:

Multispectral image, *Malus x domestica*, drought tolerance, quantitative trait loci, candidate gene, vegetation index, surface temperature, tree vigor.

Introduction

According to current climate change models for the 21st century, increase in global mean temperatures is expected, with longer or more frequent episodes of extreme temperatures and drought, notably in the Mediterranean basin (IPCC, 2014). Climate change will lead to reconsideration of breeding programs for many crops, and optimization of water use by improving the plant water use efficiency (*WUE*) and/or the tolerance to drought will become an increasingly important issue (Hamdy *et al.*, 2003; Condon *et al.*, 2004). Although plant behavior in response to drought can be analyzed in terms of survival (McDowell *et al.*, 2008), it more usually refers to the ability of one genotype to yield better than another under more or less severe water constraints. Otherwise, while breeding programs in fruit species have not yet included drought tolerance among the targeted traits, some authors consider that tree response to water scarcity will become a crucial character to be considered (Bassett, 2013).

Plants have developed various mechanisms to cope with drought that depend on duration and intensity of the water constraint, and their responses occur at different temporal and spatial scales, from cell to whole tree level (Jones *et al.*, 2002). One first response to soil drought is the stomatal closure, an avoidance mechanism mediated by the abscisic acid (ABA) hormone. A main consequence of stomatal closure is the decrease in CO₂ influx and assimilation, which can lead to carbon depletion. When transpiration is reduced by stomatal closure, the outgoing water vapor flux and the latent heat dissipation are also reduced. Stomatal regulation thus induces an increase of leaf temperature with a risk of heat stress (Tardieu, 2005). Nevertheless, efficiency of stomatal regulation is variable according to species, and Tardieu & Simonneau (1998) have shown that plants display contrasted transpiration behaviors (isohydric vs anisohydric) in response to drought. At the intra-specific level, genetic variability of stomatal regulation has also been highlighted in different fruit species (Massonnet *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2012; Marguerit *et al.*, 2012).

As leaf or canopy temperature can be used as a proxy for stomatal conductance, thermal infrared (TIR) imagery appears as a powerful tool to reveal genetic variability of stomatal behavior (Jones *et al.*, 2009). Numerous indices have been developed to assess crop water stress from canopy surface temperature (T_s) data acquired in signal or imagery mode, from aerial platforms (satellites, aircrafts, unmanned aerial vehicles) or sensors installed directly at field to observe

crop canopies (White *et al.*, 2012). T_s minus air temperature (T_a) is a raw variable easy to extract from images, but it is sensitive to rapid change in environmental conditions as radiative conditions, wind speed and air vapor pressure deficit (Maes & Steppe, 2012). Otherwise, the presence of mixed soil–plant pixels is a recurring problem when TIR imagery is applied to phenotyping of heterogeneous covers (Jones *et al.*, 2009; Hackl *et al.*, 2012). It is generally considered that using directly the vegetation surface temperature is risky, because the weight of mixed or soil image pixels yielded in porous plant covers can create a shift towards the soil surface temperature (Jackson *et al.*, 1981). To overcome the limitations of environmental and soil influence on T_s , Moran *et al.* (1994) developed a Water Deficit Index (*WDI*) based on the Vegetation Index–Temperature (VIT) trapezoid concept, which is applicable to field crops with varying contributions of bare soil in the aggregated thermal pixels. This index is particularly suitable for estimation of transpiration rates on heterogeneous vegetation cover. It can be successfully related to the soil moisture and to the midday stem water potential (Köksal, 2008; Virlet *et al.*, 2014). Different authors indicated that the use of aerial vectors (ultralight aircraft or unmanned aerial vehicle) coupled with high resolution sensors enables to distinguish the individual trees within a plant grove, even in the TIR waveband where image resolution is lower (Berni *et al.*, 2009; Stagakis *et al.*, 2012). Moreover, the intra-crown variability of temperature can also be used as a complementary indicator of moderate water stress (González-Dugo *et al.*, 2012).

Apart from TIR imagery, plant cover can be characterized by different vegetation indices, based on the combination of spectral reflectances acquired in visible and near-infrared (NIR) wavebands (Zarco-Tejada *et al.*, 2005). These indices can possibly be acquired by broadband commercial sensors (Lebourgeois *et al.*, 2008). In the remotely-sensed image, reflectance in the Red band is affected by light absorption of leaf pigments (mainly chlorophyll a), while the NIR waveband is affected by the scattering in the medium (Zarco-Tejada *et al.*, 2005). Therefore, vegetation indices computed from Red and NIR, as the normalized difference vegetation index (*NDVI*), can be related to canopy structure and biomass production (Zarco-Tejada *et al.*, 2005) and also considered as indicator of vigor. However, *NDVI* is sensitive to low chlorophyll concentration (Peng and Gitelson, 2011) and it also presents saturation when leaf area index (*LAI*) is higher than 3 or 4. The use of other indices only retrieved from visible bands (e.g. the visible atmospherically resistant index, *VARI*) has shown a better sensitivity to higher values of

vegetation cover fraction. Some vegetation indices such as the simple ratio pigment index *SRPI* also enable characterization of the crop nitrogen status, being sensitive to change in the pigment relative content (chlorophyll vs carotenoids) (Peñuelas *et al.*, 1994, 1995).

Recent studies on field crops, e.g. in wheat (Babar *et al.*, 2006; Comar *et al.*, 2012), maize (Cairns *et al.*, 2012) and cotton (Andrade-Sanchez *et al.*, 2014), assessed potentiality of vegetation indices to be used for large-scale phenotyping. More generally, plant phenotyping based on multispectral or hyperspectral imagery shows promise as a non-invasive method adapted for screening a wide range of individuals in a short period of time. As such, this potentially high-throughput approach is compatible with next-generation sequencing technologies, and allows genome-wide and high-density genotyping developments. It will sustain the development of phenomics (Furbank & Tester, 2011; Fiorani & Schurr, 2013).

On fruit crops quantitative genetic analyses mostly concerned to date disease resistance, fruit yield and production regularity, and plant architecture (Segura *et al.*, 2008; Guitton *et al.*, 2012; Celton *et al.*, 2014). Few studies on genetic determinisms of traits related to water use have been undertaken in these crops except recently in grapevine (Marguerit *et al.*, 2012). Other perennials, like forest trees have been compared in natural environment (Brendel *et al.*, 2008) and in controlled environment (e.g., in *Salix*: Rönnberg-Wästljung *et al.*, 2005; in *Populus*: Street *et al.*, 2006) to distinguish a well-irrigated and water restriction conditions and to study the genetic bases of responses to drought and/or water use efficiency.

This study presents a genetic analysis performed on an apple segregating population submitted to contrasting water regimes, considering different traits mainly issued from airborne multi-spectral imagery. Experiment was conducted in two successive growing seasons. The image-based phenotypic variables and some agronomic traits such as fruit production or trunk diameter (a proxy for tree vigor) were analyzed for both well-watered and water stress conditions, as well as the difference between the water-stressed and well-watered conditions for a given genotype. For each image-based variable we considered the mean value of a representative tree crown zone and the variation within this zone. Correlations between variables were studied and broad sense heritability computed. Genetic determinisms of the traits were analyzed according to different genetic linear models in order to detect quantitative trait loci, and putative candidate genes within the QTL zones detected were investigated.

Material and Methods

Field experiments and meteorological measurements

The studied apple tree population consisted of progeny derived from a ‘Starkrimson’ x ‘Granny Smith’ cross, characterized by variability in tree vigor, architectural traits (Segura *et al.*, 2008), biennial bearing (Guitton *et al.*, 2012), hydraulic traits (Lauri *et al.*, 2011) and stomatal regulation in response to vapor pressure deficit (Regnard *et al.*, 2009). In February 2007, 4 replicates of 122 hybrids and their 2 parents were grafted onto M9 rootstock and randomly planted in an experimental field at the INRA Melgueil experimental station (Diaphen platform, southeast of France, N43°36, E03°58). Plantation consisted of 10 rows oriented northwest–southeast, with 5mx2m planting distances. The orchard management was performed consistently with professional practices, throughout the study. Automated soil resistivity profiling conducted in March 2009 showed that the soil of the trial plot (at depths of 0-50 cm and 50-100 cm) could be considered spatially homogeneous for water-holding capacity. The field plot was irrigated using a system of microsprayers located in the rows, with one emitter per tree. During summer, contrasting hydric regimes were established. Full irrigation was ensured in half of trees (2 replicates per genotype, well-watered trees, WW), while irrigation was withheld in the other half, resulting in progressive soil drought (2 replicates per genotype, water-stressed trees, WS) since the summer rainfall was negligible. Trees submitted to water restriction during summer were the same during the 2010 and 2011 seasons, and three dates per year were studied, representing various water regimes in order to disentangle genotypic and environmental effects in the tree response. Water regimes developed in WW and WS treatment are illustrated by the soil hydric potential mean values (Table 1a). Micrometeorological data acquired at field included global radiation (R_g), air temperature (T_a), air relative humidity (HR), air vapor pressure deficit (VPD), wind speed (u) and rainfall (Table 1a).

Image acquisitions

The image acquisition system of the ultra-light aircraft consisted of two commercial digital cameras (either Canon Eos 400D or 500D, with 10.1 and 15.1 Megapixel CMOS sensors, respectively, Table 1b) equipped with 35-mm lenses, and one FLIR B20HSV (FLIR Systems Inc., Wilsonville, USA) thermal infrared camera (320*240 matrix) (see for details: Lebourgeois *et al.*, 2008, 2012; Virlet *et al.*, 2014). One camera acquired visible images in Red, Green and Blue bands (RGB). The second was modified according to Lebourgeois *et al.* (2008, 2012) to obtain images in the Near Infrared (NIR). Three flights per year were performed during the summers of 2010 and 2011 (Tables 1a and 1b). In 2010, flights were realized for low, intermediate and severe water constraints, respectively 8, 27 and 41 days after the beginning of drought (Dates 1, 2 and 3). In 2011, the first flight (Date 4) occurred 17 days before the beginning of the drought period, before WW and WS differentiation, while the second and third flights (Dates 5 and 6) were performed respectively 14 and 34 days after the beginning of the drought treatment. During the period of water deprivation (i.e., at Dates 1, 2, 3, 5 and 6) WS trees were not irrigated.

Spectral image preprocessing and indices computation

Image preprocessing was performed with Erdas Imagine 9.3 software (Intergraph Corporation, Huntsville, USA). Procedure of ortho-rectification for RGB and NIR images and radiometric normalization on invariant field targets between dates are fully described in Lebourgeois *et al.* (2008, 2012) and Virlet *et al.* (2014), as well as image geolocation. Thermal infrared images issued from the 6 acquisition dates were ortho-rectified on the base of both the RGB and NIR images and geo-located as well. For each of the 6 dates, difference between the canopy surface and air temperature (hereafter referred to as T_sT_a) was obtained by subtracting from each pixel value of the TIR images the air temperature acquired at ground level. Spatial resolution of RGB and NIR images was lowered from initial resolution (ca. 3 to 5 cm) to that of TIR image (30 cm). From RGB and NIR bands, three vegetation indices were computed: *NDVI*, *VARI* and *SRPI* (Table 2). *NDVI* and T_sT_a were used to compute the water deficit index (*WDI*) as described in Virlet *et al.* (2014). This index enabled an estimation of relative evapotranspiration of vegetation

cover, taking account of the crop cover fraction represented by a vegetation index. The value of WDI is normalized between the left and right boundaries of the $T_s T_a / NDVI$ scatterplot, ranging from 0 for a well-watered crop transpiring at the maximum rate to 1 for a severely water-stressed, non-irrigated crop (Moran *et al.*, 1994).

For each tree, multispectral-based index values were extracted from a 60cm radius buffer zone located at the center of tree, where canopy was the densest. Each buffer contained 12 to 16 pixels. From each buffer zone, mean and standard deviation were retrieved and considered as two different variables characterizing the vegetation cover of individuals. Standard deviation values indicated the variation occurring inside the buffer zone and the degree of heterogeneity of the canopy structure for vegetation index and of variability of transpiration rates for stress indices. The phenotypic mean values of each variable are presented in supplementary materials (Table S1).

In situ crop measurement

Trunk circumference (TC) of each tree was tape-measured 15 cm above the grafting point each year in February. On that basis, the trunk cross sectional area ($TCSA$) considered as representative of tree vigor was computed as follows: $TCSA = TC^2 / 4 \pi$. Fruits were harvested each year between August 22 and September 2 before the resumption of irrigation, irrespective of the real maturity picking date (September). The number of fruits per tree and the harvest fresh mass (kg/per tree) were determined. The phenotypic mean values of each variable are presented in supplementary materials (Table S1).

Data analyses

Statistical analyses were performed using R software v.2.13.2. (R Development Core Team, 2011). For each variable, phenotypic means were computed from mean and standard deviation values obtained from each tree for (i) WW and WS conditions confounded, (ii) WW and WS considered separately and (iii) the difference between WS and WW trees, hereafter referred as to differential index (DI). For example, the phenotypic mean value of $NDVI$ independently of water

treatment was *NDVI*, while the phenotypic mean value of standard deviation value in WS condition was *sdNDVI_WS*.

For each variable, two mixed linear models were built. The first one was used to analyze the effect of variables in both WW and WS trees. The second one was used to analyze the drought response of each genotype, through the DI obtained. The first mixed linear models included the irrigation modality (M), date (D) or year (Y), which were considered as fixed effects, while the genotype (G), the interactions between genotype and irrigation modality (GxM), and genotype and date or year (GxD or GxY) were considered as random effects. For each variable, a selection of the best model was performed through minimization of the Bayesian Information Criterion (BIC). For the differential index (DI), effects considered in the mixed linear model were the same as mentioned above, but without M and GxM. For each trait, best linear unbiased predictors (BLUPs) were extracted for estimation of the G effect, which was considered as independent from the irrigation modality and the date (or year) of experimentation and is hereafter referred to as G-Blup. For GxM and GxD (or GxY) interaction effects, the corresponding BLUPs were computed for each irrigation regime (WW- or WS-Blup), and date (or year) considered separately.

For each variable, when G and interaction effects were included, broad-sense heritability of the mean (h^2_b) was estimated as the ratio between the genotypic variance and the total variance. Phenotypic variable was considered heritable if its h^2_b value was greater than 0.2. When a GxM interaction was included in the model, the heritability was calculated as follows:

$$h^2_b = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_G^2 + \frac{\sigma_{GxM}^2}{n_M} + \frac{\sigma_\epsilon^2}{n*n_M}}$$

Where n is the number of trees per genotype (2 in the present case), and n_M the number of irrigation modalities (2 in the present case). When a GxD (or GxY) interaction was included in the model, the denominator also integrated GxD (or GxY) variances and was divided by the number of dates (6) or years (2). The residual variance σ_ϵ^2 was divided by the product of the number of trees per genotype and per irrigation modality and the number of dates (or years).

QTL mapping

The QTL analysis was performed using means and BLUPs extracted per genotype for each variable. A consensus genetic map of STK and GS, which integrated 177 SSR and SNP genetic markers scattered over the 17 linkage groups (LGs), was used for QTL mapping. Details on the origin of SSR and SNP markers and map construction are given in Guitton *et al.* (2012). QTL analyses were carried out using MapQTL[®] 6.0 (Van Ooijen, 2009). First, a permutation test was performed to determine the logarithm of the odds (LOD) threshold at which a QTL was declared significant, using a genome-wide error rate of 0.05 with 1,000 permutations of the data (Van Ooijen, 2009). In a second step, an interval mapping analysis was carried out with a step size of 1 cM to detect potential genomic regions associated with the trait, with a LOD score higher than the threshold. Finally, the nearest marker to each QTL peak was selected as a cofactor to perform a multiple QTL mapping (MQM), with a step size of 1 cM (Van Ooijen, 2009). Each significant QTL was characterized by its LOD score, its percentage of explained phenotypic variation, and its confidence interval (in cM) corresponding to a LOD score drop of 1 or 2 on either side of the likelihood peak. QTLs which showed clearly overlapping confidence intervals, close LOD peaks and similar allelic effects, were considered to co-localize. Allelic effects were estimated as $A_f = [(\mu_{ac} + \mu_{ad}) - (\mu_{bc} + \mu_{bd})]/4$ for female additivity, $A_m = [(\mu_{ac} + \mu_{bc}) - (\mu_{ad} + \mu_{bd})]/4$ for male additivity, and $D = [(\mu_{ac} + \mu_{bd}) - (\mu_{ad} + \mu_{bc})]/4$ for dominance, where μ_{ac} , μ_{ad} , μ_{bc} and μ_{bd} are the estimated phenotypic means associated with each of the four possible genotypic classes ac, bc, ad and bd, deriving from an ab x cd cross.

When a multi-locus QTL was detected with at least two cofactors, models considering markers and their interactions as cofactors were constructed using a backward procedure under R software v2.13.2. Models were selected based on the minimum Akaike Information Criterion values (AIC). In the selected model, the significance of each factor and the global percentage of phenotypic variation (global R^2) were then estimated. When one marker was derived from only one of the parents, the nearest marker included in the QTL and deriving from both parents was chosen. The location of QTLs on the genetic maps and the confidence intervals based on the peak LOD-1 and LOD-2 intervals were finally illustrated using MapChart[®] (Voorrips, 2001).

Candidate gene mapping

An exhaustive *in silico* inventory of drought-related genes in apple was performed in order to establish a list of candidate genes that are possibly involved in the drought response. Four QTL zones located on 03, 05, 06 and 10 LGs were examined, where determinisms for WS conditions or for the differential index were revealed.

Nucleic sequences of QTLs markers were positioned within the ‘Malus_x_domestica.v1.0’ whole-genome sequence (Velasco *et al.*, 2010) using the GDR “NCBI BLAST” tool (blastn; www.rosaceae.org/tools/ncbi_blast) against the Apple Genome V1.0 contigs. List of *Malus* genes inside the QTL zones and their homologies with Arabidopsis loci were found in the GDR data file “Malus_x_domestica.v1.0_gene_pep_tair_blastp_100510.formated.xls” (Jung *et al.*, 2013). The gene ontologies for biological processes possibly involved in abiotic stress response were retrieved using the list of identifiers on TAIR website (www.arabidopsis.org/tools/bulk/go/index.jsp). Among the large number of genes in the QTL zones, focus was put on Transcription Factors and ABA biosynthesis or signaling in response to soil water constraint. The number of copies of candidate genes were found in the above-mentioned GDR data file using the Arabidopsis homolog identifier.

Results

- Variance analysis and heritability

Models selected for vegetation indices were similar whether means or standard deviations were considered (Table 3a). All vegetation indices were significantly impacted by G, D and M effects. For *NDVI*, the model included only the GxM interaction, whereas for *VARI*, *SRPI*, *TsTa* and *WDI* variables GxM and GxD interactions were also taken into account. Concerning the tree related variables, the models selected included G and Y effects. For tree vigor, expressed by *TCSA*, only the GxM interaction was retained in the mixed linear model, while the GxY interaction was retained for *NbFr* and both GxM and GxY interactions for *BmFr*. For all DI variables (Table 3b) the linear mixed models selected included G and D effects. GxD was also included for

sdVARI_DI, *sdSRPI_DI*, *sdTsTa_DI* and *GxY* was included for *NbFr_DI* only. It is noticeable that the random interaction effects (*GxM* and/or *GxD*) were generally lower than the *G* effects.

Broad sense heritability h^2_b , computed from variance components in the mixed linear models for both WW and WS conditions (Table 3a), showed medium to high values (0.49 to 0.77) except for *sdWDI* and *BmFr* whose heritability was low (0.31). For DI variables (Table 3b), fairly high h^2_b values (0.50 to 0.70) were found for *NDVI*, *sdVARI*, *SRPI*, *sdSRPI*, *TsTa*, *sdTsTa* and *TCSA*, although values for the other variables, including *WDI_DI*, heritability was much lower (0.17 to 0.38) than that found for WW and WS. Moreover, higher h^2_b values were found in *VARI_DI*, *SRPI_DI*, and *TsTa_DI* for sd values than for mean values.

- Correlations between variables

High pairwise positive correlations were observed between *NDVI*, *VARI* and *SRPI* for the genotypic mean values, in WW and WS conditions and for DI (Pearson's *r* from 0.45 to 0.88, Table 4), even though lower *r* values were found between *VARI* and *SRPI* for the genotypic mean values and WW condition (Tables 4a,b). These three variables were significantly and negatively correlated with *sdNDVI* and *sdSRPI* for the genotypic mean values, in WW and WS conditions and for DI (from -0.46 to -0.66, Table 4), despite much lower correlation was found between *sdNDVI* and these variables for DI (from -0.06 to -0.32, Table 4d). Also, *sdNDVI*, *sdVARI* and *sdSRPI* presented pairwise positive correlations for the genotypic mean values and WW condition (0.33 to 0.88, Table 4a, b). In WS condition and for DI, only *sdSRPI* was significantly correlated with *sdNDVI* and *sdVARI* (0.74 and 0.42 respectively, Table 4c, d). *WDI* was highly and positively correlated with *sdWDI* (0.49 to 0.52). The trunk diameter variable, *TCSA*, presented generally moderate to high positive correlations with *NDVI*, *VARI* and *SRPI*. The highest correlation was observed with *NDVI*, either for mean values, in WW and WS conditions, or for DI (0.55 to 0.67). Variables relative to fruit production, *NbFr* and *BmFr*, were highly inter-correlated (0.75 to 0.85), and a high positive correlation of these variables with *TCSA* was also observed, particularly for *BmFr* (from 0.50 to 0.55). Moreover, *BmFr* was positively and more highly correlated to *NDVI*, *VARI* and *SRPI* (0.23 to 0.52) than *NbFr* (0.13 to 0.32) for mean, WW and WS.

- QTL detection

Seventy-four QTLs were detected, mapping over sixteen of the seventeen LGs of the consensus STKxGS genetic map. As fifty-six of these QTLs were located on LGs 1, 4, 7, 11, 12, 14, 15, 16 and 17, and found only at specific dates, they are not detailed in the following text. The complete list of QTL detected is shown as Supplementary material (Table S2 and Fig. S1).

The results presented hereafter (Fig. 1, Table 5) are focusing on the eighteen most reliable QTLs that were mapped over nine LGs. These QTLs were detected for genetic BLUPs (G-Blup) or for genetic means (G-mean) and in some cases, for both, whatever the date.

QTLs for traits related to vegetation indices: NDVI, VARI and SRPI

For the G-Blup of *NDVI* and *SRPI* variables, three QTLs were detected independently of the environment (water regime or date): two QTLs concerned *sdNDVI* and *sdSRPI* and presented a common zone located between the markers CH02g09_SG and CH05a02y_G on LG08. They explained 14.2% and 15.8% of the variability, respectively, and were both characterized by female allelic effects. One QTL for *SRPI* was detected on LG09 and explained 14.3% of the variability. It showed female, male and dominance effects.

Four QTLs were detected for specific G-means in WW conditions on four different LGs. Two of these QTLs, related to *NDVI_WW* and *SRPI_WW*, were detected on LG14 and LG09, respectively. They explained 14.9% and 15.7% of the variability, and both of them resulted both from female, male and dominance effects. Two other QTLs, related to *sdVARI_WW* and *sdSRPI_WW*, were mapped on LG01 and LG08, and resulted from dominance and female effects, respectively. The QTL for *sdVARI_WW* was also identified for G-Blup.

In WS conditions, one QTL was identified for *sdNDVI_WSat* at the top of LG06. It explained 14.1% of the variability and mainly resulted from female effect. For the differential index DI, one QTL was detected for *VARI_DI* and mapped at the bottom of LG03 for both G-Blup and G-mean. It explained 14.7% of the variability and resulted from female, male and dominance effects.

QTLs for traits related to canopy transpiration

One QTL was detected for *WDI* in WW condition, at the top of LG03 for both G-Blup and G-mean. It explained 14.7% of the variability and was characterized mainly by female and male effects. Finally, two QTLs were detected for *TsTa_2_DI* (at date 2) on LG05 and LG06, respectively. The global linear model indicated an interaction between these two QTLs, which together explained 20.8% of the variability. They mainly resulted from female and male effects. The QTL which mapped on LG06 co-localized with QTL of *sdNDVI_WS* (in WS condition).

QTLs for traits related to tree vigor (TCSA) and fruit production (NbFr and BmFr)

Two QTLs were detected in relation to the tree vigor, the first one for *TCSA_WS*, and the second one for *TCSA_DI*. Both mapped on LG10 and co-localized near the *MdVRN1b_S* marker. These QTLs respectively explained 14.5% and 15.4% of the variability and mostly resulted from female allelic effects. For fruit number, one QTL was detected in WW condition (*NbFr_WW*) at the bottom of LG13. It explained 19.6% of the variability. Another QTL was detected for *NbFr_DI* at the same position, explaining 17.8% of variability. These two QTLs mainly resulted from male allelic effect. Finally, two QTLs were found at the top of LG05 for *NbFr_WS* and *BmFr_WS*. They explained 15.6% and 15.9% of the variability, respectively, and both resulted from female and dominance effects. Interestingly, these two QTLs co-localized with the QTL identified for *TsTa_2_DI*.

- Putative Candidate genes identified by *in silico* mapping

Four QTL regions were selected and screened for identification of putative candidate genes (Table 6). These regions concerned QTLs that were detected in water stress conditions (WS) as well as for the genotype response to water restriction (DI). Focus was put on genes relative to ABA biosynthesis and ABA transduction signal under drought conditions, both likely related to regulation of stomatal movement.

The first genomic region investigated was located at the bottom of LG03 between the markers *Hi07e08y_SG* and *CH03g12y_SG* for *VARI_DI*. It spanned nearly 3Mb and included 539 distinct genes matching with 207 loci of *A.thaliana*. Within this zone, four putative genes coding

transcription factors (TF) were identified one MYB12, two DELLA proteins, RGL1 and RGL2, repressors of gibberellins and possibly involved in reduction of oxidative stress, through superoxide dismutase transcription, and one WRKY35, which is known as highly induced in drought. For two of them, RGL2 and WRKY, almost one half and exactly one half of gene copies over the total apple genome copies were present within this QTL zone, with proportions of 3/7 and 1/2 respectively. One copy of Erecta-Like 2 (ERL2, AT5G07180) gene, among the four present in the apple genome, was also identified within this zone.

The second genomic region investigated was comprised between the Hi09b04_G and CH03a09_SG markers, at the top of LG05. It spanned about 3Mb and included 499 distinct gene models for 283 loci of *A. thaliana*. Inside this zone, two genes were identified, coding the TF ethylene-responsive element binding factor ERF2 and the salt tolerance protein STO. Three putative genes for Calcineurin B-like protein-interacting protein kinases (CIPK) were also found, and particularly CIPK23, whose 3 copies of the apple genome are located in this zone. Moreover, the two gene copies coding for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED5) and for a Jasmonate-ZIM-domain protein (JAZ7) were also found among the genes located within this QTL confidence interval.

The third QTL zone was located between the HB09TC_S and MdVRN2.1_SG markers on LG06. It covered about 3.3Mb, including 322 gene models corresponding to 143 loci in *A. thaliana*. Within this zone, genes coding two TF were identified, with AtMYB9 and MYC2 that are responding to ABA signal. Among the seven copies of neoxanthin synthase (ABA4) genes found on the apple genome by sequence blast, three copies were identified in this zone. Moreover, members of PYR/PYL/RCAR family (PYR1) and of serine/threonine protein kinase family (OST1/SnRK2.6), which both played an important role in ABA signal perception and transduction in guard cell, were also identified. Both presented one gene copy in this zone among the two and the four of the apple sequence, respectively. A gene coding a calcium ion binding protein (CBL1) was also found within this QTL zone, with two copies among the three present in the apple genome.

The last region investigated was located on LG10 between the markers CH02a08y_SG and CH02c11_SG. This large genomic region, which also contains the MdVRN1b_S marker, spans 7.7Mb and contains 914 gene models corresponding to 356 loci in *A. thaliana*. In this region, two

genes coding ATP-binding cassette transporters (ABC) related to abiotic stress and ABA signal transduction, AtMRP5 and PDR12, and two potassium channels related to stomatal movement, PKT3 and PKT4, were identified. Genes for AtMRP5, PKT3 and PKT4 presented respectively one among three, seven among eleven copies, and the only copy identified on the whole apple genome. Within this zone on LG10, putative genes for protein phosphatase PP2C and ABA hypersensitive 1 ABH1, playing a role in ABA regulation signal, were found. Moreover, a gene for calcium dependent kinase CPK6 was also identified.

Discussion

Recent studies have raised the possible contribution of imagery to overcome the bottleneck of high-throughput phenotyping. However, few studies allowed QTL analysis and those dedicated to perennial woody plants remain scarce. The present study provides new insights on the feasibility of analyzing the response to drought of an apple segregating population at field through phenotypic variables based on remotely-sensed multispectral imagery. It highlights the existence of genetic determinants of behavioral traits in apple, including vegetation indices and water stress indicators, together with integrative agronomic traits.

Variability of the phenotypic traits

Due to the differences in environmental conditions and imagery flight parameters on the one hand, and the difficulty to apply comparable water constraints from one year to another on the other hand, the analysis of the population behavior undertaken through linear mixed model had to take account of the large variability of phenotypic traits. Among vegetation indices, *NDVI* appeared the most stable vegetation index, independently of the environment and acquisition conditions (no GxD interactions), whereas the set of spectral indices chosen proved to be sensitive to drought, with a GxD interaction revealed for *VARI*, *SRPI*, *TsTa* and *WDI*. By contrast, the absence of GxD interaction for mean values and for the differential index (DI),

suggested that the use of the difference between water-stress and well-irrigated trees somewhat smoothed out the inter-date variations.

To our knowledge, this study is the first making use of spectral indices in order to analyze genetic variability in perennial plants. As a consequence, comparisons in the ensuing discussion are often referring to studies that have been realized in annual crops. In the present study, the vegetation indices used were extracted from a buffer zone of the same size within each tree. As such, their value must be considered as mostly related to the vegetation cover fraction and biomass production rather than to their physiological properties. Whatever the traits considered, either relative to vegetation, or to transpiration, moderate to high values of broad-sense heritability were found showing an interesting contribution of multi-spectral imagery for further genetic traits analysis in a tree population. Concerning the vegetation indices, our results were consistent with those found in annual crops, where high heritability values were also found (e.g. in wheat: Babar *et al.*, 2006, in cotton: Andrade-Sanchez *et al.*, 2014). Heritability values found for agronomic traits in apple, *TCSA*, *NbFr* and *BmFr*, were in the same order of magnitude as spectral indices. When heritability was computed for the DIs, values stayed high for most variables, except for *WDI_DI* probably because of the composed nature and complexity of this trait. Concerning *TsTa* and *TsTa_DI*, high heritability values were found consistent with previous results found in wheat (Mason *et al.*, 2013; Rebetzke *et al.*, 2013), even though some more contradictory results have been observed in cotton (Andrade-Sanchez *et al.*, 2014).

QTL detection, co-localization and trait correlations

Positive correlations between the vegetation indices, *TCSA* and also fruit production were observed. In particular *NDVI* exhibited the highest correlation with the trunk diameter, *TCSA*, and with fruit yield biomass, *BmFr*. As well as *NDVI*, *TCSA* was generally related to plant size, leaf area, light interception and vigor (Gonzalez-Talice *et al.*, 2012), which suggests that *NDVI* is a good indicator of vigor and development in apple trees. However, QTLs found for vegetation indices, fruit yield and *TCSA* did not co-localize, and this indicated that genetic determinants could act differently in controlling these traits. Otherwise, while vegetation indices presented high and positive inter-correlations, QTLs did not co-localize for these traits. Indeed, QTLs for

NDVI and *SRPI* were mostly detected on two different LGs, LG14 and LG09, respectively. This could be explained by the wavebands used: the first vegetation index, computed from NIR is more related to canopy structure than the second one, computed only from visible bands, which is more related to light absorption (Zarco-Tejada *et al.*, 2005; Lebourgeois *et al.*, 2012). As a result, the QTL found for *VARI_DI*, which highlights difference between WS and WW tree responses, suggests that drought could affect the radiation absorption capacity.

Intra-canopy variations of vegetation indices, *sdNDVI* and *sdSRPI*, presented high and negative correlations with means of *NDVI* and *SRPI*, and were not correlated with *TCSA*. This indicates that the highest density of vegetation was less variable than the lowest, but also that the vegetation heterogeneity was independent from tree vigor. In contrast, intra-tree variability could be an indicator of branching patterns or leaf clumpiness (Da Silva *et al.*, 2014), and this would need further investigations. The QTL detected for *sdNDVI_WS* could be attributed to the variation of leaf rolling between genotypes in response to drought, a phenomenon also observed in other species (e.g. maize: Lu *et al.*, 2011). Furthermore, *sdNDVI* and *sdSRPI* were strongly correlated and QTLs for these variables co-localized at the middle of the LG08. The location of these QTLs also matched with a QTL zone for traits involved in gas exchange, xylem conductance and fruit production on the STKxGS population (Regnard *et al.*, 2009; Lauri *et al.*, 2011, Guitton *et al.*, 2012). These co-localizations could be explained by an increased capacity of the plant to transport water, carbohydrates and sugar to the growing organs, as suggested by Lauri *et al.* (2011). Nonetheless, they might also be explained by a pleiotropic effect of these QTLs, or by clustering of functionally related genes (Cai & Morishima, 2002). Gene clusters have already been reported in apple for various traits such as resistance to pathogens (Xu & Korban 2002; Baldi *et al.*, 2004). However, discriminating between linked and pleiotropic QTLs was not practicable in the present study, considering the limited population size and the genetic map density.

In addition, QTLs for fruit production in WS trees (*NbFr_WS* and *BmFr_WS*) and for leaf temperature (*TsTa_2_DI*) co-localized on LG05. Although matching for those traits was only temporary, i.e. when difference between WW and WS treatments was considered at date 2 for *TsTa* (*TsTa_2_DI*), it illustrates the negative link between plant yield and canopy temperature (Naor & Girona, 2012). Indeed, the increase in leaf temperature in WS trees is an indicator of

lower transpiration rate and likely of lower carbon assimilation. Reduction of stomatal conductance in WS trees could likely be invoked for limitation of fruit production in this case because water constraint was severe (no irrigation occurred during summer period). Such a causal relation between water withholding and its effect on yield reduction is not straightforward in fruit trees (Bassett, 2013), particularly when a moderate water deprivation is applied during stages of low fruit growth (Goodwin & Boland, 2002). The strongest water deprivation impact on fruit production was also revealed by the QTL identified on LG13, which exhibited the highest percentage of variance explained.

One QTL was detected for *WDI_WW* on LG03. However, unlike *TsTa*, no colocalization was found between *WDI* and fruit production. Moreover, genetic correlations during the two years of study (Table 4) were not significant, whereas significant negative correlations were observed ($r = -0.53$ and -0.55 with *NbFr* and *BmFr*, respectively, data not shown) only when the year 2011 was considered. This could be attributed to propensity to biennial fruit bearing already shown on this progeny (Guitton *et al.*, 2012).

It has been recently demonstrated that *Malus x domestica* cultivars are exhibiting a wide range of tolerance to drought (Bassett, 2013), but available information on the parental genotypes used in the present study are scarce. Gonzalez-Talice *et al.* (2012) suggested that ‘Granny Smith’ cultivar has a lower hydraulic conductance and/or stomatal conductance than that of ‘Gala’ cultivar, indicating a stronger sensitivity of the former to high evaporative demand. On the opposite, the ‘Starkrimson’ cultivar is well known for its photosynthetic efficiency (Yang & Wang, 1993), while its response to drought is not documented. In the present study, prevailing female allelic effects were found for almost all variables, suggesting a larger polymorphism and allelic contrast in ‘Starkrimson’ parent than in ‘Granny Smith’. ‘Starkrimson’ could thus provide interesting alleles for adaptation to drought, even though other genetic backgrounds must be explored in the next future.

Candidate genes identification involved in the drought response

As described in Celton *et al.* (2014), the practicability of our candidate gene approach is limited by reliance on the first version of the apple genome used, which indicated that 15% of the

contigs might be misplaced on the “Golden Delicious” genome. Consequently, our identification of putative candidate genes needs further investigation. While not exhaustive, the research of candidate genes was focused on those related to abscisic acid pathway responsible for controlling stomatal regulation under water constraints. This research was conducted on QTLs detected for WS conditions and for DI on LG03, LG05, LG06 and LG10. Although one QTL for *NbFr_DI* was detected at the bottom of LG13, this zone was not considered further due to inaccuracy of markers position.

Among the QTLs investigated, several genes governing the different steps of ABA signal under drought were identified. Two genes, ABA4 and NCED5, enabling the switch from the xanthophyll cycle to ABA biosynthesis (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013) were identified in apple. Moreover genes which formed the core of the early ABA signaling cascade in guard cell (Daszkowska-Golec & Szarejko, 2013) were also present under the QTL zones analyzed. Indeed, among the genes identified, PYR/PYL/RCAR, PP2C, ABH1, OST1/SnRK2.6 are known as modulating the ABA transduction signal leading to stomatal closure. Various genes involved in guard cell turgor and sensitive to ABA signaling were also found. In particular, a copy of Erecta-like 2 (ERL2, AT5G07180), a gene involved in the stomatal development (Masle *et al.*, 2005) and previously detected in grapevine (Marguerit *et al.*, 2012), was identified on LG03. It should be noted that genes coding for ERL2, ABH1 and OST1, previously found when controlled conditions are applied to grapevine (Marguerit *et al.*, 2012), for traits relative to transpiration and $\delta^{13}C$, have also been found in field conditions on apple tree, on the basis of image-based and fruit production traits.

This study constitutes a first step for genetic analysis of traits derived from airborne imaging for the assessment of response of an apple tree progeny to water deficit at field. Results showed that spectral indices were sufficiently sensitive to reveal genetic variability of the population, and to enable QTL detection. The use of mixed linear model has allowed taking into account the different flight acquisition data and the different environmental conditions. Indeed, QTLs found were detected independently from the acquisition dates. The four QTL zones identified for the water stress condition and the differential index exhibited several key genes putatively involved in drought response through the abscisic acid biosynthesis or transduction signal ending with

stomatal closure. This study opens new avenues for analyzing a first set of candidate genes and is a contribution to future selection of innovative plant material for woody plant response to drought.

Acknowledgments

We thank S. Feral, T. Colonges, R. Marty, A. Jolivot for their contributions to the establishment of the experiment and the field measurements. We also thank the Avion Jaune® Company, V. Lebourgeois (Cirad) and S. Labbé (IRSTEA) for their expertise in airborne imagery. The PhD scholarship of Nicolas Virlet was granted by Montpellier SupAgro and the Languedoc-Roussillon Region.

Supporting Information

Table S1. Values of traits (mean and standard deviation) investigated in well-watered (WW) or water-stressed conditions (WS) and for the differential index (DI: WS-WW).

Table S2. Total significant QTLs detected for all variables in well-watered (WW) and/or water-stress conditions (WS) and for differential index DI (WS-WW).

Fig. S1. Total significant QTLs detected on the consensus ‘Starkrimson’x‘Granny Smith’ (STKxGS) map.

References

- Andrade-Sanchez P, Gore MA, Heun JT, Thorp KR, Carmo-Silva AE, French AN, Salvucci ME, White JW. 2014.** Development and evaluation of a field-based high-throughput phenotyping platform. *Functional Plant Biology* **41**: 68-79.
- Babar MA, van Ginkel M, Klatt A, Prasad B, Reynolds MP. 2006.** The potential of using spectral reflectance indices to estimate yield in wheat grown under reduced irrigation. *Euphytica* **150**: 155-172.
- Bassett CL. 2013.** *Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture*. InTech, doi: 10.5772/55537
- Baldi P, Patocchi A, Zini E, Toller C, Velasco R, Komjanc M. 2004.** Cloning and linkage mapping of resistance gene homologues in apple. *Theoretical and Applied Genetics* **109**(1): 231-239.
- Berni JAJ, Zarco-Tejada PJ, Sepulcre-Cantó G, Fereres E, Villalobos F. 2009.** Mapping canopy conductance and CWSI in olive orchards using high resolution thermal remote sensing imagery. *Remote Sensing of Environment* **113**: 2380-2388.
- Boursiac Y, Leran S, Corratge-Faillie C, Gojon A, Krouk G, Lacombe B. 2013.** ABA transport and transporters. *Trends in Plant Science* **18**(6): 325-333.
- Brendel O, Le Thiec D, Scotti-Saintagne C, Bodénès C, Kremer A, Guehl J-M. 2008.** Quantitative trait loci controlling water use efficiency and related traits in *Quercus robur* L. *Tree Genetics & Genomes* **4**, 263-278.
- Cai HW, Morishima H. 2002.** QTL clusters reflect character associations in wild and cultivated rice. *Theoretical and Applied Genetics* **104**(8): 1217-1228.
- Cairns JE, Sanchez C, Vargas M, Ordonez R, Araus JL. 2012.** Dissecting Maize Productivity: Ideotypes Associated with Grain Yield under Drought Stress and Well-watered Conditions. *Journal of Integrative Plant Biology* **54**(12): 1007-1020.

- Celton J-M, Kelner J-J, Martinez S, Bechti A, Khelifi Touhami A, James MJ, Durel C-E, Laurens F, Costes E. 2014.** Fruit self-thinning: a trait to consider for genetic improvement of apple tree. *PLoS ONE* **9**(3): e91016.
- Chen ZZ, Hong XH, Zhang HR, Wang YQ, Li X, Zhu JK, Gong ZZ. 2005.** Disruption of the cellulose synthase gene, *AtCesA8/IRX1*, enhances drought and osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **43**(2): 273-283.
- Cheong YH, Pandey GK, Grant JJ, Batistic O, Li L, Kim BG, Lee SC, Kudla J, Luan S. 2007.** Two calcineurin B-like calcium sensors, interacting with protein kinase CIPK23, regulate leaf transpiration and root potassium uptake in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **52**(2): 223-239.
- Condon AG, Richards RA, Rebetzke GJ, Farquhar GD. 2004.** Breeding for high water-use efficiency. *Journal of Experimental Botany* **55**: 2447-2460.
- Comar A, Burger P, de Solan B, Baret F, Daumard F, Hanocq JF. 2012.** A semi-automatic system for high throughput phenotyping wheat cultivars in-field conditions: description and first results. *Functional Plant Biology* **39**(10-11): 914-924.
- Da Silva D, Han L, Faivre R, Costes E. 2014.** Influence of the variation of geometrical and topological traits on light interception efficiency of apple trees: sensitivity analysis and metamodelling for ideotype definition. *Annals of Botany* **114**(4): 739-752.
- Daszkowska-Golec A, Szarejko I. 2013.** Open or close the gate - stomata action under the control of phytohormones in drought stress conditions. *Frontiers in Plant Science* **4**, 138.
- Fiorani F, Schurr U. 2013.** Future scenarios for plant phenotyping. *Annual Review of Plant Biology* **64**: 267-291.
- Furbank RT, Tester M. 2011.** Phenomics - technologies to relieve the phenotyping bottleneck. *Trends in Plant Science* **16**(12): 635-644.
- González-Dugo V, Zarco-Tejada P, Berni JAJ, Suárez L, Goldhamer D, Fereres E. 2012.** Almond tree canopy temperature reveals intra-crown variability that is water stress-dependent. *Agricultural and Forest Meteorology* **154**: 156-165.

Gonzalez-Talice J, Yuri JA, Lepe V, Hirzel J, del Pozo A. 2012. Water use in three apple cultivars from the second season to sixth season in a drainage lysimeter. *Scientia Horticulturae* **146**: 131-136.

Guitton B, Kelner JJ, Velasco R, Gardiner SE, Chagné D, Costes E. 2012. Genetic control of biennial bearing in apple. *Journal of Experimental Botany* **63**: 131-149.

Guo C, Guo R, Xu X, Gao M, Li X, Song J, Zheng Y, Wang X. 2014. Evolution and expression analysis of the grape (*Vitis vinifera* L.) WRKY gene family. *Journal of Experimental Botany* **65**(6): 1513-1528.

Hackl H, Baresel JP, Mistele B, Hu Y, Schmidhalter U. 2012. A Comparison of plant temperatures as measured by thermal imaging and infrared thermometry. *Journal of Agronomy and Crop Science* **198**(6): 415-429.

Hamdy A, Ragab R, Scarascia-Mugnozza E. 2003. Coping with water scarcity: water saving and increasing water productivity. *Irrigation and Drainage* **52**: 3-20.

Holland JB. 2007. Genetic architecture of complex traits in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **10** (2): 156-161.

Indorf M, Cordero J, Neuhaus G, Rodríguez-Franco M. 2007. Salt tolerance (STO), a stress-related protein, has a major role in light signalling. *The Plant Journal* **51**(4): 563-574.

Intergovernmental Panel on Climate Change. 2014. Edenhofer O, Pichs-Madruga R, Sokona Y et al. eds. Summary for Policymakers. In: Climate change 2014, mitigation of climate change. Contribution of Working Group III to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge, UK & New York, NY, USA. Cambridge University Press.

Jackson RD, Idso SB, Reginato RJ, Pinter PJ. 1981. Canopy Temperature as a Crop Water Stress Indicator. *Water Resource Research* **17**: 1133-1138.

Jones HG, Stoll M, Santos T, de Sousa C, Chaves MM, Grant OM. 2002. Use of infrared thermography for monitoring stomatal closure in the field: application to grapevine. *Journal of Experimental Botany* **53**: 2249-2260.

Jones HG, Serraj R, Loveys BR, Xiong L, Wheaton A, Price AH. 2009. Thermal infrared imaging of crop canopies for the remote diagnosis and quantification of plant responses to water stress in the field. *Functional Plant Biology* **36**: 978-989.

Jung S, Ficklin SP, Lee T, Cheng C-H, Blenda A, Zheng P, Yu J, Bombarely A, Cho I, Ru S et al. 2013. The Genome Database for Rosaceae (GDR): year 10 update. *Nucleic Acids Research*.doi: 10.1093/nar/gkt1012.

Kim S, Choi HI, Ryu HJ, Park JH, Kim MD, Kim SY. 2004. ARIA, an Arabidopsis arm repeat protein interacting with a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, is a novel abscisic acid signaling component. *Plant Physiology* **136**(3): 3639-3648.

Kim TH, Bohmer M, Hu HH, Nishimura N, Schroeder JI. 2010. Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ Signaling. *Annual Review of Plant Biology* **61**: 561-591.

Köksal ES. 2008. Irrigation water management with water deficit index calculated based on oblique viewed surface temperature. *Irrigation Science* **27**: 41-56.

Koops P, Pelser S, Ignatz M, Klose C, Marrocco-Selden K, Kretsch T. 2011. EDL3 is an F-box protein involved in the regulation of abscisic acid signalling in Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany* **62**(15): 5547-5560.

Lauri PÉ, Gorza O, Cochard H, Martinez S, Celton JM, Ripetti V, Lartaud M, Bry X, Trottier C, Costes E. 2011. Genetic determinism of anatomical and hydraulic traits within an apple progeny. *Plant, Cell and Environment* **34**: 1276-1290.

Lebourgeois V, Bégué A, Labbé S, Mallavan B, Prévot L, Roux B. 2008. Can commercial digital cameras be used as multispectral sensors? A crop monitoring test. *Sensors* **8**: 7300-7322.

Lebourgeois V, Bégué A, Labbé S, Houlès M, Martine JF. 2012. A light-weight multi-spectral aerial imaging system for nitrogen crop monitoring. *Precision Agriculture* **13**: 525-541.

Liu BH, Cheng L, Ma FW, Zou YJ, Liang D. 2012. Growth, biomass allocation, and water use efficiency of 31 apple cultivars grown under two water regimes. *Agroforestry Systems* **84**(2): 117-129.

Lu YL, Xu J, Yuan ZM, Hao ZF, Xie CX, Li XH, Shah T, Lan H, Zhang SH, Rong TZ, Xu YB. 2012. Comparative LD mapping using single SNPs and haplotypes identifies QTL for plant height and biomass as secondary traits of drought tolerance in maize. *Molecular Breeding* **30**(1): 407-418.

Maes WH, Steppe K. 2012. Estimating evapotranspiration and drought stress with ground-based thermal remote sensing in agriculture: a review. *Journal of Experimental Botany* **63**: 4671-4712.

Marguerit E, Brendel O, Lebon E, Van Leeuwen C, Ollat, N. 2012. Rootstock control of scion transpiration and its acclimation to water deficit are controlled by different genes. *New Phytologist* **194**: 416-429.

Martinoia E, Klein M, Geisler M, Bovet L, Forestier C, Kolukisaoglu Ü, Müller-Röber B, Schulz B. 2002. Multifunctionality of plant ABC transporters – more than just detoxifiers. *Planta* **214**(3): 345-355.

Masle J, Gilmore SR, Farquhar GD. 2005. The ERECTA gene regulates plant transpiration efficiency in Arabidopsis. *Nature* **436**(7052): 866-870.

Mason RE, Hays DB, Mondal S, Ibrahim AMH, Basnet BR. 2013. QTL for yield, yield components and canopy temperature depression in wheat under late sown field conditions. *Euphytica* **194**(2): 243-259.

Massonnet C, Costes E, Rambal S, Dreyer E, Regnard JL. 2007. Stomatal regulation of photosynthesis in apple leaves. Evidence for different water-use strategies between two cultivars. *Annals of Botany* **100**: 1347-1356.

McDowell N, Pockman WT, Allen CD et al. 2008. Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? *New Phytologist* **178**: 719-739.

Moran MS, Clarke TR, Inoue TR, Vidal A. 1994. Estimating crop water deficit using the relation between surface-air temperature and spectral vegetation index. *Remote Sensing of Environment* **49**: 246-263.

Mori IC, Murata Y, Yang Y, Munemasa S, Wang Y-F, Andreoli S, Tiriack H, Alonso JM, Harper JF, Ecker JR et al. 2006. CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca^{2+} - permeable channels and stomatal closure. *PLoS Biol* **4**(10): e327.

Mueller S, Hilbert B, Dueckershoff K, Roitsch T, Krischke M, Mueller MJ, Berger S. 2008. General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* **20**(3): 768-785.

Naor A, Girona J. 2012. Apple. In: Steduto P, Hsiao TC, Fereres E, Raes D (eds). Crop yield response to water. FAO, Rome, 332-345. <http://www.fao.org/docrep/016/i2800e/i2800e00.htm>

Ndamukong I, Al Abdallat A, Thurow C, Fode B, Zander M, Weigel R, Gatz C. 2007. SA-inducible Arabidopsis glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive PDF1.2 transcription. *Plant Journal* **50**(1): 128-139.

Nozawa A, Sawada Y, Akiyama T, Koizumi N, Sano H. 2003. Variable interactions between sucrose non-fermented 1-related protein kinases and regulatory proteins in higher plants. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **67**(12): 2533-2540.

Peng Y, Gitelson AA. 2011. Application of chlorophyll-related vegetation indices for remote estimation of maize productivity. *Agricultural and Forest Meteorology* **151**: 1267-1276.

Peñuelas J, Filella I, Lloret P, Muñoz F, Vilajeliu M. 1995. Reflectance assessment of mite effects on apple trees. *International Journal of Remote Sensing* **16**(14): 2727-2733.

Peñuelas J, Gamon JA, Fredeen AL, Merino J, Field CB. 1994. Reflectance indices associated with physiological changes in nitrogen- and water-limited sunflower leaves. *Remote Sensing of Environment* **48**(2): 135-146.

Pose D, Castanedo I, Borsani O, Nieto B, Rosado A, Taconnat L, Ferrer A, Dolan L, Valpuesta V, Botella MA. 2009. Identification of the *Arabidopsis* dry2/sqe1-5 mutant reveals a central role for sterols in drought tolerance and regulation of reactive oxygen species. *Plant Journal* **59**(1): 63-76.

Rebetzke GJ, Rattey AR, Farquhar GD, Richards RA, Condon AG. 2013. Genomic regions for canopy temperature and their genetic association with stomatal conductance and grain yield in wheat. *Functional Plant Biology* **40**: 14-33.

Regnard JL, Segura V, Merveille N, Durel C-E, Costes E. 2009. QTL analysis for leaf gas exchange in an apple progeny grown under atmospheric constraints. *Acta Horticulturae* **814**: 369-374.

Rönnberg-Wästljung AC, Glynn C, Weih M. 2005. QTL analyses of drought tolerance and growth for a *Salix dasyclados* x *Salix viminalis* hybrid in contrasting water regimes. *Theoretical and Applied Genetics* **110**:537-549.

Rouse JW, Hass RH, Schell JA, Deering DW. 1973. Monitoring vegetation systems in the Great Plains with ERTS. In: *3rd ERTS Symposium*. NASA SP-351, I, 309-317.

Salleh FM, Evans K, Goodall B, Machin H, Mowla SB, Mur LAJ, Runions J, Theodoulou FL, Foyer CH, Rogers HJ. 2012. A novel function for a redox-related LEA protein (SAG21/AtLEA5) in root development and biotic stress responses. *Plant cell and environment* **35**(2): 418-429.

Schweighofer A, Hirt H, Meskiene I. 2004. Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends in Plant Science* **9**(5): 236-243.

Segura V, Cilas C, Costes E. 2008. Dissecting apple tree architecture into genetic, ontogenetic and environmental effects: mixed linear modelling of repeated spatial and temporal measures. *New Phytologist* **178**(2): 302-314.

Shen G, Adam Z, Zhang H. 2007. The E3 ligase AtCHIP ubiquitylates FtsH1, a component of the chloroplast FtsH protease, and affects protein degradation in chloroplasts. *The Plant Journal* **52**(2): 309-321.

Soto A, Ruiz KB, Ravaglia D, Costa G, Torrigiani P. 2013. ABA may promote or delay peach fruit ripening through modulation of ripening- and hormone-related gene expression depending on the developmental stage. *Plant Physiology and Biochemistry* **64**: 11-24.

Stagakis S, González-Dugo V, Cid P, Guillén-Climent ML, Zarco-Tejada PJ. 2012. Monitoring water stress and fruit quality in an orange orchard under regulated deficit irrigation using narrow-band structural and physiological remote sensing indices. *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing* **71**: 47-61.

Street NR, Skogström O, Sjödin A, Tucker J, Rodriguez-Acosta M, Nilsson P, Jansson S, Taylor G. 2006. The genetics and genomics of the drought response in *Populus*. *Plant Journal* **48**(3): 321-341.

Tardieu F. 2005. Plant tolerance to water deficit: physical limits and possibilities for progress. *Comptes Rendus Geoscience* **337**(1-2): 57-67.

Tardieu F, Simonneau T. 1998. Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. *Journal of Experimental Botany* **49**(Special issue): 419-432.

Van Ooijen J. 2009. *MapQTL 6, software for the mapping of quantitative trait in experimental populations of diploid species*. Kyazma BV: Wageningen, the Netherlands.

Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, Dhingra A, Cestaro C, Kalyanaraman A, Fontana P, Bhatnagar SK, Troggio M, Pruss D *et al.* 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Nature Genetics* **42**: 833–839.

Virlet N, Lebourgeois V, Martinez S, Costes E, Labbé S, Regnard JL. 2014. Stress indicators based on airborne thermal imagery for field phenotyping a heterogeneous tree population for response to water constraints. *Journal of Experimental Botany* **65** (18): 5429-5442.

Voorrips RE. 2001. *MapChart version 2.0: windows software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs*. Plant Research International, Wageningen, the Netherlands.

Wang Y, Zhou B, Sun M, Li YH, Kawabata S. 2012. UV-A light induces anthocyanin biosynthesis in a manner distinct from synergistic blue plus UV-B light and UV-A/blue light responses in different parts of the hypocotyls in turnip seedlings. *Plant and Cell Physiology* **53**(8): 1470-1480.

White JW, Andrade-Sanchez P, Gore MA et al. 2012. Field-based phenomics for plant genetics research. *Field Crops Research* **133**: 101-112.

Xu ML, Korban SS. 2002. A cluster of four receptor-like genes resides in the Vf locus that confers resistance to apple scab disease. *Genetics* **162**(4): 1995-2006.

Yan A, Wu MJ, Yan LM, Hu R, Ali I, Gan YB. 2014. AtEXP2 is involved in seed germination and abiotic stress response in Arabidopsis. *PLoS ONE* **9**(1). e85208.

Yang J, Wang Z. 1993. Study on the photosynthetic properties of the saplings of Red Delicious and Starkrimson apple. *Journal of Fruit Science* **10**: 1-5.

Yanhui C, Xiaoyuan Y, Kun H, Meihua L, Jigang L, Zhaofeng G, Zhiqiang L, Yunfei Z, Xiaoxiao W, Xiaoming Q et al. 2006. The MYB transcription factor superfamily of Arabidopsis: expression analysis and phylogenetic comparison with the Rice MYB family. *Plant Molecular Biology* **60**(1): 107-124.

Yao X, Xiong W, Ye TT, Wu Y. 2012. Overexpression of the aspartic protease ASPG1 gene confers drought avoidance in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **63**(7): 2579-2593.

Zhang M, Henquet M, Chen ZZ, Zhang HR, Zhang Y, Ren XZ, van der Krol S, Gonneau M, Bosch D, Gong Z. 2009. LEW3, encoding a putative alpha-1,2-mannosyltransferase (ALG11) in N-linked glycoprotein, plays vital roles in cell-wall biosynthesis and the abiotic stress response in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal* **60**(6): 983-999.

Zarco-Tejada PJ, Berjon A, Lopez-Lozano R, Miller JR, Martin P, Cachorro V, Gonzalez MR, de Frutos A. 2005. Assessing vineyard condition with hyperspectral indices: Leaf and canopy reflectance simulation in a row-structured discontinuous canopy. *Remote Sensing of Environment* **99**(3): 271-287.

Zybailov B, Rutschow H, Friso G, Rudella A, Emanuelsson O, Sun Q, van Wijk KJ. 2008. Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome. *PLoS ONE* **3**(4): e1994.

Table 1. (a) Environmental conditions at field in apple experimental field during image acquisitions in 2010 and 2011 (mean values and standard deviations for six dates, see text for detail). R_g : global radiation; T_a : air temperature; HR : air relative humidity; VPD : air vapor pressure deficit; u : wind speed. Soil hydric potential (Ψ_s): average of 6 representative well-watered (WW) trees and water-stressed (WS) trees at 30 and 60 cm depths. (b) Ultralight aircraft image acquisition system, including time of flight, cameras used and image settings, and original image resolution for each date of experiment.

a

Variables	Units	Date 1	Date 2	Date 3	Date 4	Date 5	Date 6
Solar time	hh:mm	11:40	10:40	09:50	10:00	10:00	09:20
R_g	W.m ⁻²	--	782.20(114.23)	472.83(33.89)	770.67(3.27)	599.27(102.85)	705.00(0.00)
T_a	°C	29.72(0.12)	28.08(0.42)	23.78(0.30)	26.91(0.19)	26.58(0.33)	26.85(0.49)
HR	%	44.06(1.44)	32.97(1.03)	37.88(2.57)	58.72(0.75)	27.96(0.33)	31.80(-1.86)
VPD	kPa	2.34(0.04)	2.55(0.10)	1.83(0.11)	1.47(0.04)	2.51(0.06)	2.41(0.14)
u	m.s ⁻¹	2.01(0.07)	2.72(0.26)	1.86(0.10)	1.99(0.36)	1.73(0.28)	0.78(0.32)
Ψ_s^{WW}	MPa	-0.065(0.054)	-0.053(0.028)	-0.066(0.036)	-0.022(0.012)	-0.046(0.039)	-0.024(0.036)
Ψ_s^{WS}	MPa	-0.099(0.035)	-0.133(0.017)	-0.172(0.022)	-0.031(0.021)	-0.078(0.037)	-0.130(0.048)

b

	Date 1	Date 2	Date 3	Date 4	Date 5	Date 6
Flight altitude	350m	330m	480m	300m	300m	300m
Sensor						
RGB	Canon 400D	Canon 500 D	Canon 500 D	Canon 500 D	Canon 500 D	Canon 500 D
NIR	Canon 400D modified (745nm filter)	Canon 500 D modified (745nm filter)	Canon 500 D modified (745nm filter)	Canon 500 D Modified (745nm filter)	Canon 500 D modified (745nm filter)	Canon 500 D modified (745nm filter)
TIR	Imageur FLIR B20HSV	Imageur FLIR B20HSV	Imageur FLIR B20HSV	Imageur FLIR B20HSV	Imageur FLIR B20HSV	Imageur FLIR B20HSV
Setting						
RGB Sensibility	ISO 100	ISO 100	ISO 100	ISO 100	ISO 100	ISO 100
Shutter speed	1/1250	1/2000	1/2000	1/2000	1/2000	1/2000
Aperture	F5	F2.8	F2.8	F3.5	F3.5	F3.5
NIR Sensibility	ISO 100	ISO 100	ISO 100	ISO 100	ISO 100	ISO 100
Shutter speed	1/1250	1/2000	1/2000	1/2500	1/2000	1/2000
Aperture	F5	F2.8	F2.8	F3.5	F3.5	F3.5
Initial pixel size (cm)						
RGB	5*5	3*3	5*5	3*3	3*3	3*3
NIR	5*5	3*3	5*5	3*3	3*3	3*3
TIR	30*30	35*35	53*53	30*30	30*30	30*30
Atmospherical correction for TIR image	no	no	no	Yes	Yes	Yes

Table 2. List of phenotypic variables and equations used for computing (NIR: near infrared; R: red; B: blue; G: green, $T_{\max}$ and $T_{\min}$: maximum and minimum surface temperatures, T_s : surface temperature, T_a : air temperature and TC: trunk circumference).

Variable	Description	Equation	Reference
NDVI	Normalized Differences Vegetation Index	$(\text{NIR} - \text{R}) / (\text{NIR} + \text{R})$	Rouse et al, 1973
VARI	Visible Atmospheric Resistant Index	$(\text{G} - \text{R}) / (\text{G} + \text{R})$	Peng and Gitelson, 2011
SRPI	Simple Ratio Pigment Index	B / R	Lebourgeois et al., 2012
$T_s T_a$	Air-surface temperature differences		
WDI	Water Deficit Index	$\frac{(T_{\min} - T_a) - (T_s - T_a)}{(T_{\min} - T_a) - (T_{\max} - T_a)}$	Moran et al., 1994; Virlet et al., submitted
TCSA	Trunk Cross Section Area (mm ²)	$\text{TC}^2 / 4 \pi$	
NbFr	Fruit number per tree		
BmFr	Fruit biomass per tree (Kg)		

Table 3. Description of fixed (M: modality; D: date; Y: year) and random (G: genotype) effects used in mixed linear models selected for each variable. For each trait, variances percentage of each random effect and of the residuals (Res), and broad-sense heritability values (h^2_b) are indicated. DI: differential index (variable difference between WS and WW trees).

a

		Fixed effect			Random effect				% variances					
		M	D	Y	G	GxM	GxD	GxY	G	GxM	GxD	GxY	Res	h^2b
NDVI	me	x	x	-	x	x	-	-	35	19	-	-	46	0.62
	sd	x	x	-	x	x	-	-	21	8	-	-	71	0.50
VARI	me	x	x	-	x	x	x	-	23	6	9	-	61	0.77
	sd	x	x	-	x	x	x	-	9	5	10	-	76	0.56
SRPI	me	x	x	-	x	x	x	-	19	18	4	-	59	0.60
	sd	x	x	-	x	x	x	-	17	8	5	-	70	0.69
T _s T _a	me	x	x	-	x	x	x	-	15	18	5	-	62	0.55
	sd	x	x	-	x	x	x	-	7	9	4	-	79	0.49
WDI	me	x	x	-	x	x	x	-	11	7	5	-	76	0.59
	sd	x	x	-	x	x	x	-	3	6	6	-	85	0.31
TCSA		x	-	x	x	x	-	-	51	15	-	-	34	0.76
NbFr		x	-	x	x	-	-	x	25	-	-	37	37	0.52
BmFr		x	-	x	x	x	-	x	12	8	-	32	49	0.31

b

		Fixed effect			Random effect				% variances					
		M	D	Y	G	GxM	GxD	GxY	G	GxM	GxD	GxY	Res	h^2b
NDVI_DI	me	-	x	-	x	-	-	-	44	-	-	-	56	0.61
	sd	-	x	-	x	-	-	-	19	-	-	-	81	0.32
VARI_DI	me	-	x	-	x	-	-	-	19	-	-	-	81	0.33
	sd	-	x	-	x	-	x	-	13	-	8	-	79	0.62
SRPI_DI	me	-	x	-	x	-	-	-	35	-	-	-	65	0.52
	sd	-	x	-	x	-	x	-	17	-	7	-	75	0.70
T _s T _a _DI	me	-	x	-	x	-	-	-	34	-	-	-	66	0.50
	sd	-	x	-	x	-	x	-	19	-	14	-	67	0.70
WDI_DI	me	-	x	-	x	-	-	-	17	-	-	-	83	0.29
	sd	-	x	-	x	-	-	-	9	-	-	-	91	0.17
TCSA_DI		-	-	x	x	-	-	-	35	-	-	-	65	0.52
NbFr_DI		-	-	x	x	-	-	x	13	-	-	1	86	0.38
BmFr_DI		-	-	x	x	-	-	-	17	-	-	-	83	0.29

Table 4. Genetic r Pearson's correlations between NDVI, VARI, SRPI, WDI variables, and TCSA, NbFr and BmFr, for genetic means two water regimes confounded (a), for well-watered trees (b), water-stressed trees (c) and for differential index (DI: d). r values in bold type were significant for p-value ≤ 0.001 .

	<i>NDVI</i>	<i>VARI</i>	<i>SRPI</i>	<i>sdNDVI</i>	<i>sdVARI</i>	<i>sdSRPI</i>	<i>WDI</i>	<i>sdWDI</i>	<i>TCSA</i>	<i>NbFr</i>	<i>BmFr</i>		<i>NDVI</i>	<i>VARI</i>	<i>SRPI</i>	<i>sdNDVI</i>	<i>sdVARI</i>	<i>sdSRPI</i>	<i>WDI</i>	<i>sdWDI</i>	<i>TCSA</i>	<i>NbFr</i>	<i>BmFr</i>
A												B											
NDVI	1											NDVI	1										
VARI	0.61	1										0.74	1										
SRPI	0.80	0.28	1									0.64	0.26	1									
sdNDVI	-0.58	-0.55	-0.49	1								-0.66	-0.60	-0.43	1								
sdVARI	0.03	0.15	0.00	0.36	1							-0.16	-0.31	-0.13	0.42	1							
sdSRPI	-0.64	-0.62	-0.54	0.88	0.33	1						-0.46	-0.46	-0.52	0.66	0.57	1						
WDI	0.15	0.06	0.02	0.16	-0.16	0.12	1					-0.03	0.21	-0.25	0.10	-0.30	0.02	1					
sdWDI	0.03	0.06	-0.14	0.39	0.21	0.27	0.52	1				-0.07	0.01	-0.22	0.08	-0.11	-0.01	0.52	1				
TCSA	0.67	0.33	0.57	-0.36	0.03	-0.35	0.13	0.09	1			0.63	0.29	0.45	-0.33	0.01	-0.28	0.14	0.07	1			
NbFr	0.32	0.32	0.25	-0.28	0.20	-0.24	-0.21	-0.12	0.39	1		0.29	0.28	0.13	-0.27	0.13	-0.14	-0.06	-0.06	0.39	1		
BmFr	0.40	0.35	0.32	-0.27	0.22	-0.23	-0.20	-0.04	0.50	0.85	1	0.48	0.38	0.23	-0.37	-0.01	-0.13	-0.03	-0.04	0.50	0.85	1	
C												D											
NDVI	1											NDVI	1										
VARI	0.71	1										0.74	1										
SRPI	0.88	0.51	1									0.82	0.45	1									
sdNDVI	-0.64	-0.53	-0.58	1								-0.19	-0.06	-0.32	1								
sdVARI	0.06	-0.10	0.10	0.25	1							-0.05	-0.29	0.02	-0.12	1							
sdSRPI	-0.58	-0.60	-0.60	0.74	0.25	1						-0.51	-0.52	-0.57	0.25	0.42	1						
WDI	-0.15	0.10	-0.12	0.23	-0.30	0.10	1					-0.16	0.18	-0.20	0.07	-0.34	0.03	1					
sdWDI	-0.05	0.04	-0.06	0.35	0.07	0.17	0.49	1				-0.09	0.01	-0.10	0.06	-0.12	0.01	0.51	1				
TCSA	0.60	0.31	0.54	-0.31	0.05	-0.34	0.08	0.07	1			0.55	0.48	0.30	0.13	-0.06	-0.26	-0.13	-0.10	1			
NbFr	0.29	0.29	0.27	-0.23	0.22	-0.26	-0.28	-0.13	0.39	1		0.55	0.49	0.33	0.22	-0.08	-0.19	-0.03	-0.04	0.52	1		
BmFr	0.52	0.38	0.39	-0.23	0.03	-0.10	-0.21	0.01	0.50	0.85	1	0.48	0.35	0.27	0.29	-0.04	-0.07	-0.08	-0.01	0.55	0.75	1	

Table 5. Main QTLs detected on the consensus STKxGS map by MQM mapping for *NDVI*, *VARI*, *SRPI*, *TsTa*, *WDI*, *TCSA*, *NbFr* and *BmFr* variables in well-watered (WW) and/or water-stress conditions (WS) and for differential index DI (WS-WW).

Traits	LG	LOD	R ²	R ² global	Position	Cofactor	Locus	Allelic effec	Af	Am	D
NDVI_WW	14	4.27	0.149		26.318	CH05g11_SG		D, Af, Am	-7.80E-03	1.96E-03	-9.11E-03
sdNDVI	08	4.71	0.142		29.763	CH02g09_SG		Af	3.15E-03	1.60E-04	-9.93E-04
sdNDVI_WS	06	4.02	0.141		1	HB09TC_S		Af	-1.33E-03	3.08E-04	9.00E-05
sdVARI_WW	01	4.08	0.143		12.749	Hi02c07_SG		D	5.00E-05	-1.75E-06	-1.45E-04
VARI_DI*	03	4.15	0.145		62.417	CH03g12y_SG		D, Af, Am	5.71E-04	-3.94E-04	-6.76E-04
SRPI*	09	4.08	0.143		34.112	CH01h02_SG		Af, Am, D	2.23E-03	1.97E-03	1.86E-03
SRPI_WW	09	4.51	0.157		34.112	CH01h02_SG		Am, Af, D	3.14E-03	3.32E-03	1.32E-03
sdSRPI	08	4.55	15.8		29.763	CH05a02y_G		Af	1.74E-03	-9.55E-05	-9.76E-04
sdSRPI_WW	08	4.37	0.153		35.571	MdPI_SG		Af	3.51E-03	9.96E-04	1.49E-04
TsTa_2_DI	05	4.19	0.119		0	Hi09b04_G		Am, Af	-1.48E-01	-1.64E-01	-5.78E-02
	06	6.74	0.202	0.208	0	HB09TC_S		Af, Am	-2.47E-01	1.63E-01	-7.77E-02
WDI_WW*	03	4.2	0.147		0	CH03e03_SG		Am, Af	3.89E-03	-4.50E-03	3.80E-05
TCSA_WS	10	4.14	0.145		15.783	MdVRN1b_S		Af, D	-7.03E+01	4.05E+00	2.90E+01
NbFr_WW	13	5.79	0.196		77.149	MdARF104_S		Af, Am	-1.07E+01	-1.03E+01	4.52E+00
NbFr_WS	05	4.51	0.156		0	Hi09b04_G		Af, D	2.31E+00	-5.11E-01	-1.19E+00
BmFr_WS	05	4.59	0.159		0	Hi09b04_G		Af, D	1.89E+00	-4.14E-01	-1.19E+00
TCSA_DI*	10	4.42	0.154		16.687	MdVRN1b_S		Af	-1.57E+02	-1.17E+01	6.40E+01
NbFr_DI*	13	5.19	0.178		77.149	MdARF104_S		Af, Am	2.65E+01	2.55E+01	-8.87E+00

Table 6. List of the most remarkable annotated sequences in four QTL zones detected on LG03, LG05, LG06 and LG10 for the 6-dates analysis (for details, see text).

Linkage group of the QTL detected	Arabidopsis locus	TAIR description/putative function	Copy Nr in QTL	Copy Nr in apple genome	Reference
3	AT2G34830	WRKY35 ; transcription factor highly induced in drought	1	2	Guo et al., 2014
3	AT2G47460	MYB12 ; transcription factor controlling biosynthesis of chalcone synthase; response to UV-A, UV-B	1	5	Wang et al., 2012
3	AT5G49330	MYB111 ; transcription factor controlling biosynthesis of chalcone synthase; response to UV-A, UV-B	1	7	Wang et al., 2012
3	AT1G66350	RGL1 ; transcription factor involved in ROS reduction	1	12	Yan et al., 2014
3	AT2G27310	F-box protein induced in response to abiotic stress	2	5	
3	AT3G03450	RGL2 ; transcription factor involved in ROS reduction	3	7	Yan et al., 2014
3	AT3G63010	GID1B (Ga insensitive dwarf 1B); hydrolase, ABA mediated signaling pathway	1	2	
3	AT3G63060	EDL3 ; F-box protein induced in abiotic stress, ABA mediated signaling pathway	1	1	Koops et al., 2011
3	AT4G02380	SAG21 (<i>SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 21</i>); role in oxidative stress tolerance; mRNA level increase in response to various stress	1	3	Salleh et al., 2012
3	AT5G19330	ARIA (armadillo/beta-catenin repeat family protein); interacts with a transcription factor, ABF2, which controls ABA-dependent gene expression via the G-box-type ABA-responsive elements	4	8	Kim et al., 2004
3	AT5G07180	ERL2 (Erecta-like 2); kinase, role in stomata development	1	4	Masle et al., 2005
5	AT4G18050	PGP9 (P-glycoprotein 9)/ABCB9; ATPase, coupled to transmembrane movement of substances	1	7	Martinoia et al., 2002
5	AT4G18700	CIPK12 (CBL-interacting protein kinase 12)/SnRK3.9; role in stomatal movement	1	3	Nozawa et al., 2003
5	AT5G45820	CIPK20 (CBL-interacting protein kinase 20)/SNRK3.6; role in stomatal movement	2	5	Nozawa et al., 2003
5	AT1G06040	STO (salt tolerance); co-localizes with COP1, role in light signaling	1	6	Indorf et al., 2007
5	AT1G28480	GRX480 ; electron carrier/ protein disulfide oxidoreductase, ABA mediated signaling pathway	2	3	Ndamukong et al., 2007
5	AT1G29395	COR414-TM1 ; cold regulator induced by short-term cold-treatment, water deprivation, and abscisic acid treatment	2	4	Zybailov et al., 2008
5	AT1G30100	NCED5 ; 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase	2	2	Daszkowska-Golec and Szarejko, 2013
5	AT1G30270	CIPK23 (CBL-interacting protein kinase 23)	3	3	Cheong et al., 2007
5	AT1G61340	F-box family protein induced by various biotic or abiotic stress	2	2	
5	AT2G34600	JAZ7 (jasmonate-zim-domain protein 7)	2	2	Daszkowska-Golec and Szarejko, 2013
5	AT4G18780	IRX1 (irregular xylem 1)/LW2; mutants enhance drought and osmotic stress tolerance in Arabidopsis	6	9	Chen et al., 2005
5	AT5G47220	ERF2 (ethylene responsive element binding factor 2); transcription factor, down-regulated by ABA	1	2	Soto et al., 2002

Table 6 (Continued)

Linkage group of the QTL detected	Arabidopsis locus	TAIR description/putative function	Copy Nr in QTL	Copy Nr in apple genome	Reference
6	AT4G17870	Member of PYR/PYL/RCAR family proteins function as abscisic acid sensors; mediates ABA-dependent regulation of PP2Cs, ABI1 and ABI2	1	2	Daszkowska-Golec and Szarejko, 2013
6	AT4G25960	PGP2 (P-glycoprotein 2)/ABCB2	1	1	Martinoia et al., 2002
6	AT5G16770	AtMYB9 ; transcription factor, response to ABA signal	1	2	Yanhui et al., 2006
6	AT1G32640	MYC2 ; transcription factor	2	9	Wang et al., 2012
6	AT1G67080	ABA4 (abscisic acid-deficient 4); intramolecular oxidoreductase	3	7	Daszkowska-Golec and Szarejko, 2013
6	AT2G40190	LEW3 (Leaf wilting 3); plays vital roles in cell-wall biosynthesis and abiotic stress response	1	4	Zhang et al., 2009
6	AT4G17615	CBL1 (calcieneurin B-like protein 1); calcium ion binding	2	3	Cheong et al., 2007
6	AT4G33950	OST1 (open stomata 1); induction of stomatal closure after activation of ABI1, ABI2 and ABI3	1	4	Kim et al., 2010
10	AT1G04120	ATMRP5 /ABCC5; encodes a high-affinity inositol hexakisphosphate transporter that plays a role in guard cell signaling and phytate storage	1	3	Kim et al., 2010
10	AT1G04710	PKT4 (peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase 4); potassium channel inhibited in response to ABA signal, enabling stomatal closure	1	1	Daszkowska-Golec and Szarejko, 2013
10	AT2G33150	PKT3 (peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase 3); potassium channel inhibited in response to ABA signal, enabling stomatal closure	7	11	Daszkowska-Golec and Szarejko, 2013
10	AT1G15520	PDR12 (pleiotropic drug resistance 12)/ABCG40; role in tranfert of ABA in response to drought in guard cell	3	16	Boursiac et al., 2013
10	AT2G13540	ABH1 (ABA hypersensitive 1); RNA cap binding, activating after ABA perception by PYR/PYL/RCAR	1	7	Kim et al., 2010
10	AT2G17290	CPK6 (Ca ²⁺ -dependent protein kinase 6); functions in guard cell ion channel regulation; directly activated by elevations in calcium	1	5	Laanements et al., 2013
10	AT2G33700	PP2CG1 (putative protein phosphatase 2C)	1	12	Schweighofer et al., 2004
10	AT3G07370	CHIP (carboxyl terminus of HSC70-interacting-protein); plays an important role in protein quality control in chloroplasts.	1	3	Shen et al., 2007
10	AT3G18490	ASPG1 (Aspartic Protease in Guard Cell 1); functions in drought avoidance through abscisic acid signalling in guard cells	1	9	Yao et al., 2012
10	AT1G58440	XF1/DRY2 ; squalene monooxygenase; drought hypersensitive 2	2	25	Pose et al., 2009
10	AT1G78380	ATGSTU19 (Glutathione S-transferase TAU 19)	3	27	Mueller et al., 2008

Supporting Informations

Table S1. Values of traits (mean and standard deviation) investigated for vegetation and stress indices, transpiration rates indices, trunk morphology, tree vigor, fruit production in well-watered (WW) or water-stressed conditions (WS) and for the differential index (DI: WS-WW).

		Date 1	Date 2	Date 3	Date 4	Date 5	Date 6
NDVI	WW	0.182 (0.048)	0.202 (0.039)	0.172 (0.056)	0.178 (0.037)	0.192 (0.031)	0.237 (0.034)
	WS	0.172 (0.059)	0.175 (0.057)	0.160 (0.067)	0.179 (0.042)	0.176 (0.042)	0.202 (0.050)
	DI	-0.011 (0.051)	-0.027 (0.050)	-0.012 (0.062)	0.001 (0.033)	-0.016 (0.034)	-0.035 (0.042)
sdNDVI	WW	0.075 (0.024)	0.063 (0.019)	0.094 (0.027)	0.038 (0.013)	0.035 (0.014)	0.043 (0.012)
	WS	0.084 (0.024)	0.081 (0.025)	0.105 (0.030)	0.042 (0.014)	0.045 (0.016)	0.056 (0.017)
	DI	0.009 (0.024)	0.018 (0.022)	0.010 (0.030)	0.004 (0.015)	0.010 (0.016)	0.012 (0.017)
VARI	WW	0.154 (0.009)	0.114 (0.008)	0.146 (0.006)	0.137 (0.004)	0.144 (0.006)	0.126 (0.008)
	WS	0.151 (0.010)	0.115 (0.007)	0.143 (0.007)	0.135 (0.004)	0.142 (0.006)	0.127 (0.008)
	DI	-0.003 (0.009)	0.001 (0.006)	-0.003 (0.006)	-0.002 (0.004)	-0.002 (0.005)	0.002 (0.008)
sdVARI	WW	0.015 (0.004)	0.016 (0.004)	0.012 (0.003)	0.008 (0.002)	0.010 (0.003)	0.021 (0.004)
	WS	0.017 (0.004)	0.014 (0.004)	0.013 (0.003)	0.008 (0.002)	0.010 (0.003)	0.019 (0.004)
	DI	0.001 (0.005)	-0.002 (0.004)	0.001 (0.003)	0.000 (0.002)	0.000 (0.003)	-0.002 (0.004)
SRPI	WW	1.026 (0.035)	0.987 (0.011)	1.037 (0.017)	1.020 (0.014)	1.026 (0.018)	1.076 (0.026)
	WS	1.009 (0.044)	0.961 (0.022)	1.007 (0.028)	1.017 (0.019)	1.008 (0.027)	1.040 (0.037)
	DI	-0.016 (0.040)	-0.026 (0.020)	-0.030 (0.027)	-0.003 (0.018)	-0.018 (0.026)	-0.036 (0.035)
sdSRPI	WW	0.069 (0.022)	0.021 (0.008)	0.034 (0.012)	0.024 (0.009)	0.031 (0.011)	0.052 (0.012)
	WS	0.079 (0.022)	0.035 (0.012)	0.049 (0.016)	0.028 (0.010)	0.038 (0.012)	0.057 (0.013)
	DI	0.009 (0.022)	0.014 (0.012)	0.015 (0.015)	0.004 (0.010)	0.007 (0.012)	0.004 (0.014)
TsTa	WW	4.265 (1.395)	0.251 (0.675)	8.922 (0.857)	5.797 (2.272)	0.346 (1.439)	-1.213 (1.162)
	WS	6.536 (1.632)	2.279 (0.753)	12.903 (1.112)	5.710 (2.327)	5.150 (2.181)	4.321 (1.907)
	DI	2.282 (1.507)	2.036 (0.785)	3.986 (1.087)	-0.069 (2.301)	4.816 (2.137)	5.550 (1.952)
sdTsTa	WW	1.550 (0.656)	0.634 (0.239)	0.906 (0.278)	2.202 (0.795)	2.069 (0.741)	1.508 (0.572)
	WS	1.533 (0.566)	0.753 (0.267)	0.861 (0.253)	2.201 (0.728)	2.079 (0.598)	1.991 (0.702)
	DI	-0.010 (0.569)	0.118 (0.296)	-0.045 (0.335)	0.000 (0.855)	0.015 (0.734)	0.489 (0.736)
WDI	WW	0.271 (0.121)	0.259 (0.116)	0.200 (0.094)	0.360 (0.113)	0.280 (0.095)	0.197 (0.069)
	WS	0.498 (0.119)	0.502 (0.113)	0.602 (0.104)	0.361 (0.109)	0.601 (0.104)	0.492 (0.074)
	DI	0.227 (0.129)	0.243 (0.099)	0.403 (0.098)	0.001 (0.118)	0.321 (0.123)	0.296 (0.090)
sdWDI	WW	0.129 (0.049)	0.101 (0.032)	0.094 (0.032)	0.145 (0.047)	0.128 (0.040)	0.094 (0.032)
	WS	0.140 (0.037)	0.146 (0.043)	0.100 (0.030)	0.153 (0.045)	0.126 (0.036)	0.113 (0.035)
	DI	0.011 (0.051)	0.045 (0.042)	0.005 (0.041)	0.009 (0.060)	-0.002 (0.050)	0.019 (0.043)

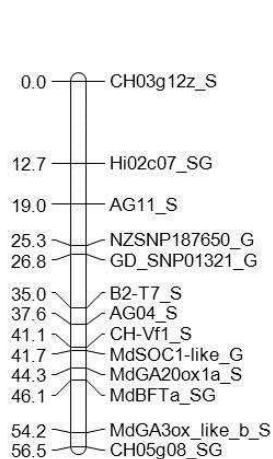
		2010	2011
TCSA	WW	2270 (801.1)	2444 (884.0)
	WS	1763 (624.3)	2003 (726.6)
	DI	-508.8 (688.7)	-444.3 (778.3)
NbFr	WW	49.17 (56.04)	222.4 (109.6)
	WS	33.36 (38.90)	194.9 (95.78)
	DI	-15.87 (43.01)	-27.63 (84.04)
BmFr	WW	5.03 (5.064)	30.01 (11.48)
	WS	3.10 (3.441)	20.61 (7.956)
	DI	-1.95 (4.139)	-9.408 (10.49)

Table S2. Total QTLs detected on the consensus STKxGS map by MQM mapping for all variables in well-watered (WW) and/or water-stress conditions (WS) and for differential index DI (WS-WW).

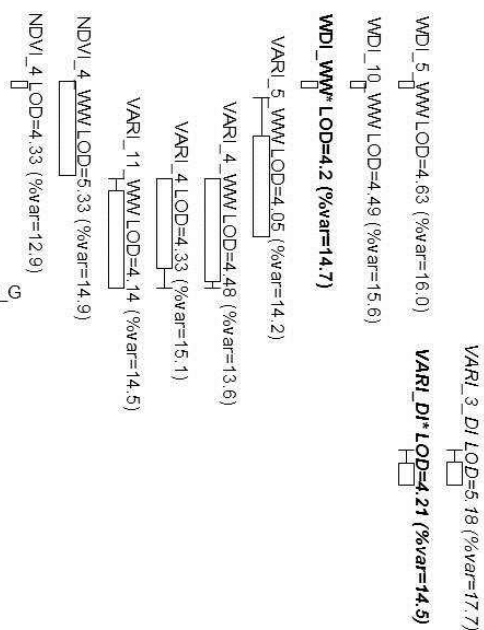
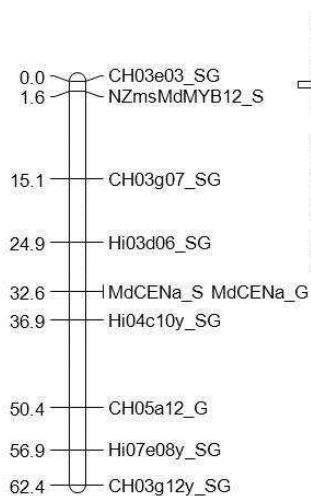
Traits	LG	LOD	R ²	R ² global	Position	Cofactor	Locus	Allelic effec	Af	Am	D
NDVI_WW	14	4.27	0.149		26.318	CH05g11_SG		D, Af, Am	-7.80E-03	1.96E-03	-9.11E-03
NDVI_11_WW	14	4.67	0.161		31.384	MdAFL2_G		Af, Am, D	-8.91E-03	3.58E-03	-7.14E-03
NDVI_4	14	5.07	0.152		33.384	MdAFL2_G		Af, Am, D	-8.58E-03	8.02E-03	-7.48E-03
	03	4.33	0.129	0.244	0		CH03e03_SG	Af	1.05E-02	-4.36E-03	4.40E-03
NDVI_4_WW	14	5.84	0.168		31.384	MdAFL2_G		Af	-1.04E-02	5.11E-03	-7.84E-03
	03	5.33	0.149	0.367	8.56		NZmsMdMY	Af	1.10E-02	-4.86E-03	7.63E-03
NDVI_5_WW	14	4.17	0.146		8.109	MdCKX1a_S		Af, Am, D	-7.56E-03	5.23E-03	-4.32E-03
sdNDVI	08	4.71	0.142		29.763	CH02g09_SG		Af	3.15E-03	1.60E-04	-9.93E-04
sdNDVI_WS	06	4.02	0.141		1	HB09TC_S		Af	-1.33E-03	3.08E-04	9.00E-05
sdNDVI_2	06	5	0.15		0	HB09TC_S		Af, D, Am	-6.26E-03	1.17E-03	-1.81E-03
	08	4.46	0.132	0.23	31.041	CH05a02y_G		Af, D, Am	6.07E-03	1.51E-03	-1.76E-03
sdNDVI_2_WW	08	4.12	0.144		32.041	CH05a02y_G		Af, D, Am	6.31E-03	1.25E-03	-1.78E-03
sdNDVI_2_WS	06	5.55	0.189		0	HB09TC_S		Af, Am, D	-8.51E-03	2.58E-03	-1.66E-03
NDVI_1_DI	05	4.53	0.157		0	Hi09b04_G		Af, D	1.88E-02	-1.28E-03	-1.02E-02
sdNDVI_1_DI	11	4.49	0.156		17.393	GD_SNP01477_G		Af, Am, D	-6.94E-03	2.63E-03	-1.22E-03
VARI_11_WW	03	4.14	0.145		27.865	Hi03d06_SG		Af	1.38E-03	-2.25E-04	8.99E-04
VARI_4	03	4.33	0.151		21.064	Hi03d06_SG		D	7.74E-04	-3.91E-04	1.02E-03
VARI_4_WW	03	4.48	0.136		21.064		Hi03d06_SG	D	8.81E-04	-3.93E-04	1.07E-03
	04	4.09	0.125	0.164	57.434	Hi23d11y_SG		Am, D	1.80E-05	9.98E-04	-6.53E-04
VARI_5_WW	03	4.05	0.142		20.064	CH03g07_SG		D, Af	1.13E-03	-4.26E-04	1.46E-03
sdVARI_WW*	01	4.08	0.143		12.749	Hi02c07_SG		D	5.00E-05	-1.75E-06	-1.45E-04
sdVARI_4	12	4.13	0.144		0	CH05d04_SG		Af, D	-4.39E-04	-1.81E-05	2.94E-04
VARI_DI*	03	4.15	0.145		62.417	CH03g12y_SG		D, Af, Am	5.71E-04	-3.94E-04	-6.76E-04
VARI_3_DI	03	5.18	0.177		62.417	CH03g12y_SG		Af, D	1.39E-03	-8.62E-04	-1.16E-03
SRPI*	09	4.08	0.143		34.112	CH01h02_SG		Af, Am, D	2.23E-03	1.97E-03	1.86E-03
SRPI_WW	09	4.51	0.157		34.112	CH01h02_SG		Am, Af, D	3.14E-03	3.32E-03	1.32E-03
SRPI_10_WW	07	5.72	0.135		50.46	Hi05b09_SG		Am	-8.15E-04	5.86E-03	4.50E-04
	08	5.33	0.126		32.041	CH05a02y_G		Af, D, Am	-5.05E-03	-1.79E-03	1.93E-03
	09	5.72	0.137	0.35	33.112	CH01h02_SG		Am, Af, D	2.51E-03	4.39E-03	1.15E-03
SRPI_1_WW	08	5.26	0.15		29.763	CH05a02y_G		Af	-1.03E-02	-3.01E-03	4.14E-03
	09	5.12	0.146	0.244	33.112	CH01h02_SG		Am, Af, D	5.02E-03	8.75E-03	1.98E-03
SRPI_2_WW	07	5.06	0.149		55.46	Hi05b09_SG		Am, D, Af	1.06E-03	3.64E-03	1.71E-03
	09	4.51	0.131	0.222	55.112	MdRGL2a_S		Am, D, Af	1.63E-03	2.61E-03	2.00E-03
SRPI_5	07	4.62	0.137		17.433	MdLHP1a_S		D, Am	3.16E-05	-2.87E-04	5.61E-04
	13	4.18	0.123	0.186	48.338	NH009b_SG		Am	1.74E-05	-6.23E-04	-1.20E-05
sdSRPI	08	4.55	15.8		29.763	CH05a02y_G		Af	1.74E-03	-9.55E-05	-9.76E-04
sdSRPI_WW	08	4.37	0.153		35.571	MdPI_SG		Af	3.51E-03	9.96E-04	1.49E-04
sdSRPI_10	08	4.24	0.148		28.763	CH02g09_SG		Af, D	3.81E-03	3.83E-04	-1.73E-03
sdSRPI_10_WW	08	4.61	0.161		36.571	MdPI_SG		Af, Am	4.79E-03	1.95E-03	3.27E-04
sdSRPI_11	17	4	0.14		19.057	NZsnpCOS3_G		Am, D	-1.04E-04	2.86E-03	-1.31E-03
sdSRPI_1	08	4.34	0.151		38.571	MdPI_SG		Af, D	6.22E-03	6.94E-04	-2.04E-03
sdSRPI_1_WW	08	4.41	0.153		35.571	MdPI_SG		Af, Am	6.83E-03	1.85E-03	-4.82E-04
sdSRPI_2*	06	4.68	0.134		10.937	CH03d07_SG		Af, D	-2.51E-04	3.89E-05	1.20E-04
	16	4.8	0.138	0.234	65.45	CH04f10_SG		Af, D	-2.06E-04	-2.19E-04	1.88E-04
sdSRPI_2_WW	08	5.23	0.179		31.041	CH05a02y_G		Af	3.04E-03	-9.66E-05	-8.50E-04
sdSRPI_2_WS	06	4.47	0.155		2	HB09TC_S		Af	-3.97E-03	8.96E-04	-7.21E-05
sdSRPI_6	06	4.17	0.146		12.608	CH03d07_SG		Am, Af	3.73E-04	-3.90E-04	-8.48E-05
sdSRPI_6_WW	01	4.27	0.149		13.749	Hi02c07_SG		D, Af	1.80E-03	-1.39E-04	-2.99E-03
SRPI_1_DTI	05	4.19	0.146		0	Hi09b04_G		Af, D	5.14E-02	-4.59E-03	-2.52E-02
	15	4.38	0.128	0.054	0	MdEFL3b_S		D	8.04E-03	1.86E-03	1.27E-02
SRPI_11_DI	07	4.45	0.133		49.46	Hi05b09_SG		Af, D, Am	-6.02E-04	4.68E-04	4.70E-04
	08	5.35	0.166	0.17	27.763	CH02g09_SG		Af, Am	-8.18E-04	-4.46E-04	1.90E-05
TsTa_2_WW	07	4.34	0.151		20.296	GD_SNP00247_S		D	4.73E-02	2.76E-02	-1.74E-01
sdTsTa_2	15	4.72	0.163		52.834	MdCLV1c_SG		Am, D, Af	-3.73E-03	9.22E-03	4.54E-03
sdTsTa_3_WS	10	4.1	0.143		65.68	MdAFB6_S		D, Am, Af	1.54E-02	-2.17E-02	-6.39E-02
TsTa_2_DI	05	4.19	0.119		0	Hi09b04_G		Am, Af	-1.48E-01	-1.64E-01	-5.78E-02
	06	6.74	0.202	0.208	0	HB09TC_S		Af, Am	-2.47E-01	1.63E-01	-7.77E-02
sdTsTa_3_DI	14	5	0.172		2	MdTFL1a_S		Am, Af	-1.17E-02	-2.63E-02	-1.04E-02
WDI_WW*	03	4.2	0.147		0	CH03e03_SG		Am, Af	3.89E-03	-4.50E-03	3.80E-05
WDI_11_WW	03	4.49	0.156		0	CH03e03_SG		Am, Af	1.17E-02	-2.05E-02	2.59E-03
WDI_2_WW	07	4.07	0.142		20.296	GD_SNP00247_S		D	-8.89E-04	4.97E-03	-3.35E-02
WDI_5_WW	03	4.63	0.16		0	CH03e03_SG		Am, Af	1.54E-02	-2.43E-02	7.30E-03
sdWDI_2*	08	4.35	0.151		58.529	Hi23g12x_SG		D	9.67E-04	8.11E-04	-1.32E-03
sdWDI_2_WW	01	4.28	0.149		10	CH03g12z_S		Af, D, Am	-9.82E-03	1.84E-03	-2.41E-03
sdWDI_4*	08	4.7	0.163		34.041	MdPI_SG		Af	1.89E-03	-1.95E-05	-5.92E-04
TCSA_WS	10	4.14	0.145		15.783	MdVRN1b_S		Af, D	-7.03E+01	4.05E+00	2.90E+01
NbFr_WS	05	4.51	0.156		0	Hi09b04_G		Af, D	2.31E+00	-5.11E-01	-1.19E+00
NbFr_WW	13	5.79	0.196		77.149	MdARF104_S		Af, Am	-1.07E+01	-1.03E+01	4.52E+00
BmFr_WS	05	4.59	0.159		0	Hi09b04_G		Af, D	1.89E+00	-4.14E-01	-1.19E+00
TCSA_DI*	10	4.42	0.154		16.687	MdVRN1b_S		Af	-1.57E+02	-1.17E+01	6.40E+01
TCSA_10_DI	10	4.69	0.162		16.687	MdVRN1b_S		Af	-2.25E+02	1.64E+01	9.68E+01
NbFr_DI*	13	5.19	0.178		77.149	MdARF104_S		Af, Am	2.65E+01	2.55E+01	-8.87E+00
NbFr_11_DI	10	4.16	0.128		0	CH04c06z_G		Af, Am	-2.12E+01	-1.64E+01	1.86E+00
	13	5.73	0.177	0.09	77.149	NZSNPQ06942_G		Af, Am	1.72E+02	1.59E+02	3.33E+01

Fig. S1. Genomic positions of the total QTLs detected on the consensus ‘Starkrimson’x‘Granny Smith’ (STKxGS) map. QTLs are represented by boxes, in which length represents the LOD-1 confidence interval and extended lines represent the LOD-2 confidence interval. Boxes relative to QTLs for the mean values are white, standard deviation values are hatched. QTL detected for BLUP are in bold and * are for QTL detected for BLUP and mean values.

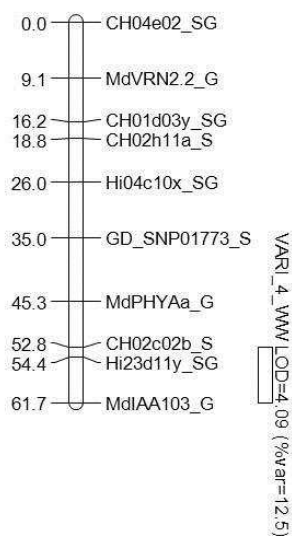
LG1



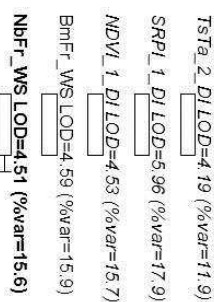
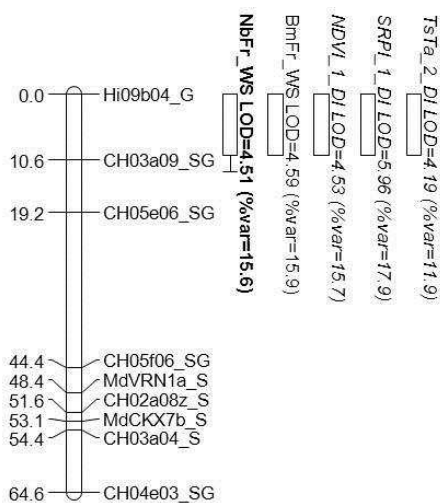
LG3

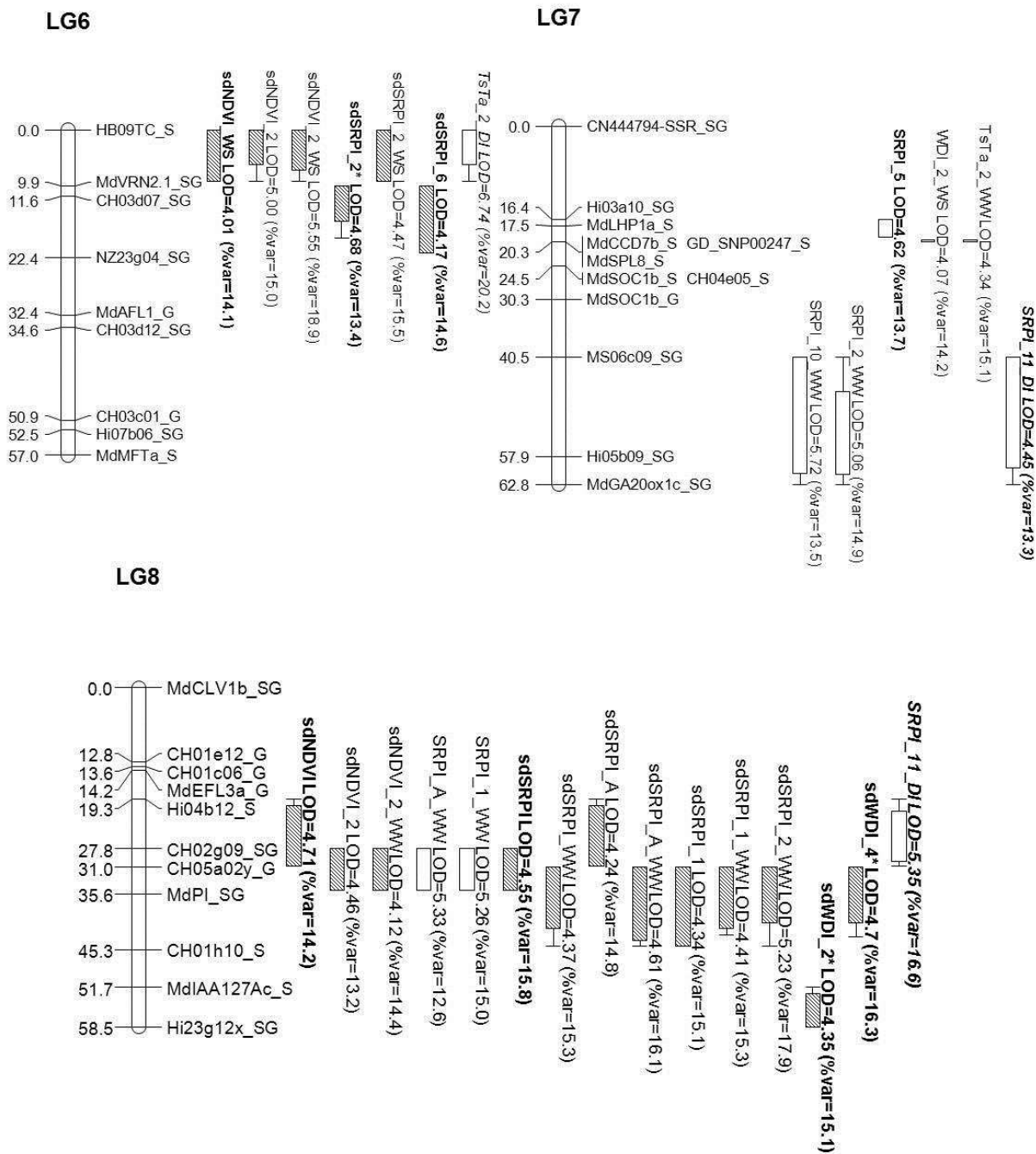


LG4

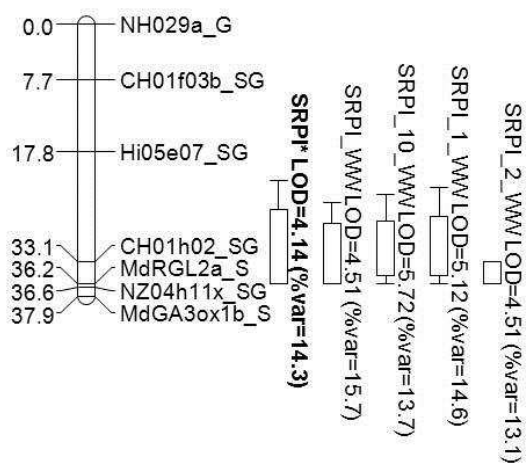


LG05

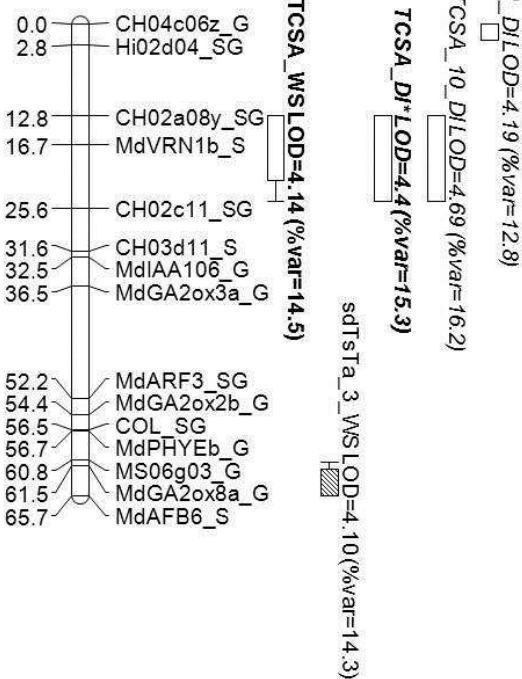




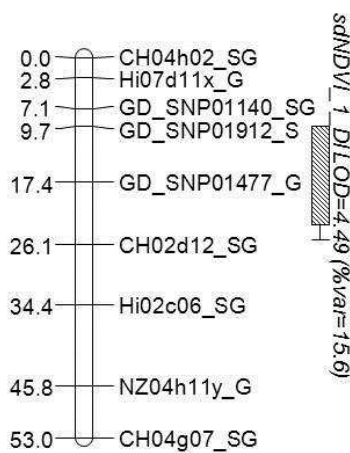
LG9



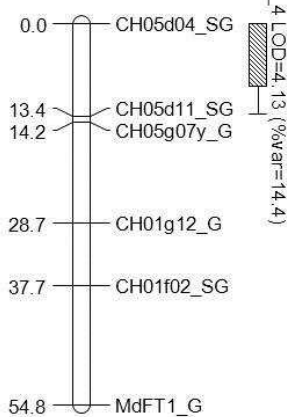
LG10



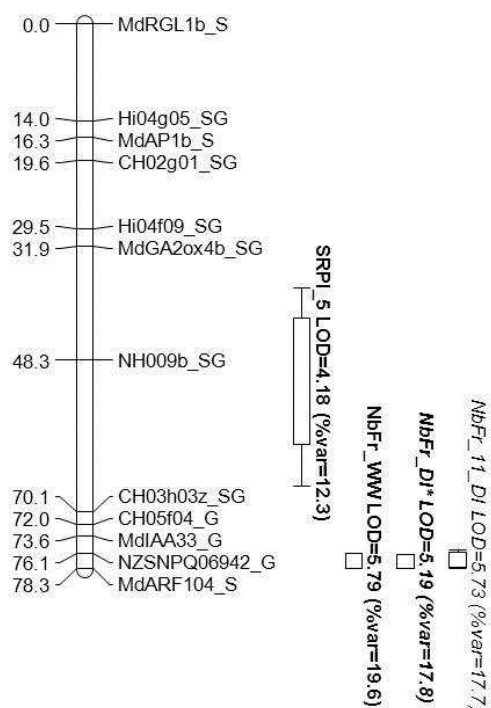
LG11



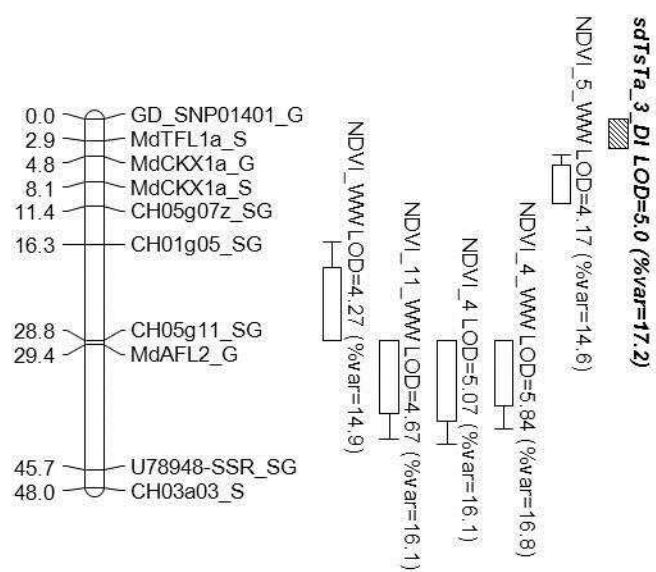
LG12



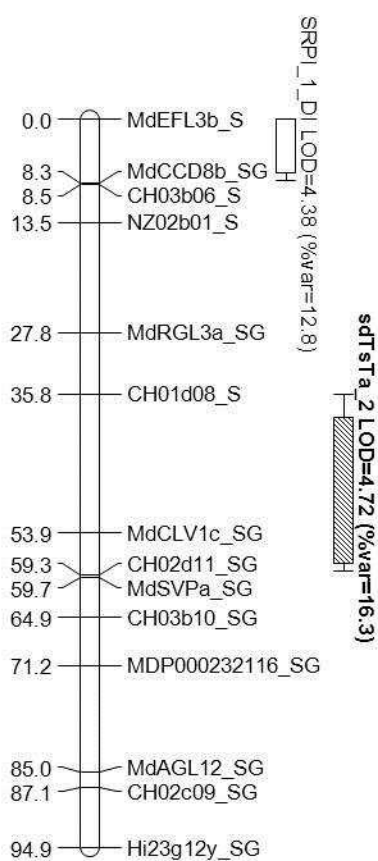
LG13



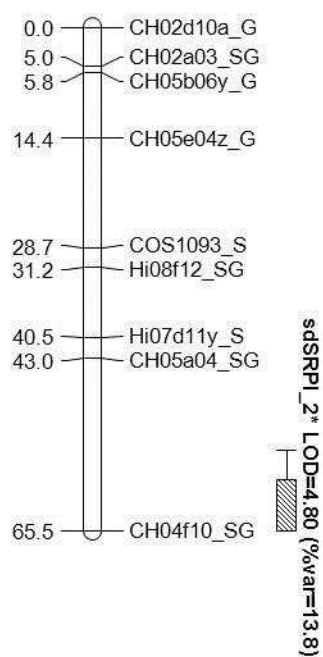
LG14



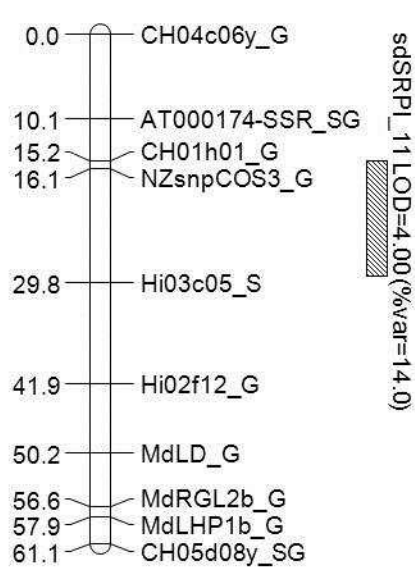
LG15



LG16



LG17



Chapitre 4 : Discussion générale et perspectives

L'objectif de ce travail était de proposer, pour les vergers de pommiers, une méthode de phénotypage à haut débit de la tolérance au stress hydrique, flexible, opérationnelle au champ et à moindre coût, basée sur l'imagerie aéroportée. Sur la base du signal spectral dans les domaines du visible, du proche infrarouge et de l'infrarouge thermique, un certain nombre d'indices spectraux ont pu être calculés, puis utilisés pour caractériser la variabilité génétique de la population de pommiers en réponse à la contrainte hydrique. L'analyse de conditions environnementales variées (date et régime d'irrigation) a permis d'intégrer dans des modèles génétiques les interactions génotype x environnement liées d'une part aux différences de conditions environnementales et d'autre part aux modifications du dispositif d'acquisition des données pour augmenter la puissance de détection des QTLs. Cette discussion fait le point sur les apports de l'imagerie pour la caractérisation phénotypique de la réponse foliaire à la contrainte hydrique, avec une problématique d'évaluation de la variabilité génétique du pommier pour ce trait.

I.L'imagerie aéroportée pour le phénotypage à haut débit au verger

I.1. Haute résolution et simultanéité de balayage

Les vecteurs aériens utilisés au cours de ce travail de thèse (ULM et hélicoptère) ont permis d'acquérir des images à haute résolution du verger dans les domaines du visible et du proche infrarouge (~3cm) ainsi que dans le domaine infrarouge thermique (~30cm) lorsque les vols étaient effectués à 300m d'altitude. Le choix de la résolution des images thermiques est un point important à considérer. En effet, l'utilisation de la température de surface de la canopée comme indicateur du statut hydrique des arbres nécessite que la résolution de l'image soit inférieure à la taille de la couronne pour ne pas introduire de biais lors leur interprétation (Stagakis et al., 2012). Dans nos essais, l'altitude de vol a permis l'acquisition d'images de la parcelle de phénotypage en 1 à 3 clichés en un faible intervalle de temps, contribuant ainsi à limiter les variations temporelles des facteurs climatiques pouvant influencer le signal spectral entre 2 photos consécutives, notamment pour l'imagerie thermique. L'inertie thermique du feuillage des plantes étant faible, la quasi-simultanéité des clichés obtenus a constitué un atout majeur pour l'étude de la réponse foliaire à la contrainte hydrique, car elle a permis

d'appréhender la réponse de l'ensemble de la population par une vision synoptique obtenue à un moment donné (snapshot).

La résolution de l'image thermique reste toutefois un objet de débat suite à cette étude. En effet, la structure hétérogène du couvert végétal dans la descendance de pommiers étudiée et la résolution de l'image thermique ont contribué à générer de nombreux pixels mixtes, qui intègrent à la fois le signal renvoyé par la végétation, mais aussi celui du sol vu à travers le feuillage, introduisant du bruit dans le signal thermique de ces pixels, et compliquant le travail d'interprétation. L'utilisation de l'indice de stress, *WDI*, nous a permis dans une certaine mesure de surmonter ce problème et de montrer une bonne corrélation de la valeur moyenne de l'indice par arbre avec le potentiel hydrique mesuré in planta, soit date par date, soit pour l'ensemble des dates de prise de vue (chapitre 3 - Article 1). Cependant bien que les analyses génétiques aient mis en évidence une héritabilité intéressante du *WDI*, le caractère complexe de cette variable contribue à rendre difficile la dissection de ses déterminismes (Holland et al., 2007).

I.2. Flexibilité du système d'acquisition

Dans nos conditions expérimentales, l'acquisition d'images aéroportées (données 2010 et 2011) a été limitée par un certain nombre de facteurs. Le premier d'entre eux, inhérent à toute acquisition d'images aéroportées, est la nécessité de travailler dans des conditions environnementales aussi stables que possible (peu de vent et ciel dégagé, Rundquist et al., 2014), notamment pour le canal thermique, car la température de canopée est très sensible aux variations climatiques. Le deuxième facteur est le moment de la journée durant lequel ont été effectuées les acquisitions d'images. Rundquist et al. (2014) recommandent également, pour l'acquisition de données radiométriques sur les couverts végétaux, de procéder au maximum pendant la période se situant entre 2h30 avant et après le midi solaire. Dans notre cas, pour éviter la levée d'une brise thermique après le midi solaire, due à la localisation de la parcelle (~10 km des côtes), il a été décidé d'effectuer les vols au début de cette période, 1 à 2 heures avant le midi solaire quand cela s'avérait possible. Le dernier facteur limitant a été la disponibilité de l'ULM ou de l'hélicoptère, qui a rendu difficile l'acquisition à heure fixe d'une date à l'autre. Le coût unitaire élevé des vols interdit par ailleurs d'envisager des acquisitions répétées au cours de la journée, ce qui peut aussi être un handicap si l'on souhaite

appréhender une dynamique diurne. L'utilisation des vecteurs légers ULM et hélicoptères, pourtant très flexibles pour leur utilisation au champ, s'est montré limitante au vu des contraintes auxquelles nous étions confrontés. Néanmoins, la capacité des différents partenaires (MTD et Avion Jaune) à faire face aux imprévus de dernières minutes a permis le bon déroulement des six campagnes d'acquisition.

I.3. Développement en cours et futurs

Plusieurs points restent à stabiliser et/ou à optimiser en vue d'un phénotypage aussi fiable que possible de la transpiration foliaire par acquisition aéroportée sur des populations présentant un couvert hétérogène.

Le choix de la zone d'intérêt par arbre pour le calcul du *WDI* (ou autres indices) est un élément important. Dans ce travail de thèse, nous avons privilégié le choix d'une zone d'intérêt centrée dans la canopée de chaque individu (zone tampon de 60 cm de rayon autour du centre de chaque arbre). Ceci a constitué une approche standardisée pour permettre une extraction plus efficace des variables phénotypiques de l'image. Cependant, la représentativité de la zone choisie peut être questionnée. En effet, la proportion de sol comprise dans cette zone est plus ou moins importante selon les géotypes (végétation plus ou moins dense, taille de couronne plus ou moins importante, donc fraction de trous variable) et contribue à biaiser la température de couvert mesurée, complexifiant le travail d'interprétation du signal thermique en tant qu'indicateur de stress hydrique. Par ailleurs, bien que les images soient géo-référencées et ortho-rectifiées grâce aux mires disposées au sein de la parcelle, des problèmes de superposition exacte des arbres entre les différentes dates ont pu subsister. Ceci a parfois rendu plus compliqué la sélection de la même zone d'intérêt dans les arbres d'une date à l'autre. Une alternative maintenant envisagée est d'utiliser la « zone buffer large » proposée lors d'un Congrès international en 2012 (Affiche scientifique, Plant Biology Congress EPSO : Annexe 5). Cette zone tampon large englobe l'arbre et sa périphérie permettant ainsi d'avoir une zone commune à toutes les dates. Pour chaque individu, il est envisageable de repartir de la zone tampon large et d'y appliquer une méthode de classification afin de séparer les pixels de sol et de végétation à partir des images de *NDVI*. Une telle solution pour l'analyse d'images permettrait sans doute d'améliorer les comparaisons temporelles et d'accéder à une précision accrue pour l'estimation de température de couvert et des indices de végétation.

Cette méthode est en cours de mise en œuvre pour les données acquises par drone à partir de l'année 2012. En effet, l'acquisition d'images de plus haute résolution spatiale permet d'accéder à un plus fort niveau de détail au sein de la couronne des arbres, mais elle complique l'interprétation si les objets de l'image (sol, végétation ensoleillée et à l'ombre, branchage) ne sont pas distingués les uns des autres. Le choix de passer à un vecteur aérien de type drone a été fait pour deux raisons principales : la première était de permettre une plus grande flexibilité dans l'acquisition des données vis à vis des conditions environnementales en évitant les difficultés évoquées au point B ci-dessus, et la deuxième était d'acquérir à coût raisonnable des données à plus haute résolution spatiale. Ceci a été permis par la volonté de la société l'Avion Jaune® et de Sylvain Labbé (UMR TETIS/IRSTEA) de développer des systèmes d'acquisitions plus stables et moins contraignants à l'utilisation.

Néanmoins, le passage à l'imagerie par drone a posé deux séries de questions. La première concerne la normalisation radiométrique des images acquises. En effet les vols étant effectués à plus basse altitude, recomposer le verger dans son entièreté nécessite un plus grand nombre d'images en comparaison des vols par avion/ULM/hélicoptère, ce qui nécessite un post-traitement plus poussé de ces images acquises (mosaïquage, normalisation) aussi bien dans le visible et le proche infrarouge que dans l'infrarouge thermique. Le choix du drone renvoie aussi à la question de la gestion et du traitement des données. En effet, l'imagerie à très haute résolution spatiale génère des données dont la quantité est fonction de la résolution des images souhaitée, du nombre de bandes spectrales, de la surface à couvrir, et le nombre de vols multiplie d'autant ce volume de données. Il devient donc nécessaire de développer des procédures d'automatisation ou de semi-automatisation pour la gestion et le traitement des données et cela constitue un nouveau challenge pour la communauté du phénotypage haut débit (White et al., 2012). Cela est d'autant plus vrai si l'acquisition d'une série temporelle est envisagée. Un travail spécifique actuellement conduit dans l'équipe d'accueil en relation avec ses partenaires scientifiques (UMR TETIS, Maison de la Télédétection) a permis de mettre au point une procédure automatisée d'extraction d'images thermiques fixes à partir des séquences vidéo acquises par une caméra thermique embarquée sur drone au cours de son vol (Gómez-Candón et al., 2014, Annexe 6).

II. Apport de l'imagerie à la caractérisation des phénotypes pour leur réponse à la contrainte hydrique

II.1. Indices de végétation

Bien que le système d'acquisition utilisé durant cette étude ne permette de couvrir qu'une partie du spectre lumineux et ne donne accès qu'à des bandes larges du spectre, la combinaison de l'information spectrale acquise a permis le calcul d'un certain nombre d'indices de végétation. Les indices étudiés (*NDVI*, *VARI*, *SRPI*) ne représentent qu'une partie des nombreux indices développés dans le domaine de la télédétection pour le suivi des couverts végétaux (Peng et Gitelson., 2011 ; Zarco-Tejada et al., 2013). Ces indices, appréhendés de deux manières (moyenne et écart-type au sein de la zone buffer) se sont montrés très intéressants pour caractériser la variabilité du couvert végétal de la population. Bien que présentant de fortes corrélations génétiques entre eux, l'étude de leur déterminisme génétique a révélé des zones QTLs différentes, témoignant de leurs propriétés différentes vis à vis du couvert végétal. Par ailleurs *NDVI* et *SRPI* se sont révélés sensibles au stress hydrique sur le long terme avec une différence entre arbres stressés et non stressés s'accroissant avec la durée du stress. Sur la base de ces observations, l'acquisition de séries temporelles d'images sur des populations en ségrégation lors de phases plus précoces de mise en place du couvert végétal pourrait aussi être envisagée et permettre l'établissement de cinétiques de croissance en fonction d'une contrainte hydrique imposée.

II.2. Indices liés à la transpiration

Dans la littérature, le nombre d'indices développés en exploitant l'information acquise dans l'infrarouge thermique est plus faible que pour les indices de végétation. Le choix du *WDI* pour ce travail de thèse a résulté des caractéristiques du couvert des arbres fruitiers étudiés (taux de couverture et structure hétérogène) et de la résolution des images thermiques (dont les pixels de 30 cm pouvaient représenter un mélange de feuillage et de sol dans le cas d'arbres non couvrants). Le *WDI* s'est révélé pertinent que ce soit pour l'interprétation du

signal thermique en tant qu'indice de stress hydrique sur couvert discontinu ou par la prise en compte des facteurs environnementaux, ce qui a été un élément important pour obtenir des valeurs de l'indice de stress hydrique comparables dans le temps, et ainsi établir des comparaisons entre arbres, pour les données de 2010 et 2011 (Chapitre 3- articles 1 et 2). Avec le changement d'échelle permis par l'utilisation de drone, à partir de 2012, l'intérêt de cet indice particulier reste à évaluer. En effet, les hautes résolutions spatiales désormais obtenues dans l'infrarouge thermique (~10 cm) d'une part, et dans le visible et proche-infrarouge (~2 cm) d'autre part, permettent de séparer les différents objets sur les scènes végétales et donc de se concentrer uniquement sur les pixels de végétation pure, ce qui limite l'intérêt d'utiliser le *WDI*. Par ailleurs, en 2013, des images ont été acquises à intervalles de temps réguliers tout au long des journées d'expérimentation avec pour but d'établir des cinétiques journalières d'évolution des températures de couvert en fonction des conditions climatiques et de l'état hydrique du sol. L'ensemble de ces acquisitions permettra d'envisager l'utilisation d'autres indices comme le crop water stress index, *CWSI*. Certaines études récentes démontrent son intérêt pour caractériser l'évolution journalière de l'état de stress chez l'olivier (Agam et al., 2013) alors qu'il n'existe pas de travaux similaires pour le *WDI*, à notre connaissance. Néanmoins ces indices de stress, ont démontré leur capacité à discriminer les comportements de transpiration, mais ne sont pas encore utilisés pour les analyses de génétique quantitative. Ce travail a montré que le *WDI* était une variable héritable et des QTLs pouvaient être mis en évidence pour cette variable. Cependant l'absence de corrélation forte, ou de zone du génome commune avec les autres variables, notamment agronomiques (production fruitière), pose la question de la pertinence des variables intégratives pour l'analyse des déterminants génétiques. Chez les plantes annuelles, la variable simple $T_s - T_a$ est assez souvent utilisée pour étudier la variabilité de réponse à la sécheresse en lien avec le rendement. Ces études ont montré que les baisses de rendement en condition de sécheresse pouvaient être corrélées avec l'augmentation de température foliaire. Par ailleurs l'étude du déterminisme génétique des variables de température de couvert et de rendement a mis en évidence des QTLs co-localisant entre eux. Des résultats similaires ont été mis en évidence au cours de ce travail de thèse pour les variables de production fruitière et de température de feuillage (Chapitre 3 - Article 2).

II.3. Liens des variables agronomiques avec les indices spectraux

Au cours de ce travail de thèse une comparaison des variables d'imagerie avec des variables agronomiques plus intégratives comme le diamètre de tronc (*TCSA*) ou la production fruitière (nombre et biomasse de fruits par arbre) a aussi été réalisée. Les variables *TCSA* et biomasse de fruits ont montré des corrélations intéressantes avec les indices de végétation notamment avec le *NDVI*, mettant ainsi en évidence chez le pommier que cet indice pouvait servir de critère de vigueur pour en appréhender la variabilité. Au cours de cette thèse, la composition isotopique du carbone ($\delta^{13}C$) a aussi été envisagée pour évaluer l'efficacité d'utilisation de l'eau des pommiers et comparer cet indicateur à ceux extraits des images thermiques. Le choix de l'organe a été sujet à discussion. En effet, $\delta^{13}C$ est souvent mesuré à partir des organes foliaires mais peut aussi provenir de différents organes de la plante comme les cernes du bois ou encore les fruits (Brendel et al., 2002 ; Gaudillère et al., 2002, Marguerit et al., 2012). Comme chez le pommier adulte, plus de la moitié du carbone assimilé lors de la saison de végétation est dirigée vers les fruits, nous avons fait l'hypothèse que les fruits récoltés après 7 à 8 semaines de stress permettraient, au travers du carbone non structurel accumulé (sucres solubles et amidon), d'accéder au comportement transpiratoire des génotypes à l'échelle de la saison. Nos résultats ont montré une différence claire de $\delta^{13}C$ entre le jus des fruits des arbres stressés et non stressés, et une corrélation positive a pu être mise en évidence avec la variable *WDI* en conditions de stress. Toutefois, la médiocre répétabilité des résultats entre les deux répétitions de notre essai n'a pas permis de révéler un effet des génotypes. La préparation des jus pour l'analyse arbre par arbre a demandé une mise au point méthodologique, passant par un certain nombre d'étapes (élimination des acides organiques, notamment), qui a pu induire une altération d'une partie des échantillons. Comme les analyses isotopiques n'ont pu être effectuées que pour l'année 2011, il est actuellement impossible d'identifier la source du problème. L'analyse des échantillons de l'année 2012 pourrait permettre d'apporter une réponse à ce problème. L'analyse génétique de la variable $\delta^{13}C$, récemment conduite par d'autres auteurs sur le pommier (Glenn et Bassett, 2011 ; Glenn et al., 2014), reste donc à investiguer pour l'analyse de sa variabilité, ce qui permettra d'évaluer l'efficacité d'utilisation de l'eau dans la population hybride, et d'étudier, le cas échéant, ses déterminismes génétiques.

II.4. Classification des génotypes

Dans ce travail, l'accent a surtout été mis sur le phénotypage à haut débit et la comparaison relative des génotypes entre eux. Une première classification multicritères basée sur les variables de vigueur (*NDVI* et circonférence de tronc), de comportement transpiratoire (*WDI*) et de variation de température (sdT_sT_a) a déjà été réalisée et a fait l'objet d'une affiche scientifique au congrès international EPSO de 2012 (Annexe 5). Les résultats ont mis en évidence trois groupes principaux d'hybrides, sur la base des critères de vigueur (*NDVI* et circonférence de tronc), chaque groupe étant subdivisé en deux sous-groupes pour les caractères liés à la transpiration. La poursuite de ce travail devrait permettre d'identifier des génotypes présentant des caractéristiques et des réponses contrastées à la contrainte hydrique. Ces génotypes pourront alors faire l'objet d'approches écophysiologiques plus fines pour caractériser leur composition biochimique foliaire, leurs capacités photosynthétiques en conditions optimales et en réponse au stress (mesure d'assimilation du CO_2 et de fluorescence de la chlorophylle), et leur capacité d'interception du rayonnement lumineux. Ces génotypes contrastés pourront également servir de support à l'étude de gènes candidats (ce point sera développé dans la partie IV).

III. Méthodologie de traitement des données pour quantifier la réponse au stress

White et al. (2012) indiquent que l'analyse des données issues de séries temporelles sur les cultures est rendue difficile parce que beaucoup de traits observés sont auto-corrélés et intègrent les effets multiples des processus physiologiques sous-jacents, qui opèrent à différentes échelles de temps. L'analyse par modèle mixte aurait pu permettre de déceler des effets d'auto-corrélation (Piepho et al., 2004), mais cela aurait nécessité que les données soient acquises à pas de temps réguliers. Par ailleurs, les indices utilisés pour les analyses ne présentent pas tous la même sensibilité aux conditions environnementales. En effet, la température de couvert (T_s-T_a) est très fluctuante, et dépendante à la fois des variations

environnementales journalières et de la contrainte hydrique établie tout au long de la saison d'expérimentation, tandis qu'un indice de végétation comme le *NDVI* ne peut pas rendre compte des variations journalières, et les effets du stress sur cet indice ne sont quantifiables que sur une longue période (Dobrowski et al., 2005). L'incidence du stress hydrique sur l'indice de végétation peut résulter d'effets sur la morphologie du feuillage, comme nous avons pu l'observer sur certains génotypes de pommier, mais sans le mesurer, ceci rejoignant les constatations d'autres auteurs (par ex. Arndt et al., 2001 sur *Zizyphus*). D'autre part, l'analyse en données répétées pour étudier les effets de la réponse des plantes à la contrainte hydrique nécessiterait de pouvoir appliquer d'une date à l'autre et/ou d'une année à l'autre la même intensité de contrainte hydrique et d'acquérir les données dans les mêmes conditions climatiques. Il faut souligner ici que la réalisation d'états hydriques précis sur une population d'arbres dont la vigueur et le rythme de transpiration sont variables est quasiment irréalisable au champ. D'une part, il y a une hétérogénéité dans la progression temporelle de la contrainte hydrique appliquée à chaque individu, et d'autre part il y a sans doute des variations dans l'intensité de la contrainte finalement obtenue. Par ailleurs, il faut aussi noter que la parcelle de phénotypage est un dispositif de plantation randomisé, mais dans lequel chaque individu constitue une parcelle élémentaire sans bordures, pour laquelle on ne peut pas exclure des flux d'eau latéraux, de plante à plante, qui peuvent atténuer les différences d'état hydrique entre arbres voisins sur les rangs. La difficulté d'assurer la répétabilité des conditions environnementales d'une année à l'autre et les choix opérés dans la conduite de la contrainte hydrique sur la parcelle ont néanmoins été considérés pour les analyses statistiques et génétiques.

Ces éléments nous ont amené à privilégier la prise en compte des interactions génotype x date (GxD) et génotype x modalités de stress (GxM) dans des modèles mixtes plutôt que d'analyser les données de façon temporelle. Néanmoins, la réponse au stress a été mesurée sur les mêmes arbres à plusieurs dates successives. L'analyse des données a montré l'existence de fortes corrélations entre dates pour l'ensemble des variables issues des images. Il serait intéressant à la suite de ce travail de thèse d'investiguer conjointement les effets d'interactions et les structures des corrélations. Ceci nécessitera de mettre en œuvre des outils d'analyse statistique plus performants, car les packages utilisés lors de notre travail ne permettent actuellement de prendre compte que les effets (i) d'interactions (package R « lme4 » pour la fonction *lmer*) ou (ii) les structures de corrélations (package R « nlme » pour la fonction *lme*).

Bien que l'utilisation de modèles mixtes pour l'analyse génétique ait permis de prendre en considération les interactions génotype x environnement, notre étude ne constitue pas une approche multi-environnement à proprement parler, car les arbres étudiés se sont développés sur le même site d'étude et ont été confrontés aux mêmes conditions climatiques lors de leur développement. La plantation des mêmes populations de pommiers sur plusieurs sites géographiques (Montpellier et Angers) actuellement en cours de réalisation, ouvre de nouvelles perspectives de ce point de vue.

IV. De la mise en évidence de la variabilité génétique à l'analyse de ses déterminants

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence l'existence d'une variabilité génétique de la réponse foliaire à la contrainte hydrique dans la population biparentale de pommiers étudiée en conditions de plein champ. L'originalité de ce travail a reposé sur l'utilisation d'un ensemble d'indices issus de l'imagerie multi-spectrale et thermique pour balayer la population d'étude. L'ensemble des indices a montré une forte variabilité génétique que ce soit pour les variables ayant trait à la vigueur, à la production et à la transpiration ou pour leur réponse à la contrainte hydrique. D'autres travaux sur cultures céréalières (Comar et al., 2012 ; Rebetzke et al., 2013) et sur le cotonnier (Andrade-Sanchez et al., 2014), cultures au couvert relativement homogène, ont déjà démontré la pertinence de l'imagerie de proximité pour le phénotypage à haut débit en conditions de plein champ. Certaines de ces études ont par ailleurs montré que les indices de végétation sont fortement héréditaires. Dans ce travail de thèse, nous avons démontré qu'il est aussi possible d'appréhender la variabilité génétique d'une population d'arbres en réponse à la contrainte hydrique, en dépit d'une structure plus hétérogène de couvert.

La mise en correspondance de la variabilité phénotypique avec les variations alléliques à proximité des marqueurs moléculaires, le long de la carte génétique du croisement étudié, a permis d'aboutir à la détection de nombreux QTLs pour les variables issues de l'imagerie ainsi que pour les variables agronomiques. De ce point de vue, notre travail sur pommier est pionnier pour la mise en évidence de sa réponse variable aux conditions de stress en plein champ. Reymond et al. (2004) indiquent dans leurs travaux sur maïs que les QTLs détectés

uniquement en conditions de stress sont induits en réponse à ces conditions. Ils définissent par ailleurs qu'un trait adaptatif correspond à une altération de la structure ou d'une fonction pour modifier le comportement du génotype considéré en réponse au stress (exemple de la régulation stomatique qui permet au maïs d'exprimer un comportement conservatif de l'eau dans la plante). Les caractères adaptatifs présentent un intérêt certain pour les arbres fruitiers cultivés en zone semi-aride dont la survie dépend aussi de leur capacité à faire face aux conditions contraignantes sévissant de manière plus ou moins fréquente dans ces régions. Dans notre étude, les QTLs détectés en réponse à la contrainte hydrique sont liés à la régulation stomatique, et à la modification de la structure des arbres, qui influence l'interception lumineuse. L'investigation conduite sous ces zones QTLs (Chapitre 3 – Article 2) a permis d'identifier un certain nombre de gènes candidats, qui pourraient être exprimés ou réprimés lors de la réponse au stress. Ces gènes ont un rôle soit dans la biosynthèse de l'acide abscissique (ABA), soit dans transduction du signal qui aboutit à la fermeture stomatique. Ils constituent des cibles intéressantes pour de futures analyses d'expression comme celles qui sont amorcées au sein de l'équipe d'accueil. En particulier, une comparaison des transcriptomes de différents organes (feuille, apex, racines) entre les deux parents est en cours. Les gènes différentiellement exprimés en conditions standard et sous contrainte abiotique pourront alors être confrontés à ceux situés dans les zones QTLs.

Bernardo (2004) a montré par des approches de simulation que les principaux facteurs limitant la puissance de détection de QTL sont la taille de la population, l'héritabilité des caractères, ainsi que la nature plus ou moins polygénique de ceux-ci. Dans notre cas, pour l'ensemble des variables estimées héritables, toutes n'ont pas permis de détecter des QTLs pour la réponse au stress. L'effectif de la descendance reste relativement modeste (122 individus) ce qui a pu limiter la détection de certains QTLs dont la valeur de LOD était proche du seuil de significativité. L'utilisation de l'imagerie va permettre d'envisager l'étude de populations d'effectifs plus important, sur lesquelles la capacité de finement disséquer les déterminismes génétiques devrait être confirmée, y compris pour les traits de comportement. Bien que la descendance en ségrégation étudiée n'ait pas été initialement conçue pour caractériser la réponse à la contrainte hydrique, et en l'absence d'indications a priori sur les parents, le fort polymorphisme aux différents loci chez le pommier (Velasco et al., 2010) nous a permis d'obtenir une ségrégation importante. Le fait de ne pas détecter de QTL significatif en dépit d'une héritabilité élevée peut aussi provenir de la nature polygénique des caractères étudiés. Pour ces traits, de nombreuses zones du génome pourraient être impliquées dans la

variation du phénotype, ce qui empêcherait de détecter chacune d'elles (la valeur de LOD restant inférieur au seuil).

Comme ce travail a été effectué sur la seule population, « Starkrimson x Granny Smith », les QTLs détectés sont limités aux polymorphismes issus des deux parents, par recombinaison allélique. Il est donc souhaitable d'étendre la démarche à d'autres populations biparentales, éventuellement apparentées, pour poursuivre la recherche des sources de la tolérance à la contrainte hydrique, et pour analyser les QTLs communs ou au contraire spécifiques à chaque fond génétique. L'exploration d'une population de diversité est également une piste prometteuse. En effet, dans de telles populations, le nombre d'allèles présents est en principe maximisé (principe de constitution des core-collections). Cette voie est en cours de mise en œuvre grâce à l'implantation d'une core-collection de variétés anciennes à l'UE de Melgueil, dupliquant celle installée à l'INRA Angers, sur laquelle les méthodes de phénotypage développées dans ce travail pourront être déployées.

Une piste intéressante récemment suivie par Bassett et al. (2011) a d'ailleurs consisté à utiliser une large collection de Malus provenant pour partie de la zone d'origine (Kazakhstan), et comprenant des accessions du pommier *M. sieversii*, dont certaines présentent une forte tolérance à la sécheresse. De tels travaux permettent d'espérer l'identification de nouveaux mécanismes de résistance à la sécheresse. L'étude statistique des relations entre phénotype et génotype permettra par ailleurs de développer des études de génétique d'association.

V. Applications aux programmes de sélection

Ce travail de thèse a mis en avant un certain nombre d'interactions entre le génotype et l'environnement, que celui-ci soit représenté par la date (sous-entendant les conditions climatiques lors de l'acquisition) ou par la contrainte hydrique, pour les variables de vigueur et de transpiration. L'analyse des interactions entre le génotype et l'environnement est désormais considérée comme un critère important pour les programmes de sélection car selon les objectifs d'amélioration, la présence ou non d'interactions peut être souhaitée (Comstock et Moll, 1963). Si les objectifs concernent la sélection de variétés performantes dans de nombreux environnements, l'absence d'interaction avec l'environnement sera privilégiée. Par contre, si l'objectif visé est le développement de variétés adaptées à des environnements

particuliers (Passioura, 2012 ; Tardieu et Hammer, 2012), la recherche des interactions favorables sera recherchée. Avec le contexte de changement climatique, la sélection de variétés adaptées à des environnements bien caractérisés pour leurs contraintes climatiques est une piste intéressante à développer (Harrison et al., 2004).

Bien que son intérêt soit croissant, la prise en compte de la tolérance au stress hydrique reste actuellement moins prioritaire que la résistance aux pathogènes ou la qualité des fruits. Néanmoins, nous proposons que l’outil de phénotypage que constitue l’imagerie multi-spectrale puisse être appliqué dans des étapes tardives du processus de sélection des variétés (en aval des cribles pour d’autres caractères) pour tester leurs réponses à différents stress abiotiques. Ceci permettrait de caractériser les variétés en développement pour leurs capacités d’adaptation et ainsi de pouvoir préciser leur potentiel d’adaptation aux principales zones de cultures, et aussi en tenant compte d’éléments de prospective liés aux changements climatiques.

Conclusion

Ce travail de thèse a fait appel à de nombreuses connaissances et compétences, au croisement de différents champs disciplinaires. Du développement de système d'acquisition d'images à la mise en relation des données phénotypiques et génétiques, ce travail a ainsi mis à contribution et en interaction différents partenaires pour aboutir.

Au terme de ce travail, il faut souligner les innovations technologiques qui ont été réalisées autour de l'imagerie ouvrent un nouvel espace pour les scientifiques et permettant de surmonter le « bottleneck » du phénotypage au champ et sur couvert hétérogène. L'automatisation des procédures, la sécurisation du stockage des données, et la mise en place de databases ouvertes multi-opérateurs sont maintenant nécessaire pour faire progresser les connaissances sur la variabilité intra-spécifique, et exploiter cette connaissance dans le champ de la phénologie. Beaucoup reste donc à faire, mais une contribution significative a été apportée par ce travail, ouvrant la voie pour les recherches à venir.

Par ailleurs, l'exploration de la variation génétique basée sur des indices spectraux et des indicateurs plantes s'est avérée fructueuse. Les variables définies sur la base de l'imagerie multi-spectrale se sont révélées en majorité héréditaires, des QTLs ont été détectés et une première liste de gènes candidats cohérente avec des études réalisées sur d'autres espèces a été établie. Le champ d'investigation à venir est là aussi très grand avec le portage de la méthodologie en cours d'établissement sur de nouvelles populations et sur une core-collection de variétés françaises en cours d'installation sur l'UE INRA de Melgueil. Le transfert de la méthode est aussi envisagé sur des parcelles de génotypes en cours de sélection sur le pommier, et l'extension à d'autres espèces fruitières sera sans doute possible dans quelques années après consolidation des études conduites sur pommier. Enfin, la complexité des phénotypes d'arbres et de leur réponse aux conditions environnementales est loin d'être élucidée et de nombreuses questions biologiques restent à étudier, comme les dépendances entre années, les effets cumulatifs de stress hydrique et thermique en période estivale, les effets de compensation en période de fructification. Si les technologies mises en œuvre permettent de nouveaux points de vue, plus intégrés sur le végétal, à une résolution et un débit tout à fait nouveaux, l'exploration de ce flot de données devra se faire avec le regard de biologistes pour leur donner sens.

Références bibliographiques

- Agam N, Cohen Y, Berni JAJ, Alchanatis V, Kool D, Dag A, Yermiyahu U, Ben-Gal A. **2013**. An insight to the performance of crop water stress index for olive trees. *Agricultural Water Management* **118**: 79-86.
- Albrecht T, Wimmer V, Auinger H-J, Erbe M, Knaak C, Ouzunova M, Simianer H, Schön C-C. **2011**. Genome-based prediction of testcross values in maize. *Theoretical and Applied Genetics* **123**(2): 339-350.
- Allen RG, Pereira LS, Raes D, Smith M. **1998**. Crop evapotranspiration (guidelines of computing crop water requirements). FAO Rome (Italie). Irrigation and Drainage Paper Nr. 56, pp. 326.
- Amigues JP, Debaeke P, Itier B, Lemaire G, Seguin B, Tardieu F, Thomas A (éditeurs), **2006**. *Sécheresse et agriculture. Réduire la vulnérabilité de l'agriculture à un risque accru de manque d'eau*. Expertise scientifique collective, synthèse du rapport, INRA (France), 72 p.
- Andrade-Sanchez P, Gore MA, Heun JT, Thorp KR, Carmo-Silva AE, French AN, Salvucci ME, White JW. **2014**. Development and evaluation of a field-based high-throughput phenotyping platform. *Functional Plant Biology* **41**(1): 68-79.
- Andrews PK, Chalmers DJ, Moremong M. **1992**. Canopy air-temperature differences and soil-water as predictors of water-stress of apple-trees grown in a humid, temperate climate. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **117**(3): 453-458.
- Araus JL, Cairns JE. **2014**. Field high-throughput phenotyping: the new crop breeding frontier. *Trends in Plant Science* **19**(1): 52-61.
- Arndt S, Clifford S, Wanek W, Jones H, Popp M. **2001**. Physiological and morphological adaptations of the fruit tree *Ziziphus rotundifolia* in response to progressive drought stress. *Tree Physiology* **21**: 705-715.
- Atkinson CJ, Policarpo M, Webster AD, Kingswell G. **2000**. Drought tolerance of clonal Malus determined from measurements of stomatal conductance and leaf water potential. *Tree Physiology* **20**(8): 557-563.
- Babar MA, van Ginkel M, Klatt A, Prasad B, Reynolds MP. **2006**. The potential of using spectral reflectance indices to estimate yield in wheat grown under reduced irrigation. *Euphytica* **150**(1-2): 155-172.
- Bassett CL. **2013**. *Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture*. InTech, doi: 10.5772/55537
- Bassett CL, Glenn DM, Forsline PL, Wisniewski ME, Farrell RE. **2011**. Characterizing

Water Use Efficiency and Water Deficit Responses in Apple (*Malus domestica* Borkh. and *Malus sieversii* Ledeb.) M. Roem. *Hortscience* **46**(8): 1079-1084.

Bégué A, Lebourgeois V, Bappel E, Todoroff P, Pellegrino A, Baillarin F, Siegmund B. 2010. Spatio-temporal variability of sugarcane fields and recommendations for yield forecast using NDVI. *International Journal of Remote Sensing* **31**(20): 5391-5407.

Behboudian MH, Dixon J, Pothamshetty K. 1998. Plant and fruit responses of lysimeter-grown 'Braeburn' apple to deficit irrigation. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **73**(6): 781-785.

Behboudian MH, Mills TM. 1997. Deficit irrigation in deciduous orchards. *Horticultural Reviews* **21**: 105-131.

Bernardo R. 2004. What proportion of declared QTL in plants are false? *Theoretical and Applied Genetics* **109**(2): 419-424.

Berni J, Zarco-Tejada PJ, Suarez L, Fereres E. 2009. Thermal and Narrowband Multispectral Remote Sensing for Vegetation Monitoring From an Unmanned Aerial Vehicle. *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing* **47**(3): 722-738.

Berni JAJ, Zarco-Tejada PJ, Sepulcre-Canto G, Fereres E, Villalobos F. 2009. Mapping canopy conductance and CWSI in olive orchards using high resolution thermal remote sensing imagery. *Remote Sensing of Environment* **113**(11): 2380-2388.

Bimpong IK, Serraj R, Chin J, Mendoza EMT, Hernandez J, Mendioro MS. 2011. Determination of genetic variability for physiological traits related to drought tolerance in African rice (*Oryza glaberrima*). *Journal of Plant Breeding and Crop Science* **3**(4): 60-67.

Blum A. 2005. Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential: are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? *Australian Journal of Agricultural Research* **56**(11): 1159-1168.

Blum A. 2009. Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. *Field Crops Research* **112**(2-3): 119-123.

Brendel O, Pot D, Plomion C, Rozenberg P, Guehl JM. 2002. Genetic parameters and QTL analysis of delta¹³C and ring width in maritime pine. *Plant Cell and Environment* **25**(8): 945-953.

Brendel O, Thiec D, Scotti-Saintagne C, Bodénès C, Kremer A, Guehl J-M. 2008. Quantitative trait loci controlling water use efficiency and related traits in *Quercus robur* L. *Tree Genetics & Genomes* **4**(2): 263-278.

Brown SK. 1992. Genetics of apple. *Plant Breeding Reviews* **9**: 333-366.

- Brun L, Didelot F, Parisi L. 2008.** Effects of apple cultivar susceptibility to *Venturia inaequalis* on scab epidemics in apple orchards. *Crop Protection* **27**(6): 1009-1019.
- Buckley TN. 2005.** The control of stomata by water balance. *New Phytologist* **168**(2): 275-292.
- Bus VM, Bassett HM, Bowatte D, Chagné D, Ranatunga C, Ulluwishewa D, Wiedow C, Gardiner S. 2010.** Genome mapping of an apple scab, a powdery mildew and a woolly apple aphid resistance gene from open-pollinated mildew immune selection. *Tree Genetics & Genomes* **6**(3): 477-487.
- Caffier V, Laurens F. 2005.** Breakdown of Pl2, a major gene of resistance to apple powdery mildew, in a French experimental orchard. *Plant Pathology* **54**(2): 116-124.
- Calderon R, Navas-Cortes JA, Lucena C, Zarco-Tejada PJ. 2013.** High-resolution airborne hyperspectral and thermal imagery for early, detection of *Verticillium* wilt of olive using fluorescence, temperature and narrow-band spectral indices. *Remote Sensing of Environment* **139**: 231-245.
- Calenge F, Van der Linden CG, Van de Weg E, Schouten HJ, Van Arkel G, Denance C, Durel CE. 2005.** Resistance gene analogues identified through the NBS-profiling method map close to major genes and QTL for disease resistance in apple. *Theoretical and Applied Genetics* **110**(4): 660-668.
- Carlson TN, Ripley DA. 1997.** On the relation between NDVI, fractional vegetation cover, and leaf area index. *Remote Sensing of Environment* **62**(3): 241-252.
- Casasoli M, Pot D, Plomion C, Monteverdi MC, Barreneche T, Lauteri M, Villani F. 2004.** Identification of QTLs affecting adaptive traits in *Castanea sativa* Mill. *Plant, Cell & Environment* **27**(9): 1088-1101.
- Chaerle L, Lenk S, Leinonen I, Jones HG, Van Der Straeten D, Buschmann C. 2009.** Multi-sensor plant imaging: Towards the development of a stress-catalogue. *Biotechnology Journal* **4**(8): 1152-1167.
- Chagné D, Kui LW, Espley RV, Volz RK, How NM, Rouse S, Brendolise C, Carlisle CM, Kumar S, De Silva Net al. 2013.** An ancient duplication of apple MYB transcription factors is responsible for novel red fruit-flesh phenotypes. *Plant Physiology* **161**(1): 225-239.
- Chaves MM, Maroco JP, Pereira JS. 2003.** Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* **30**(3): 239-264.
- Chaves MM, Zarrouk O, Francisco R, Costa JM, Santos T, Regalado AP, Rodrigues ML, Lopes CM. 2010.** Grapevine under deficit irrigation: hints from physiological and molecular data. *Annals of Botany* **105**(5): 661-676.

- Chevreau E, Lespinasse Y, Gallet M. 1985.** Inheritance of pollen enzymes and polyploid origin of apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Theoretical and Applied Genetics* **71**(2): 268-277.
- Christmann A, Weiler EW, Steudle E, Grill E. 2007.** A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. *The Plant Journal* **52**(1): 167-174.
- Clarke TR. 1997.** An empirical approach for detecting crop water stress using multispectral airborne sensors. *HortTechnology* **7**(1): 9-16.
- Coart E, Van Glabeke S, De Loose M, Larsen AS, Roldan-Ruiz I. 2006.** Chloroplast diversity in the genus *Malus*: new insights into the relationship between the European wild apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) and the domesticated apple (*Malus domestica* Borkh.). *Molecular Ecology* **15**(8): 2171-2182.
- Cohen S, Naor A. 2002.** The effect of three rootstocks on water use, canopy conductance and hydraulic parameters of apple trees and predicting canopy from hydraulic conductance. *Plant Cell and Environment* **25**: 17-28.
- Comar A, Baret F, Obein G, Simonot L, Meneveaux D, Vienot F, de Solan B. 2014.** ACT: A leaf BRDF model taking into account the azimuthal anisotropy of monocotyledonous leaf surface. *Remote Sensing of Environment* **143**: 112-121.
- Comar A, Burger P, de Solan B, Baret F, Daumard F, Hanocq JF. 2012.** A semi-automatic system for high throughput phenotyping wheat cultivars in-field conditions: description and first results. *Functional Plant Biology* **39**(10-11): 914-924.
- Comstock RE, Moll RH. 1963.** Genotype-environment interactions. In: *Statistical genetics and plant breeding*. WD. Hanson and HF Robinson (eds). Nat. Acad. Sci.-Nat. Res. Council, 1963, Washington DC, pp. 164-196.
- Cornille A, Gladioux P, Smulders MJM, Roldan-Ruiz I, Laurens F, Le Cam B, Nersesyan A, Clavel J, Olonova M, Feugey L et al. 2012.** New insight into the history of domesticated apple: secondary contribution of the European wild apple to the genome of cultivated varieties. *Plos Genetics* **8**(5). e1002703
- Costes E, Lauri PÉ, Laurens F, Durel CE, Parisi L. 2009.** Construire un idéotype de variétés de pommier pour des vergers agronomiquement performants et à faibles intrants. *Innovations Agronomiques* **7**: 49-64.
- Daszkowska-Golec A, Szarejko I. 2013.** Open or close the gate - stomata action under the control of phytohormones in drought stress conditions. *Frontiers in Plant Science* **4**, 138.
- Davies WJ, Zhang J. 1991.** Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying Soil. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**(1):

55-76.

De Micco V, Aronne G 2012. Morpho-anatomical traits for plant adaptation to drought. In: Aroca R ed. *Plant Responses to Drought Stress*: Springer Berlin Heidelberg, 37-61.

Della-Marta PM, Luterbacher J, von Weissenfluh H, Xoplaki E, Brunet M, Wanner H. 2007. Summer heat waves over Western Europe 1880-2003, their relationship to large-scale forcings and predictability. *Climate Dynamics* **29**(2-3): 251-275.

Dennis FG, Jr. 2000. The history of fruit thinning. *Plant Growth Regulation* **31**(1-2): 1-16.

de Vienne D, Causse M. 1998. La cartographie et la caractérisation des locus contrôlant la variation des caractères quantitatifs. In: de Vienne D, ed. *Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales*. Paris, France: INRA, 89-118.

Dickmann DI, Gold MA, Flore JA. 1994. The ideotype concept and the genetic improvement of tree crops. *Plant Breeding Reviews* **12**: 163-193.

Disney M, Lewis P, Saich P. 2006. 3D modelling of forest canopy structure for remote sensing simulations in the optical and microwave domains. *Remote Sensing of Environment* **100**(1): 114-132.

Dobrowski SZ, Pushnik JC, Zarco-Tejada PJ, Ustin SL. 2005. Simple reflectance indices track heat and water stress-induced changes in steady-state chlorophyll fluorescence at the canopy scale. *Remote Sensing of Environment* **97**(3): 403-414.

Doltra J, Oncins J, Bonany J, Cohen M. 2007. Evaluation of plant-based water status indicators in mature apple trees under field conditions. *Irrigation Science* **25**(4): 351-359.

Domec JC, Johnson DM. 2012. Does homeostasis or disturbance of homeostasis in minimum leaf water potential explain the isohydric versus anisohydric behavior of *Vitis vinifera* L. cultivars? *Tree Physiology* **32**(3): 245-248.

Durel CE, Denancé C, Brisset MN. 2009. Two distinct major QTL for resistance to fire blight co-localize on linkage group 12 in apple genotypes 'Evereste' and *Malus floribunda* clone 821. *Genome* **52**(2): 139-147.

Ebel RC, Proebsting EL, Evans RG. 2001. Apple tree and fruit responses to early termination of irrigation in a semi-arid environment. *Hortscience* **36**(7): 1197-1201.

Ebel RC, Proebsting EL, Patterson ME. 1993. Regulated deficit irrigation may alter apple maturity, quality, and storage life. *Hortscience* **28**(2): 141-143.

Ebel, R.C. 1991. Apple tree and fruit response to drought. Pullman, Washington State University (Ph.D. Thesis).

Efthymiadis D, Goodess CM, Jones PD. 2011. Trends in Mediterranean gridded temperature extremes and large-scale circulation influences. *Natural Hazards and Earth*

System Sciences **11**(8): 2199-2214.

Ehleringer JR, Cooper TA. 1992. On the role of orientation in reducing photoinhibitory damage in photosynthetic-twig desert shrubs. *Plant Cell and Environment* **15**(3): 301-306.

Einhorn T, Caspari HW. 2004. Partial rootzone drying and deficit irrigation of 'Gala' apples in a semi-arid climate. *Acta Horticulturae* **664**: 197-204.

Evans RC, Campbell CS. 2002. The origin of the apple subfamily (Maloideae; Rosaceae) is clarified by DNA sequence data from duplicated GBSSI genes. *American Journal of Botany* **89**(9): 1478-1484.

Evans RG, Sadler EJ. 2008. Methods and technologies to improve efficiency of water use. *Water Resources Research* **44**:W00E04. doi:10.1029/2007WR006200.

Failla O, Zocchi G, Treccani C, Cocucci S. 1992. Growth, development and mineral-content of apple fruit in different water status conditions. *Journal of Horticultural Science* **67**(2): 265-271.

Farquhar GD, Ehleringer JR, Hubick KT. 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**: 503-537.

Farquhar GD, Richards RA. 1984. Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Australian Journal of Plant Physiology* **11**(6): 539-552.

Ferree DC, Schmid JC. 1990. Performance of apple rootstock, cultivars and cultural treatments under the stress of the 1988 drought. *Research Circular - Ohio Agricultural Research and Development Center* **297**: 25-36.

Furbank RT, Tester M. 2011. Phenomics - technologies to relieve the phenotyping bottleneck. *Trends in Plant Science* **16**(12): 635-644.

Gallais A. 1989. *Théorie de la sélection en amélioration des plantes*. Masson, Paris, 588p.

Gamon JA, Serrano L, Surfus JS. 1997. The photochemical reflectance index: an optical indicator of photosynthetic radiation use efficiency across species, functional types, and nutrient levels. *Oecologia* **112**(4): 492-501.

Gardiner SE, Bus VGM, Rusholme RL, Chagne D, Rikkerink EHA. 2007. *Apple*. In: Genome mapping and molecular breeding in plants, Vol. 4, Fruits and Nuts, chapter 1. C. Kole (ed.). Springer Verlag Heidelberg, Berlin, pp. 1-62.

Gardner BR, Nielsen DC, Shock CC. 1992. Infrared thermometry and the Crop Water Stress Index. II. Sampling Procedures and Interpretation. *Journal of Production Agriculture*

5(4): 466-475.

Gaudillère JP, Van Leeuwen C, Ollat N. 2002. Carbon isotope composition of sugars in grapevine, an integrated indicator of vineyard water status. *Journal of Experimental Botany* **53**(369): 757-763.

Gessler C, Patocchi A, Sansavini S, Tartarini S, Gianfranceschi L. 2006. Venturia inaequalis resistance in apple. *Critical Reviews in Plant Sciences* **25**(6): 473-503.

Gholipoor M, Sinclair TR, Prasad PVV. 2012. Genotypic variation within sorghum for transpiration response to drying soil. *Plant and Soil* **357**(1-2): 35-40.

Giorgi F, Lionello P. 2008. Climate change projections for the Mediterranean region. *Global and Planetary Change* **63**(2-3): 90-104.

Girona J, Mata M, Del Campo J, Marsal J. 2008. Manejo del riego del manzano en condiciones de sequía extrema. Dossier Tècnic DAR (Geeneralitat de Catalunya) **30**:5-8.

Girona J, Del-Campo J, Bonastre N, Paris C, Mata M, Arbones A, Marsal J. 2010a. Evaluation of different irrigation strategies on apple (Malus domestica). Physiological and productive results. *Acta Horticulturae* (in press).

Girona J, Behboudian MH, Mata M, Del Campo J, Marsal J. 2010. Exploring six reduced irrigation options under water shortage for 'Golden Smoothee' apple: Responses of yield components over three years. *Agricultural Water Management* **98**(2): 370-375.

Glenn DM. 2014. An analysis of ash and isotopic carbon discrimination ($\Delta^{13}\text{C}$) methods to evaluate water use efficiency in apple. *Scientia Horticulturae* **171**: 32-36.

Glenn EP, Nagler PL, Huete AR. 2010. Vegetation Index methods for estimating evapotranspiration by remote sensing. *Surveys in Geophysics* **31**(6): 531-555.

Goldsmith GR. 2013. Changing directions: the atmosphere-plant-soil continuum. *New Phytologist* **199**(1): 4-6.

González-Dugo V, Zarco-Tejada P, Berni JAJ, Suárez L, Goldhamer D, Fereres E. 2012. Almond tree canopy temperature reveals intra-crown variability that is water stress-dependent. *Agricultural and Forest Meteorology* **154-155**: 156-165.

Grant OM, Davies MJ, James CM, Johnson AW, Leinonen I, Simpson DW. 2012. Thermal imaging and carbon isotope composition indicate variation amongst strawberry (Fragaria x ananassa) cultivars in stomatal conductance and water use efficiency. *Environmental and Experimental Botany* **76**: 7-15.

Grattapaglia D, Sederoff R. 1994. Genetic linkage maps of Eucalyptus grandis and Eucalyptus urophylla using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics* **137**(4): 1121-1137.

- Guehl JM, Picon C, C. S 1995.** Discrimination isotopique du carbone et efficence d'utilisation de l'eau chez les arbres forestiers. In: (France) I ed. *Utilisation des isotopes stables pour l'étude du fonctionnement des plantes*. Paris, December 16-17, 1993, 83-113.
- Guillon B, Kelner JJ, Velasco R, Gardiner SE, Chagné D, Costes E. 2012.** Genetic control of biennial bearing in apple. *Journal of Experimental Botany* **63**(1): 131-149.
- Haboudane D, Miller JR, Pattey E, Zarco-Tejada PJ, Strachan IB. 2004.** Hyperspectral vegetation indices and novel algorithms for predicting green LAI of crop canopies: Modeling and validation in the context of precision agriculture. *Remote Sensing of Environment* **90**(3): 337-352.
- Hanson WD 1963.** Heritability. In: *Statistical genetics and plant breeding*. WD Hanson & HF Robinson (eds). Nat. Acad. Sci.-Nat. Res. Council, 982, Washington DC, pp. 125-140.
- Holland JB. 2007.** Genetic architecture of complex traits in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **10**(2): 156-161.
- Harrison MT, Tardieu F, Dong Z, Messina CD, Hammer GL. 2014.** Characterizing drought stress and trait influence on maize yield under current and future conditions. *Global Change Biology* **20**(3): 867-878.
- Huete A, Didan K, Miura T, Rodriguez EP, Gao X, Ferreira LG. 2002.** Overview of the radiometric and biophysical performance of the MODIS vegetation indices. *Remote Sensing of Environment* **83**(1-2): 195-213.
- Idso SB, Jackson RD, Pinter PJ, Reginato RJ, Hatfield JL. 1981.** Normalizing the stress-degree-day parameter for environmental variability. *Agricultural Meteorology* **24**(1): 45-55.
- Intergovernmental Panel on Climate Change. 2014.** Climate change 2014, mitigation of climate change. Contribution of Working Group III to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Summary for Policymakers. O Edenhofer, R Pichs-Madruga R, Y Sokona Y (eds.) Cambridge, UK & New York, NY, USA. Cambridge University Press.
- Jackson RB, Sperry JS, Dawson TE. 2000.** Root water uptake and transport: using physiological processes in global predictions. *Trends in Plant Science* **5**(11): 482-488.
- Jackson RD, Idso SB, Reginato RJ, Pinter PJ. 1981.** Canopy temperature as a crop water-stress indicator. *Water Resources Research* **17**(4): 1133-1138.
- Jackson SA, Iwata A, Lee SH, Schmutz J, Shoemaker R. 2011.** Sequencing crop genomes: approaches and applications. *New Phytologist* **191**(4): 915-925.
- Jansen RC. 1993.** Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* **135**(1): 205-211.

- Jones HG. 1992.** Plants and microclimate: a quantitative approach to environmental plant physiology. *Cambridge [USA]: University Press*: 428 pp.
- Jones HG. 1999.** Use of thermography for quantitative studies of spatial and temporal variation of stomatal conductance over leaf surfaces. *Plant, Cell & Environment* **22**(9): 1043-1055.
- Jones HG, Serraj R, Loveys BR, Xiong LZ, Wheaton A, Price AH. 2009.** Thermal infrared imaging of crop canopies for the remote diagnosis and quantification of plant responses to water stress in the field. *Functional Plant Biology* **36**(10-11): 978-989.
- Juniper BE, Watkins R, Harris SA 1999.** The origin of the apple. *Acta Horticulturae* **484**: 27-33.
- Juniper BE, Mabberley DJ. 2006.** The story of the apple. Portland, Oregon, USA: Timber Press (OR).
- Korban SS, Skirvin RM. 1984.** Nomenclature of the cultivated apple. *Hortscience* **19**(2): 177-180.
- Kumar L, Schmidt K, Dury S, Skidmore A. 2001.** Imaging spectrometry and vegetation science. In: Meer Fvd, Jong SD (eds). *Imaging Spectrometry*: Springer, the Netherlands, 111-155.
- Landsberg JJ, Beadle PV, Biscoe DR, Butler B, Davidson LD, Incoll GB, James PG, Jarvis PJ, Martin RE, Neilson DBB et al. 1975.** Diurnal energy, water and CO₂ exchanges in an apple orchard. *Journal of Applied Ecology* **12**: 659-684.
- Lakso AN. 2014.** Comparing Water Use Efficiency of apples and grapes – physiological and morphological aspect. *Acta horticulturae* **1038**: 67-72.
- Larcher W. 2000.** Temperature stress and survival ability of Mediterranean sclerophyllous plants. *Plant Biosystems* **134**(3): 279-295.
- Larrieu JF. 2004.** Les effets de la canicule et de la sécheresse. *Réussir Fruits et Légumes* **231**: 44-45.
- Laurens F, Audergon JM, Claverie J, Duval H, Germain E, Kervella J, Le Lezec M, Lauri PÉ, Lespinasse JM. 2000.** Integration of architectural types in French programmes of ligneous fruit species genetic improvement. *Fruits (Paris)* **55**(2): 141-152.
- Laurens F, Durel CE, Patocchi A, Peil A, Salvi S, Tartarini S, Velasco R, van de Weg E. 2010.** Review on apple genetics and breeding programmes and presentation of a new European initiative to increase fruit breeding efficiency. *Journal of fruit science* **27**: 102-107.
- Laurens F, Lespinasse Y, Fouillet A. 2005.** A new scab-resistant apple: 'Ariane'. *Hortscience* **40**(2): 484-485.

- Lauri PÉ, Gorza O, Cochard H, Martinez S, Celton JM, Ripetti V, Lartaud M, Bry X, Trottier C, Costes E. 2011.** Genetic determinism of anatomical and hydraulic traits within an apple progeny. *Plant Cell and Environment* **34**(8): 1276-1290.
- Lebourgeois V, Bégué A, Labbé S, Houllès M, Martine J. 2012.** A light-weight multi-spectral aerial imaging system for nitrogen crop monitoring. *Precision Agriculture*: 13(5): 525-541.
- Lebourgeois V, Bégué A, Labbé S, Mallavan B, Prévot L, Roux B. 2008.** Can commercial digital cameras be used as multispectral sensors? A crop monitoring test. *Sensors* **8**(11): 7300-7322.
- Lebourgeois V, Chopart JL, Bégué A, Le Mezo L. 2010.** Towards using a thermal infrared index combined with water balance modelling to monitor sugarcane irrigation in a tropical environment. *Agricultural Water Management* **97**(1): 75-82.
- Leib BG, Caspari HW, Redulla CA, Andrews PK, Jabro JJ. 2006.** Partial rootzone drying and deficit irrigation of 'Fuji' apples in a semi-arid climate. *Irrigation Science* **24**(2): 85-99.
- Levitt J. 1980.** *Responses of plants to environmental stresses. Volume II. Water, radiation, salt, and other stresses.* London, UK: Academic Press.
- Liu BH, Cheng L, Liang D, Zou YJ, Ma FW. 2012.** Growth, gas exchange, water-use efficiency, and carbon isotope composition of 'Gala' apple trees grafted onto 9 wild Chinese rootstocks in response to drought stress. *Photosynthetica* **50**(3): 401-410.
- Liu BH, Cheng L, Ma FW, Zou YJ, Liang D. 2012.** Growth, biomass allocation, and water use efficiency of 31 apple cultivars grown under two water regimes. *Agroforestry Systems* **84**(2): 117-129.
- Lovisolo C, Perrone I, Carra A, Ferrandino A, Flexas J, Medrano H, Schubert A. 2010.** Drought-induced changes in development and function of grapevine (*Vitis* spp.) organs and in their hydraulic and non-hydraulic interactions at the whole-plant level: a physiological and molecular update. *Functional Plant Biology* **37**(2): 98-116.
- Lovisolo C, Schubert A. 1998.** Effects of water stress on vessel size and xylem hydraulic conductivity in *Vitis vinifera* L. *Journal of Experimental Botany* **49**(321): 693-700.
- Luquet D, Vidal A, Dauzat J, Bégué A, Olioso A, Clouvel P. 2004.** Using directional TIR measurements and 3D simulations to assess the limitations and opportunities of water stress indices. *Remote Sensing of Environment* **90**(1): 53-62.
- Ma X, Ma F, Li C, Mi Y, Bai T, Shu H. 2010.** Biomass accumulation, allocation, and water-use efficiency in 10 *Malus* rootstocks under two watering regimes. *Agroforestry Systems* **80**(2): 283-294.

- Mabberley DJ, Jarvis CE, Juniper BE. 2001.** The name of the apple. *Telopea* **9**(2): 421-430.
- Makeredza B, Schmeisser M, Lotze E, Steyn WJ. 2013.** Water stress increases sunburn in 'Cripps' Pink' apple. *Hortscience* **48**(4): 444-447.
- Marguerit E, Brendel O, Lebon E, Van Leeuwen C, Ollat N. 2012.** Rootstock control of scion transpiration and its acclimation to water deficit are controlled by different genes. *New Phytologist* **194**(2): 416-429.
- Marino G, Pallozzi E, Coccozza C, Tognetti R, Giovannelli A, Cantini C, Centritto M. 2014.** Assessing gas exchange, sap flow and water relations using tree canopy spectral reflectance indices in irrigated and rainfed *Olea europaea* L. *Environmental and Experimental Botany* **99**: 43-52.
- Mason RE, Hays DB, Mondal S, Ibrahim AMH, Basnet BR. 2013.** QTL for yield, yield components and canopy temperature depression in wheat under late sown field conditions. *Euphytica* **194**(2): 243-259.
- Massonnet C, Costes E, Rambal S, Dreyer E, Regnard JL. 2007.** Stomatal regulation of photosynthesis in apple leaves: Evidence for different water-use strategies between two cultivars. *Annals of Botany* **100**(6): 1347-1356.
- Masuka B, Araus JL, Das B, Sonder K, Cairns JE. 2012.** Phenotyping for Abiotic Stress Tolerance in Maize. *Journal of Integrative Plant Biology* **54**(4): 238-249.
- Mathieu V. 2011.** Cycle de développement dupommier. L'influence des conditions climatiques. Info CTIFL 277
- McDonald AJS, Davies WJ. 1996.** Keeping in touch: responses of the whole plant to deficits in water and hydrogen supply. *Advances in botanical research*. London, England: Academic Press Inc., 229-300.
- McDowell N, Pockman WT, Allen CD, Breshears DD, Cobb N, Kolb T, Plaut J, Sperry J, West A, Williams DG, Yezzer EA. 2008.** Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? *New Phytologist* **178**(4): 719-739.
- Micheletti D, Troggio M, Salamini F, Viola R, Velasco R, Salvi S. 2011.** On the evolutionary history of the domesticated apple. *Nature Genetics* **43**(11): 1044-1045.
- Mills TM, Behboudian MH, Tan PY, Clothier BE. 1994.** Plant water status and fruit-quality in braeburn apples. *Hortscience* **29**(11): 1274-1278.
- Mir RR, Zaman-Allah M, Sreenivasulu N, Trethowan R, Varshney RK. 2012.** Integrated genomics, physiology and breeding approaches for improving drought tolerance in crops.

Theoretical and Applied Genetics **125**(4): 625-645.

Monclus R, Dreyer E, Delmotte FM, Villar M, Delay D, Boudouresque E, Petit JM, Marron N, Bréchet C, Brignolas F. 2005. Productivity, leaf traits and carbon isotope discrimination in 29 *Populus deltoides* x *P. nigra* clones. *New Phytologist* **167**(1): 53-62.

Monclus R, Dreyer E, Villar M, Delmotte FM, Delay D, Petit JM, Barbaroux C, le Thiec D, Bréchet C, Brignolas F. 2006. Impact of drought on productivity and water use efficiency in 29 genotypes of *Populus deltoides* x *Populus nigra*. *New Phytologist* **169**(4): 765-777.

Monclus R, Villar M, Barbaroux C, Bastien C, Fichot R, Delmotte FM, Delay D, Petit JM, Bréchet C, Dreyer E, Brignolas F. 2009. Productivity, water-use efficiency and tolerance to moderate water deficit correlate in 33 poplar genotypes from a *Populus deltoides* * *Populus trichocarpa* F1 progeny. *Tree Physiology* **29**(11): 1329-1339.

Monteith JL. 1965. "Evaporation and environment". *Symposia of the Society for Experimental Biology* **19**: 205–224.

Moran MS, Clarke TR, Inoue Y, Vidal A. 1994. Estimating crop water-deficit using the relation between surface-air temperature and spectral vegetation index. *Remote Sensing of Environment* **49**(3): 246-263.

Moran MS, Inoue Y, Barnes EM. 1997. Opportunities and limitations for image-based remote sensing in precision crop management. *Remote Sensing of Environment* **61**(3): 319-346.

Mpelasoka B, Behboudian M, Green S. 2001. Water use, yield and fruit quality of lysimeter-grown apple trees: responses to deficit irrigation and to crop load. *Irrigation Science* **20**(3): 107-113.

Mpelasoka BS, Behboudian MH, Mills TM. 2001. Effects of deficit irrigation on fruit maturity and quality of 'Braeburn' apple. *Scientia Horticulturae* **90**(3–4): 279-290.

Myles S. 2013. Improving fruit and wine: what does genomics have to offer? *Trends in Genetics* **29**(4): 190-196.

Naor A. 2006. Irrigation scheduling and evaluation of tree water status in deciduous orchards. *Horticultural Reviews* **32**: 111-165.

Naor A, Klein I, Doron I. 1995. Stem water potential and apple size. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **120**(4): 577-582.

Naor A, Naschitz S, Peres M, Gal Y. 2008. Responses of apple fruit size to tree water status and crop load. *Tree Physiology* **28**(8): 1255-1261.

Naschitz S, Naor A, Genish S, Wolf S, Goldschmidt EE. 2010. Internal management of non-structural carbohydrate resources in apple leaves and branch wood under a broad range of

sink and source manipulations. *Tree Physiology* **30**(6): 715-727.

Nobel PS. 2009. Physicochemical and environmental plant physiology, 4th edn. Oxford, UK: CA Academic Press/Elsevier. 582p.

Parisi L, Fouillet V, Schouten HJ, Groenwold R, Laurens F, Didelot F, Evans K, Fischer C, Gennari F, Kemp Het al. 2004. Variability of the pathogenicity of *Venturia inaequalis* in Europe. In: Laurens F, Evans K eds. *Proceedings of the XIth Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics, Vols 1 and 2*. Leuven 1: International Society Horticultural Science, 107-113.

Passioura JB. 2012. Phenotyping for drought tolerance in grain crops: when is it useful to breeders? *Functional Plant Biology* **39**(11): 851-859.

Payero JO, Neale CMU, Wright JL. 2005. Estimating soil heat flux for alfalfa and clipped tall fescue grass. *Applied Engineering in Agriculture* **21**(3): 401-409.

Peng Y, Gitelson AA. 2011. Application of chlorophyll-related vegetation indices for remote estimation of maize productivity. *Agricultural and Forest Meteorology* **151**(9): 1267-1276.

Peñuelas J, Baret F, Filella I. 1995. Semiempirical indexes to assess carotenoids chlorophyll-a ratio from leaf spectral reflectance. *Photosynthetica* **31**(2): 221-230.

Peñuelas J, Gamon JA, Fredeen AL, Merino J, Field CB. 1994. Reflectance indices associated with physiological changes in nitrogen- and water-limited sunflower leaves. *Remote Sensing of Environment* **48**(2): 135-146.

Petropoulos G, Carlson TN, Wooster MJ, Islam S. 2009. A review of T-s/VI remote sensing based methods for the retrieval of land surface energy fluxes and soil surface moisture. *Progress in Physical Geography* **33**(2): 224-250.

Piepho HP, Buchse A, Richter C. 2004. A mixed modelling approach for randomized experiments with repeated measures. *Journal of Agronomy and Crop Science* **190**(4): 230-247.

Pinter Jr PJ, Hatfield JL, Schepers J, Barnes EM, Moran MS, Daughtry CST, Upchurch D. 2003. Remote Sensing for Crop Management. *Photogrammetric Engineering & Remote Sensing* **69**(6): 647-664.

Powell DBB. 1974. Some effects of water stress in late spring on apple trees. *Journal of Horticultural Science* **49**(3): 257-272.

Pretorius JJB, Wand SJE. 2003. Late-season stomatal sensitivity to microclimate is influenced by sink strength and soil moisture stress in 'Braestar' apple trees in South Africa. *Scientia Horticulturae* **98**(2): 1-15.

Price AH. 2006. Believe it or not, QTLs are accurate! *Trends in Plant Science* **11**(5): 213-216.

- Prioul J-L, Quarrie S, Causse M, de Vienne D. 1997.** Dissecting complex physiological functions through the use of molecular quantitative genetics. *Journal of Experimental Botany* **48**(6): 1151-1163.
- Qian GZ, Liu LF, Tang GG. 2010.** (1933) Proposal to conserve the name *Malus domestica* against *M. pumila*, *M. communis*, *M. frutescens*, and *Pyrus dioica* (Rosaceae). *Taxon* **59**(2): 650-652.
- Rebetzke GJ, Rattey AR, Farquhar GD, Richards RA, Condon AG. 2013.** Genomic regions for canopy temperature and their genetic association with stomatal conductance and grain yield in wheat. *Functional Plant Biology* **40**(1): 14-33.
- Regnard JL, Ducrey M, Porteix E, Segura V, Costes E. 2008.** Phenotyping apple progeny for ecophysiological traits: how and what for? *Acta Horticulturae* **772**: 151-158.
- Regnard JL, Segura V, Merveille N, Durel CE, Costes E. 2009.** QTL analysis for leaf gas exchange in an apple progeny grown under atmospheric constraints. *Acta Horticulturae* **814**: 369-374.
- Reymond M, Muller B, Tardieu F. 2004.** Dealing with the genotype×environment interaction via a modelling approach: a comparison of QTLs of maize leaf length or width with QTLs of model parameters. *Journal of Experimental Botany* **55**(407): 2461-2472.
- Rönnberg-Wästljung AC, Glynn C, Weih M. 2005.** QTL analyses of drought tolerance and growth for a *Salix dasyclados* x *Salix viminalis* hybrid in contrasting water regimes. *Theoretical and Applied Genetics* **110**(3): 537-549.
- Rouse JW, Haas RH, Deering DW, Schell JA. 1973.** Monitoring the vernal advancement and retrogradation (green wave effect) of natural vegetation. 3rd ERTS Symposium, NASA SP-351 : 309-317.
- Rufat J, Mata M, Arbonés A, Del Campo J, Gelly M, Marsal J, Girona J. 2003.** Fruit development, yield and quality in response to irrigation and nitrogen application on Golden Delicious apples. Fifth International Conference on integrated fruit production IOBC/WPES Bulletin **24**(5):359-365.
- Rundquist D, Gitelson A, Leavitt B, Zygielbaum A, Perk R, Keydan G. 2014.** Elements of an integrated phenotyping system for monitoring crop status at canopy level. *Agronomy* **4**: 108-123.
- Salekdeh GH, Reynolds M, Bennett J, Boyer J. 2009.** Conceptual framework for drought phenotyping during molecular breeding. *Trends in Plant Science* **14**(9): 488-496.
- Salleo S, Logullo MA, Oliveri F. 1985.** Hydraulic parameters measured in 1-year-old twigs

of some mediterranean species with diffuse-porous wood - changes in hydraulic conductivity and their possible functional-significance. *Journal of Experimental Botany* **36**(162): 1-11.

Salleo S, Rosso R, Lo Gullo MA. 1982. Hydraulic architecture of *Vitis vinifera* L. and *Populus deltoides* Bartr. 1-year-old twigs: I. Hydraulic conductivity (LSC) and water potential gradients. *Giornale Botanico Italiano* **116**(1/2): 15-27.

Saranga Y, Jiang CX, Wright RJ, Yakir D, Paterson AH. 2004. Genetic dissection of cotton physiological responses to arid conditions and their inter-relationships with productivity. *Plant, Cell & Environment* **27**(3): 263-277.

Schoppach R, Sadok W. 2012. Differential sensitivities of transpiration to evaporative demand and soil water deficit among wheat elite cultivars indicate different strategies for drought tolerance. *Environmental and Experimental Botany* **84**: 1-10.

Schott JR, Salvaggio C, Volchok WJ. 1988. Radiometric scene normalization using pseudoinvariant features. *Remote Sensing of Environment* **26**(1): 1-16.

Segura V, Cilas C, Laurens F, Costes E. 2006. Phenotyping progenies for complex architectural traits: a strategy for 1-year-old apple trees (*Malus x domestica* Borkh.). *Tree Genetics & Genomes* **2**(3): 140-151.

Segura V, Denancé C, Durel CE, Costes E. 2007. Wide range QTL analysis for complex architectural traits in a 1-year-old apple progeny. *Genome* **50**(2): 159-171.

Sellers PJ. 1985. Canopy reflectance, photosynthesis and transpiration. *International Journal of Remote Sensing* **6**(8): 1335-1372.

Shendure J, Ji HL. 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* **26**(10): 1135-1145.

Sinclair TR. 2011. Challenges in breeding for yield increase for drought. *Trends in Plant Science* **16**(6): 289-293.

Sinclair TR, Ludlow MM. 1986. Influence of soil water supply on the plant water balance of four tropical grain legumes. *Australian Journal of Plant Physiology* **13**: 329-341.

Sinoquet H, Stephan J, Sonohat G, Lauri PÉ, Monney P. 2007. Simple equations to estimate light interception by isolated trees from canopy structure features: assessment with three-dimensional digitized apple trees. *New Phytologist* **175**(1): 94-106.

Šircelj H, Tausz M, Grill D, Batič F. 2007. Detecting different levels of drought stress in apple trees (*Malus domestica* Borkh.) with selected biochemical and physiological parameters. *Scientia Horticulturae* **113**(4): 362-369.

Soar CJ, Speirs J, Maffei SM, Loveys BR. 2004. Gradients in stomatal conductance, xylem sap ABA and bulk leaf ABA along canes of *Vitis vinifera* cv. Shiraz: molecular and

physiological studies investigating their source. *Functional Plant Biology* **31**(6): 659-669.

Stagakis S, González-Dugo V, Cid P, Guillén-Climent ML, Zarco-Tejada PJ. 2012. Monitoring water stress and fruit quality in an orange orchard under regulated deficit irrigation using narrow-band structural and physiological remote sensing indices. *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing* **71**: 47-61.

Sugiura R, Noguchi N, Ishii K. 2007. Correction of Low-altitude Thermal Images applied to estimating Soil Water Status. *Biosystems Engineering* **96**(3): 301-313.

Tardieu F. 2005. Plant tolerance to water deficit: physical limits and possibilities for progress. *Comptes Rendus Geoscience* **337**(1-2): 57-67.

Tardieu F, Davies WJ. 1992. Stomatal response to abscisic acid is a function of current plant water status. *Plant Physiology* **98**(2): 540-545.

Tardieu F, Hammer G. 2012. Designing crops for new challenges. *European Journal of Agronomy* **42**: 1-2.

Tardieu F, Simonneau T. 1998. Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. *Journal of Experimental Botany* **49**(Special Issue): 419-432.

Tardieu F, Tuberosa R. 2010. Dissection and modelling of abiotic stress tolerance in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **13**(2): 206-212.

Torres CA, Sepulveda A, Gonzalez-Talice J, Yuri JA, Razmilic I. 2013. Fruit water relations and osmoregulation on apples (*Malus domestica* Borkh.) with different sun exposures and sun-injury levels on the tree. *Scientia Horticulturae* **161**: 143-152.

Trillot M, Masseron A, Mathieu V, Bergougnoux F, Hutin C, Lespinasse Y. 2002. *Le pommier*. CTIFL, Paris, 292p.

Tron G, Isbérie C, Chol P. 2000. La tensiométrie pour piloter les irrigations. - Une gestion raisonnée de la ressource en eau. Educagri, Dijon, 247p.

Tuberosa R, Salvi S. 2006. Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. *Trends in Plant Science* **11**(8): 405-412.

Turner NC. 1986. Adaptation to water deficits - a changing perspective. *Australian Journal of Plant Physiology* **13**(1): 175-190.

Vadell J, Medrano H. 1992. Effect of drought on subterranean clover .2.genetic-variability of photosynthesis, transpiration and stomatal conductance. *Photosynthetica* **27**(4): 433-440.

Valancogne C, Dayau S, Améglio T, Archer P, Daudet FA, Ferreira Gamma MI, Cohen M. 1997. Relations between relative transpiration and predawn leaf water potential in different fruit tree species. *Acta Horticulturae* **449**: 423-429.

- Van AL, Caffier V, Lasserre-Zuber P, Chauveau A, Brunel D, Le Cam B, Durel C-E. 2013.** Differential selection pressures exerted by host resistance quantitative trait loci on a pathogen population: a case study in an apple $\times$ *Venturia inaequalis* pathosystem. *New Phytologist* **197**(3): 899-908.
- Vautard R, Yiou P, D'Andrea F, de Noblet N, Viovy N, Cassou C, Polcher J, Ciais P, Kageyama M, Fan Y. 2007.** Summertime European heat and drought waves induced by wintertime Mediterranean rainfall deficit. *Geophysical Research Letters* **34**(7): L07711.
- Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, Dhingra A, Cestaro A, Kalyanaraman A, Fontana P, Bhatnagar SK, Troggio M, Pruss Det al. 2010.** The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Nature Genetics* **42**(10): 833-839.
- Vidal A, Devaux-Ros C. 1995.** Evaluating forest fire hazard with a Landsat TM derived water stress index. *Agricultural and Forest Meteorology* **77**(3-4): 207-224.
- Wang D, Gartung J. 2010.** Infrared canopy temperature of early-ripening peach trees under postharvest deficit irrigation. *Agricultural Water Management* **97**(11): 1787-1794.
- Wang Z, Quebedeaux B, Stutte GW. 1995.** Osmotic adjustment: effect of water stress on carbohydrates in leaves, stems and roots of apple. *Australian Journal of Plant Physiology* **22**(5): 747-754.
- White JW, Andrade-Sanchez P, Gore MA, Bronson KF, Coffelt TA, Conley MM, Feldmann KA, French AN, Heun JT, Hunsaker DJ et al. 2012.** Field-based phenomics for plant genetics research. *Field Crops Research* **133**: 101-112.
- Widlowski JL, Pinty B, Gobron N, Verstraete MM, Diner DJ, Davis AB. 2004.** Canopy structure parameters derived from multi-angular remote sensing data for terrestrial carbon studies. *Climatic Change* **67**(2-3): 403-415.
- Wisniewski M, Bassett C, Norelli J, Macarisin D, Artlip T, Gasic K, Korban S. 2008.** Expressed sequence tag analysis of the response of apple (*Malus x domestica* 'Royal Gala') to low temperature and water deficit. *Physiologia Plantarum* **133**(2): 298-317.
- Wunsche JN, Palmer JW, Greer DH. 2000.** Effects of crop load on fruiting and gas-exchange characteristics of 'Braeburn'/M.26 apple trees at full canopy. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **125**(1): 93-99.
- Zarco-Tejada PJ, Berjon A, Lopez-Lozano R, Miller JR, Martin P, Cachorro V, Gonzalez MR, de Frutos A. 2005.** Assessing vineyard condition with hyperspectral indices: Leaf and canopy reflectance simulation in a row-structured discontinuous canopy. *Remote Sensing of Environment* **99**(3): 271-287.
- Zarco-Tejada PJ, González-Dugo V, Berni JAJ. 2012.** Fluorescence, temperature and

narrow-band indices acquired from a UAV platform for water stress detection using a micro-hyperspectral imager and a thermal camera. *Remote Sensing of Environment* **117**: 322-337.

Zarco-Tejada PJ, Gonzalez-Dugo V, Williams LE, Suarez L, Berni JAJ, Goldhamer D, Fereres E. 2013. A PRI-based water stress index combining structural and chlorophyll effects: Assessment using diurnal narrow-band airborne imagery and the CWSI thermal index. *Remote Sensing of Environment* **138**: 38-50.

Zeng Z. 1993. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 10972-10976.

Zeng ZB. 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* **136**: 1457-1468.

Zhang W, Zhang J, Hu X. 1993. Distribution and Diversity of Malus Germplasm Resources in Yunnan, China. *Hortscience* **28**(10): 978-980.

Zolina O, Simmer C, Belyaev K, Kapala A, Gulev S. 2009. Improving estimates of heavy and extreme precipitation using daily records from European rain gauges. *Journal of Hydrometeorology* **10**(3): 701-716.

Annexes

Annexe 1 : Carte de resistivité du sol du verger

Annexe 2 : Analyse pédologique du sol

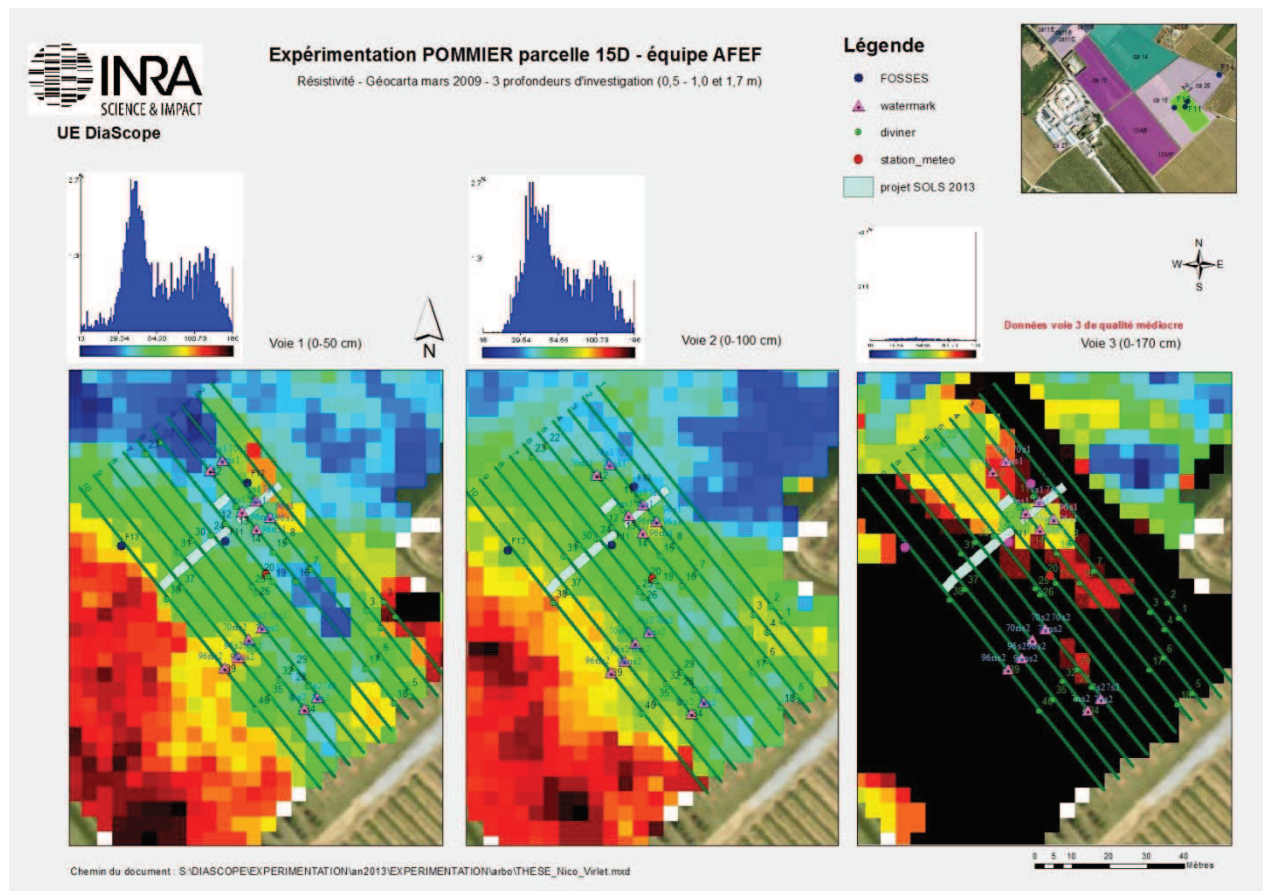
Annexe 3 : Plan du verger et disposition des géotypes

Annexe 4 : Communication avec actes dans un congrès international (ACTI) : « 2nd Symposium on Horticulture in Europe (I.S.H.S.) » July 1-5, 2012 - Angers, FRANCE ; acceptée pour publication.

Annexe 5:Affiche scientifique présentée lors du Plant Biology Congress EPSO – 29 July-3 August, 2012, Freiburg (Allemagne)

Annexe 6: Communication avec actes dans un congrès international (ACTI) : Congrès RHEA –Madrid 2014 ; publiée.

Annexe 1 : Carte de resistivité du sol du verger



- Fosses : fosses pédologiques réalisées en novembre 2013
- Watermark : sondes tensiométriques électriques destinées à la mesure du potentiel hydrique de sol au pied de certains arbres (profondeurs 30 et 60 cm)
- Diviner : sondes capacitatives destinées à mesurer la teneur en eau du sol (exploitation des données en cours)
- Station météo : équipée de capteurs température et humidité de rayonnement global, de rayonnement PAR, d'un anémomètre, d'un pluviomètre, positionnés à 1,20m du sol. A partir d'une scrutation de ces capteurs toutes les 30 secondes, une centrale d'acquisition Campbell Scientific CR10X calcule les moyennes et les écarts-types par intervalles de 10 minutes.

Malgré de légers gradients, on peut estimer que l'homogénéité de la parcelle est acceptable pour supporter un essai de phénotypage.

Le sol au sortir de l'hiver 2008-09 révèle un peu plus d'humidité au Nord, ainsi que la proximité à l'Ouest d'une autre parcelle, plus caillouteuse, dont la capacité de rétention en eau est inférieure.

Annexe 2 : Analyse pédologique du sol

Rapport expertise définitif parcelle « Pommiers »

Trois fosses pédologiques ont été creusées en novembre 2013 pour déterminer la variabilité des propriétés de sol sur la parcelle d'essai plantée de pommiers. La fosse F11 est décrite en détail ci dessous. Un profil cultural a été réalisé pour vérifier l'effet des passages de roues répétés sur la parcelle depuis sa plantation.

D'un point de vue pédologique, la mise en place de ce sol est complexe et comprend deux phases distinctes. Les caractéristiques de l'horizon Bt et C ont été acquises au cours d'un début de pédogenèse de la terrasse alluviale Holocène (environ 10000 ans). Les horizons aujourd'hui cultivés profondément (L1 et L5) proviennent d'un colluvionnement plus récent (entre 100 et 1000 ans) issue des unités de sols plus à l'ouest.

D'un point de vue agronomique, ce sol ne présente pas de discontinuité majeure et semble bien structuré aux environs des pommiers. Dans l'axe de l'interrang, des zones de structure dégradée sont présentes mais ne sont pas propagées en profondeur. Le drainage de l'eau semble correct et les racines colonisent l'ensemble du sol en fonction de leurs spécificités.

Deux fosses supplémentaires ont été creusées pour vérifier la variabilité des horizons observées sur la fosse F11. La fosse F13 plus à l'ouest et la fosse F12 plus à l'est montrent les mêmes caractéristiques. Seule la profondeur d'apparition de l'horizon « Bt » argileux est plus importante sur les deux fosses supplémentaires (80 cm). Il y a peu de variabilité interne à cette parcelle. Les analyses de texture confirment une légère variation du taux d'argile sur la fosse 13 plus à l'ouest (+3%). Cette variation est logique du fait de la présence des hautes terrasses à proximité.

En complément, une estimation de la réserve utile est donnée dans le dernier tableau. Les mesures d'humidités caractéristiques permettent de calculer la réserve utile de chaque horizon suivant la relation suivante :

$$RU = Z \times \Delta\theta_v \times d_f \times \left[1 - \frac{Cx \times da}{10 \times dcx} \right]$$

avec :

RU (mm)	réserve utile de l'horizon
Z(m)	épaisseur de l'horizon
$\Delta\theta_v$	stock d'eau massique disponible (diff. entre humidités massiques CC et PF)
d_f	densité de la terre fine
Cx(%)	taux de cailloux en masse
dcx	densité des cailloux (en fonction de la minéralogie)
da	densité apparente mesurée

Le terme correspondant à l'effet des cailloux est pris en compte même s'il est négligeable quand le taux est inférieur à 10 % environ. Les cailloux sont considérés dans ce travail comme non effectifs sur la réserve utile bien que des travaux récents montrent leur contribution en fonction des conditions.

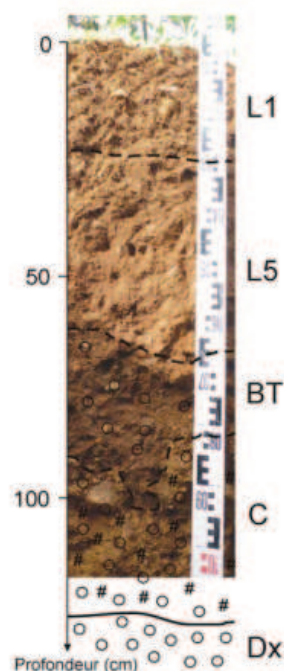
Paramètres physico-chimiques

La fosse principale F11 est décrite suivant le système normalisé STIPA, compatible DONESOL. Les principales variables pédologiques sont relevées (texture, structure, pierrosité, couleur, éléments secondaires, ...etc.) pour chaque horizon préalablement définis par le pédologue. Des prélèvements sont ensuite réalisés pour analyser en laboratoire les paramètres physico-chimiques. La densité apparente de la terre fine (<2 mm) sol est déterminée par la méthode des cylindres, qui consiste à prélever in situ un volume défini par le cylindre et à peser le contenu après séchage à 105 °C et tamisage à 2 mm. Le prélèvement par horizon comprend quatre répétitions. Dans le cas d'horizon caillouteux, le prélèvement est impossible par cette méthode. Les humidités aux pressions caractéristiques (capacité au champ et point de flétrissement permanent) sont déterminées par la méthode des presses de Richards. Des agrégats sont saturés en eau et disposés sur des membranes poreuses dans des presses capables de reproduire les conditions de succion dans le sol. Pour les deux humidités caractéristiques recherchées, les pressions sont respectivement de 0.33 et 15 bars pour les valeurs de capacité au champ et point de flétrissement. Ces analyses sont encore en cours au 1^{er} mars 2014 et seront disponibles d'ici avril 2014. En attendant ces résultats, les données de la parcelle carignan en 2012 sont utilisées pour établir une fonction de pédotransfert locale qui permet de calculer avec une bonne estimation (R^2 à 0.95) les humidités à partir du taux d'argile mesuré.

Les analyses physico-chimiques sont réalisés au laboratoire certifié d'analyse des sols de l'INRA d'Arras (<http://www.lille.inra.fr/las>). Un échantillon de secours est conservé jusqu'à nouvel ordre dans notre pédothèque LISAH, dans le cas où d'autres analyses seraient nécessaires.

En conclusion, la fosse principale F11 permet de décrire finement les propriétés physiques, physico-chimiques et agronomiques qui semblent représentatif de l'ensemble de la parcelle « pommiers ». Le sol est moyennement profond et présente une structure conservée, faiblement modifiée dans l'axe des passages d'engins. Aucune limite physique à l'enracinement n'est décelable. En condition de forte humidité, une accumulation d'eau peut intervenir de façon temporaire au dessus de l'horizon Bt. La réserve utile est estimée à 81 mm, ce qui est correct. En période de sécheresse, cette parcelle peut présenter un stress hydrique modéré, suivant le type de culture.

Fosse pommier – Neoluvisol (RP)/Luvic Calcisol (WRB)



Sol moyennement profond, évolué, sur terrasse alluviale ancienne.

Horizon L1 : horizon cultivé récent peu épais, à structure dégradée dans l'axe des passages de roue de tracteur, de texture équilibrée enrichie en argile, peu caillouteux, brun, légèrement calcaire, très nombreuses racines de pommier et d'adventices.

Horizon L5 : horizon cultivé épais comprenant plusieurs niveaux récents (<40 cm) et anciens correspondant aux anciens vignobles, de structure polyédrique subanguleuse, généralement pas dégradée par le travail du sol, quelques dégradations liés aux passages de tracteur dans l'axe des roues, de texture équilibrée, enrichie en argile, peu caillouteux, brun, légèrement calcaire, nombreuses racines d'adventices et quelques racines de pommier.

Horizon Bt : horizon d'accumulation d'argile plus ancien, à très belle structure polyédrique subanguleuse, poreux, de texture argileuse, caillouteux, rouge brun, non calcaire, quelques racines d'adventices.

Horizon C : horizon d'altération de la terrasse alluviale très caillouteux, de texture équilibrée légèrement enrichie en sable, brun jaune, calcaire avec des accumulations de carbonates sous forme de nodules, quelques racines d'adventices.

Horizon Dx : terrasse alluviale, matériaux meubles à matrice calcaire très caillouteux (galets de natures diverses)

11	Prof_min (cm)	Prof_max (cm)	Graviers (0.2-0.5 cm)	Cailloux (>0.5 cm)	Texture (%)			CO	N	C/N	MO	pH
Horizon			%	%	A	L	S	g/kg	g/kg		%	
L1	0	30	3	18	23	34	43	8.9	0.8	11	1.5	8.1
L5	30	65	5	8	23	32	45	6.7	0.6	11	1.2	8
Bt	65	80	6	29	40	30	30	5.4	0.6	10	0.9	7.9

11	Prof_min (cm)	Prof_max (cm)	CEC	CaCO3 total	Na	Ca	Mg	K	P2O5
Horizon			Cmol+/kg	g/kg	Cmol+/kg	Cmol+/kg	Cmol+/kg	Cmol+/kg	g/kg
L1	0	30	10	6	0.09	21.00	1.03	0.57	0.22
L5	30	65	11	0	0.08	14.20	0.48	0.49	0.09
Bt	65	80	15	0	0.15	19.00	0.80	0.47	0

11	Prof_min (cm)	Prof_max (cm)	Densité apparente Terre fine		Humidités caractéristiques			RU mm
Horizon			moyenne	Écart type	0.33 bar (CC)	1 bar	15 bars (PF)	Estimation (mm)
L1	0	30	1.49	0.16	14		10	16
L5	30	65	1.59	0.09	16		9	36
Bt	65	80	1.65**	-	19		12	13
C	80	120	1.65**	-	21**		16**	16

** valeur estimée, non mesurée du fait de la très forte teneur en cailloux

Annexe 3 : Plan du verger et disposition des géotypes

		SUD						SUD	
S	nS	S	nS	S	nS	S	nS	S	nS
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GS	GS	Stk	Stk	GS	GS	Stk	Stk	GS	GS
61	61	11	11	35	35	78	78	115	115
22	22	65	65	108	108	88	88	16	16
90	90	122	122	112	112	31	31	18	18
92	92	13	13	87	87	90	90	3	3
58	58	83	83	106	106	99	99	5	5
82	82	107	107	73	73	60	60	113	113
74	74	123	123	50	50	120	120	87	87
38	38	40	40	55	55	77	77	94	94
118	118	88	88	59	59	7	7	28	28
84	84	31	31	115	115	9	9	27	27
95	95	49	49	5	5	33	33	85	85
64	64	111	111	21	21	106	106	73	73
81	81	62	62	53	53	23	23	101	101
33	33	9	9	104	104	95	95	39	39
44	44	46	46	47	47	97	97	123	123
60	60	102	102	12	12	86	86	49	49
69	69	80	80	100	100	17	17	117	117
121	121	66	66	103	103	11	11	76	76
41	41	6	6	37	37	118	118	58	58
91	91	34	34	77	77	75	75	96	96
23	23	30	30	19	19	70	70	37	37
8	8	57	57	117	117	44	44	21	21
25	25	26	26	14	14	59	59	102	102
36	36	20	20	114	114	34	34	20	20
Stk	Stk	GS	GS	Stk	Stk	13	13	68	68
97	97	42	42	GS	GS	Stk	Stk	GS	GS
39	39	1	1	107	107	14	14	57	57
52	52	110	110	83	83	122	122	46	46
67	67	24	24	36	36	79	79	29	29
85	85	48	48	89	89	111	111	10	10
54	54	119	119	55	55	104	104	42	42
79	79	96	96	114	114	2	2	110	110
63	63	51	51	67	67	69	69	45	45
86	86	76	76	24	24	30	30	119	119
93	93	7	7	40	40	19	19	81	81
2	2	101	101	8	8	26	26	15	15
71	71	29	29	47	47	62	62	116	116
78	78	89	89	52	52	6	6	84	84
105	105	3	3	1	1	25	25	92	92
27	27	45	45	80	80	32	32	41	41
125	125	68	68	103	103	66	66	121	121
98	98	70	70	61	61	22	22	53	53
15	15	28	28	4	4	91	91	74	74
16	16	124	124	124	124	50	50	48	48
32	32	116	116	125	125	98	98	64	64
120	120	18	18	43	43	112	112	108	108
43	43	75	75	38	38	51	51	35	35
10	10	4	4	12	12	100	100	82	82
99	99	94	94	65	65	63	63	71	71
113	113	17	17	105	105	93	93	54	54
Stk	Stk	GS	GS	Stk	Stk	GS	GS	Stk	Stk

GS : Granny Smith

Stk : Starkrimson

S : deficit hydrique estival ; nS : pleine irrigation

Annexe 4 : Communication avec actes dans un congrès international (ACTI) : « 2nd Symposium on Horticulture in Europe (I.S.H.S.) » July 1-5, 2012 - Angers, FRANCE (texte accepté pour publication dans Acta Horticulturae)

Phenotyping the Response of an Apple Tree Hybrid Population to Soil Water Constraint under Field Conditions: New Insights Brought by High Resolution Imaging

N. Virlet, S. Martinez,
E. Costes and J.L. Regnard
UMR AGAP 1334,
CIRAD, TA-A-108/03,
Avenue Agropolis,
Montpellier Cedex 5
F-34398
France

V. Lebourgeois
CIRAD - UMR TETIS
Station Ligne-Paradis
7 chemin de l'IRAT
Saint-Pierre
F-97410
France

S. Labbé
IRSTEA - UMR TETIS
Remote Sensing Center
500 rue J.F. Breton
Montpellier Cedex 5
F-34093
France

Keywords: *Malus x domestica*, water use efficiency, image analysis, abiotic stress, remote sensing, thermal infrared

Abstract

The genetic variability of apple tree response to drought is scarcely known because characterization of response to water constraint is usually low-throughput, which limits the possibility to take this trait into account in breeding programmes. In this research phenotypic response of apple tree scion hybrids of a Starkrimson x Granny Smith adult population to soil drought was considered through the leaf temperature as a proxy for transpiration, each tree being grafted onto the same rootstock genotype. The experiment was located in an experimental orchard where trees were submitted to contrasting summer irrigation treatments. The use of airborne multispectral images (in reflective and thermal infrared spectral domains) was explored as a possible approach to evaluate the hybrids behavior in orchard conditions. Emphasis was put on the leaf transpiration status which was approached by measuring foliage temperature in thermal infrared (TIR) and by calculation of the Water Deficit Index (WDI). Here we proposed to calculate the WDI at tree scale, to overcome limitations of TIR interpretation for non-covering vegetation by taking the crop cover fraction into account. This was performed through the calculation of the Normalized Difference Vegetation Index (NDVI). Our results highlight capacity of thermal imaging for phenotyping water stress. Spatial resolution of TIR images needs to be improved in order to refine the phenotyping data and specific image treatment is required to extract relevant leaf thermal information which can allow for effective differentiation of hybrids behavior in response to soil water constraint. Remote sensing thus appears promising for phenotyping varietal response of apple tree to soil drought at adult stage in field conditions.

INTRODUCTION

In the future, climate change will lead to longer periods of heat, scarce precipitation and high air vapor pressure deficits (IPCC, 2007). This will hamper temperate fruit production in particular where irrigation becomes limited. Adapting fruit trees to abiotic stresses such as water stress is thus a new challenging issue for fruit crops, whose water-use needs to be deeply re-considered (Sircelj et al., 2007). New breeding traits could be proposed and implemented, consisting in better adaptation to water stress and/or better water use efficiency (Condon et al., 2004; Bassett et al., 2011). Our previous results on an apple hybrid population at young stage have shown a genotypic variability of responses to water stress in controlled conditions (Regnard et al., 2008). Stomatal conductance and photosynthesis rate revealed to be heritable and quantitative trait loci were detected for these traits (Regnard et al., 2009). Nevertheless stomatal conductance can be positively affected by the fruit acting as a sink (Wünsche and Ferguson, 2005), or negatively affected by high vapor pressure deficits. As a consequence, in perennial crops such as fruit trees, measurements performed in controlled conditions at juvenile stage do not permit a straightforward prediction of mature tree behavior in field, and stability of leaf traits needs to be assessed at adult stage. However phenotyping of tree hybrid populations in the field remains challenging since most ecophysiological measurements are low-throughput.

In parallel to increasing genotyping possibilities, it thus appears necessary to develop tools and approaches which could permit high-throughput phenotyping of ecophysiological plant traits. In controlled conditions remote sensing techniques allows characterizing plant growth, plant water status or other physiological traits (Berger et al., 2010) that are useful in phenotyping purpose. In field conditions, Jones et al. (2009) have recently shown the possibilities of ground measurements of foliar temperature using infrared thermography for phenotyping relative stomatal conductance in rice inbred lines. To increase throughput phenotyping, airborne imagery can provide spatial exhaustive information on a whole experimental field, with a high spatial resolution adapted to fine observations. In field conditions high resolution TIR airborne images are currently used for detection of water stress and irrigation scheduling through the calculation of water stress indices such as the Crop Water Stress Index (CWSI; Berni et al., 2009). CWSI is however applicable to fully covering canopies, which limits its use on heterogeneous crop covers. Developed by Moran et al. (1994), the Water Deficit Index (WDI) allows for the application of the Crop Water Stress Index (CWSI; Jackson et al., 1981; Idso, 1982) to partially covering plant canopies. It is based on the Vegetation Index / Temperature concept and more precisely on a trapezoidal shape formed by the relationship between leaf surface temperature minus air temperature ($T_s - T_a$) and a vegetation cover fraction, which can be represented by the spectral vegetation index NDVI.

Our study addresses the question of apple tree responses to drought, and water use efficiency, and contributes to phenotyping methodologies developed in field conditions using remote sensing techniques. The use of airborne multispectral images is explored as a possible approach to evaluate the behavior of an adult apple population grown in orchard conditions, through the application to each tree of the WDI spectral index. Our research assumed high resolution imaging and use of water stress indices could provide a relevant and sensible method for discriminating the hybrid stomatal response to water stress thanks to the collection of images on the whole tree population at the same time. In this paper, the procedure for image acquisition and processing to obtain phenotypic information associated with the plant response to water stress is detailed, with emphasis on some crucial parameters to consider in order to obtain reliable phenotyping data.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials and field set-up

The study was performed on an apple orchard located at INRA Mauguio experimental farm (43°36'35N, 3°58'52 E) and is part of Diaphen phenotyping platform. The plant material consisted in an apple progeny of 122 hybrids (Starkrimson x Granny Smith), repeated 4 times. Trees were grafted on M9 rootstock, and distributed along 10 rows within the plot. The field plot was irrigated with a microsprayer system located in the row. Five rows supported a summer drought treatment: water-stressed trees (without irrigation, hereafter referred to as S treatment), while 5 rows were well watered during the whole vegetation period (not stressed trees, hereafter referred to as NS treatment). The S and NS rows alternated within the experimental set-up (Fig. 1), and each treatment was applied to 2 trees per genotype. For well watered trees irrigation was scheduled according to soil water potential (Ψ_{soil} , 30cm and 60cm) measured at a representative area of the field. Environmental conditions were monitored by meteorological sensors recording global and photosynthetically active solar radiation, soil and air temperatures, air humidity, wind speed and rainfalls. These data were averaged at a 10 minutes step-time and stored into a Campbell Scientific CR10X data logger.

Airborne image acquisition, field measurement

The image acquisition system consisted of two Canon EOS 400D (10.1 Megapixel CMOS sensor) commercial digital cameras each equipped with a 35 mm lens, and one FLIR B20HS (320x240 matrix) thermal infrared camera for the acquisitions of TIR images (8.5 to 14.0 μm). One digital camera acquired visible images in Red, Green and Blue bands (RGB) while the second was modified according to Lebourgeois *et al.* (2008) to obtain images in the Near Infrared (NIR). The acquisition of airborne images was performed by L'Avion Jaune® Company. The cameras were set-up on an ultra-light aircraft (ULA) and three flights were performed during summer 2010. One flight (July 16) was scheduled at the beginning of water stress and two flights occurred during the mid-summer soil water stress (August 3 and 17). Acquisitions took place between 9:00 and 11:00 GMT, at times corresponding to the diurnal water stress development at each date (Table 1).

To correct atmospheric effects in airborne TIR images, temperature measurements of cold and hot reference surfaces were performed with a Heitronics® KT19 radiothermometer during each airborne acquisition. Nine aluminum targets were distributed within the experimental field for image geo-location (Fig. 1). The low emissivity of aluminum leads to easily apparent cold points in thermal images, and a differential GPS (DGPS) was used to obtain the precise position of each target.

Images taken at 300m elevation had a 5cm resolution in RGB and NIR, and 30 cm in TIR. At this height, the orchard (100*60m) was covered by 1 to 2 images, which allowed for analysis of full orchard without data losses during the image processing due to an excessive number of photos (Table 1).

Image processing

Before extraction of phenotypic information from images, several corrections were performed with Erdas Imagine® software. First step was realized by L'Avion Jaune® and consisted mainly in ortho-rectification, geo-location and vignetting correction as described in Lebourgeois *et al.* (2008). When the plot was covered by more than one photo, a mosaic image was generated thanks to the geo-referenced targets allowing minimizing the maximum offsets between the two parts of the orchard. Two informations were extracted from the corrected images:

- NDVI, which is a spectral index linked to leaf area index, and gives information about plant cover density and nitrogen supply as well as vegetation coverage. It was computed from red (R) and near infrared (NIR) bands according to Rouse et al. (1973): $NDVI = (NIR - R) / (NIR + R)$
- Surfaces temperatures (T_s) whose values were extracted from TIR images measured at aircraft level and corrected by the atmospheric interference, via the use of temperatures of cold and hot targets. The $T_s - T_a$ value was obtained by difference between leaf surface temperature and air temperature.

Water Deficit Index calculation

The WDI computation is based on the trapezoidal shape formed by the relationship between ($T_s - T_a$) and vegetation cover fraction (Fig. 2), which can be represented by a spectral vegetation index such as NDVI. Theoretical equations for computation of the trapezoid vertices are given in Moran et al. (1994). WDI can be defined empirically (Clarke, 1997) by calculation of the trapezoid limits based on the image data. However, defining empirical WDI boundaries is not easy when the scenes viewed by the airborne optical and thermal infrared sensors do not contain the dry and wet bare soil and vegetation states corresponding to the vertices of the trapezoid (Fig. 2). Therefore, the WDI boundaries were defined using a statistical method by calculating the 1% and 99% quantiles of NDVI for the upper and lower limits, according to Koenker (2008). Lines (1-3) and (2-4) (Fig. 2) were defined by calculating the 1% and 99% quantile regressions of ($T_s - T_a$) as a function of NDVI. WDI, which reflects water stress intensity through the ratio between actual evapotranspiration (ET_{actual}) and maximal evapotranspiration (ET_{max}), was computed for each point C of the scatter plot using the following equation:

$$WDI = 1 - [ET_{actual} / ET_{max}] = [(T_s - T_a) - (T_s - T_a)_{min}] / [(T_s - T_a)_{max} - (T_s - T_a)_{min}] = AC / AB$$

where $(T_s - T_a)_{min}$, $(T_s - T_a)_{max}$ and $(T_s - T_a)$ correspond to points A, B and C respectively (Fig. 2). WDI was calculated from $T_s - T_a$ and NDVI mean values, which were extracted at tree scale in a 60 cm buffer zone at the center of each tree.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R software. Genotype and drought effects were analyzed by a two way ANOVA after ensuring the data were normally distributed and the variances homogeneous.

RESULTS

Figure 3 presents the scatter plot of couples of ($T_s - T_a$; NDVI) points obtained for each pixel of the experimental field (grey points). The ($T_s - T_a$; NDVI) average values for each individual tree are represented by black and white points (superimposed over the grey) for NS and S trees respectively. Differences appear clearly between NS and S tree groups on the ($T_s - T_a$) axis. The NS/S distance rose from July 16 to August 17, corresponding to significantly higher WDI values, highlighting an increase of water stress in S trees (Table 2). Scatter plots of NS and S treatments on August 3 seemed less spread than on July 16. This was confirmed by the differences between WDI mean values for NS and S treatments, which were lower on August 3 than July 16, 0.177 and 0.218 respectively. Rainfall that occurred two days before the August 3 ULA flight (data not shown) could account for this result.

Table 2 presents the results of a two-way ANOVA on NDVI, $T_s - T_a$ and WDI values, testing the effects of genotype, drought, and possible interaction. This analysis revealed a

decrease in the significance of the genotype effect for the 3 variables, between the first and third acquisition dates, as shown by F and p -values. However, $T_s - T_a$ became statistically non-significant on August 3. Conversely drought effect increased with stress intensity for each factor as shown by F values, which rose from 0.6 to 18 for NDVI, from 307 to 1739 for $T_s - T_a$ and from 506 to 1672 for WDI. Drought effect was not significant for NDVI at the first date and increased with stress intensity. These results can be related to the increase in soil water constraint shown by the progressively lower values of Ψ_{soil} (Table 1). No interaction was revealed between genotype and drought factors.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

With a phenotyping purpose, we investigated remote sensing approach and a methodological background previously used for irrigation scheduling (Berni *et al.*, 2009). This method was here applied to individual trees. In this context, high resolution images are needed to be able to discriminate between pixels. In this research, 30cm resolution thermal images were obtained and analyzed, in which pixels reflect the transpiration status of well exposed leaves, but also include shaded leaves, soil, trunk and branches. Values of NDVI and $T_s - T_a$ were extracted from a 60 cm buffer at the center of each tree and these values were averaged without distinguishing soil and vegetation. Because of large variability of architecture and tree size observed in the hybrid population (data not shown), the adequacy of a 60cm buffer zone varies depending on the tree size: if this zone is relevant for analyzing large trees, it clearly includes more soil for smaller trees. As a consequence, buffer definition could be improved by delimiting a zone of interest within the image. Another improvement could be obtained by filtering the images using a NDVI threshold to disentangle bare soil and vegetation. However, the spatial resolution of the thermal images is presently too coarse to differentiate soil and plant foliage temperatures within the tree crown. Thus, for increasing the relevancy of WDI in the study of apple trees response to water constraint, resolution of thermal imaging will be raised in future experiment by loading the cameras in an Unmanned Aerial Vehicle (UAV).

Furthermore, the estimation of WDI values must be validated by an independent and robust method. For this, we also explored plant water status measured at tree level (Ψ_{stem} and/or g_{sw}). This highlighted a good correlation between classical measurement of tree water status (Ψ_{stem} and/or g_{sw}) and infrared leaf temperature (data not shown), consistently with previous studies (Berni *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2009).

In the perspective of genetic studies, the results of ANOVA analyses demonstrated that we can differentiate between stress and non-stress conditions, and between hybrids (since genotypic effect was significant). The absence of interaction between the genotype and drought factors suggests that their effects were purely additive. The decrease in genotype effect along with the stress increase, suggests that the best period to reveal genotype-dependent behavior differences in response to stress corresponds to the beginning of stress application. Finally, our results are promising regarding the use of remote sensing techniques for high-throughput phenotyping of adult apple tree varietal response to soil water constraint in field conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

PhD scholarship of Nicolas Virlet is granted by Montpellier SupAgro and Languedoc Roussillon Region. The flight program benefited from the European Interreg IIb program Telerieg SOE1/P2/E082. The authors also thank Stephan Feral for his technical support in orchard management.

Literature cited

- Bassett, C.L., Glenn, D.M., Forsline, P.L., Wisniewski, M.E. and Farrell, R.E. Jr. 2011.Characterizing water use efficiency and water deficit responses in apple (*Malus x domestica* Borkh. and *Malussieversii* Ledeb.). M. Roem. HortScience 46:1079-1084.
- Berger, B., Parent, B. and Tester, M. 2010. High-throughput shoots imaging to study drought responses. J. Exp. Bot. 61:3519-3528.
- Berni, J.A.J., Zarco-Tejada, P.J., Sepulcre-Canto, G., Fereres, E. and Villalobos, F. 2009.Mapping canopy conductance and CWSI in olive orchards using high resolution thermal remote sensing imagery.Remote Sens. Env. 113:2380-2388.
- Clarke, T.R. 1997. An empirical approach for detecting crop water stress using multispectral airborne sensors.HortTechnology. 7(1):9-16.
- Condon, A.G., Richards, R.A., Rebetzke, G.J. and Farquhar, G.D. 2004. Breeding for high water-use efficiency. J. Exp. Bot. 55:2447-2460.
- Idso, S.B. 1982. Non-water-stressed baselines: a key to measuring and interpreting plant water stress. Agric. Meteorol. 27:59-70.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) 2007.Summary for Policymakers. In: Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change .www.ipcc.ch
- Jackson, R.D., Idso, S.B., Reginato, R.J. and Pinter, P.J. 1981. Canopy temperature as a crop water stress indicator. Water Resource Res. 17:1133-1138.
- Jones, H.G., Serraj, R., Loveys, B., Xiong, L., Wheaton, A. and Price A. 2009.Thermal infrared imaging of crop canopies for the remote diagnosis and quantification of plant responses to water stress in the field. Funct. Plant Biol.36:978-989.
- Koenker, R. 2008. Censored quantile regression redux.J. Stat. Softw. 27(6):1-25.
- Lebourgeois, V., Bégué, A., Labbé, S., Mallavan, B., Prévot, L. and Roux, B. 2008.Can commercial digital cameras be used as multispectral sensors? A crop monitoring test. Sensors 8:7300-7322.
- Moran, M.S., Clarke, T.R., Inoue, Y. and Vidal, A. 1994.Estimating crop water deficit using the relation between surface-air temperature and spectral vegetation index.Remote Sens. Env. 49:246-263.
- Regnard, J.L., Ducrey, M., Porteix, E., Segura, V. and Costes, E. 2008. Phenotyping apple progeny for ecophysiological traits: how and what for? Acta Hort. 772:151-158.
- Regnard, J.L., Segura, V., Merveille, N., Durel, C.E. and Costes, E. 2009. QTL analysis for leaf gas exchange in an apple progeny grown under atmospheric constraints. Acta Hort. 814:369-374.
- Rouse, J.W., Hass, R.H., Schell, J.A., and Deering, D.W. 1973. Monitoring vegetation systems in the great plains with ERTS. In 3rd ERTS Symposium. p. 309-317.
- Sircelj, H., Tausz, M., Grill, D. and Batic, F. 2007. Detecting different levels of drought stress in apple trees (*Malus x domestica* Borkh.) with selected biochemical and physiological parameters. Scientia Hort. 113:362-369.
- Wünsche, J.N. and Ferguson, I.B. 2005. Crop load interactions in apple. Hort. Reviews, 31:231-290.

Tables

-
- Table 1. Image spatial resolution and soil water status for each airborne acquisition date. Soil Water Potential is an average between values obtained at 30 and 60 cm depths.
-

		07-16-2010	08-03-2010	08-17-2010
Flight altitude (m)		350	330	480
Number of photos to cover the orchard	RGB	1	1	1
	TIR	1	2	1
Pixel size (cm)	RGB	5*5	3*3	5*5
	TIR	30*30	30*30	30*30
Soil Water Potential (MPa)	NS	-0.019	-0.011	-0.021
	S	-0.093	-0.121	-0.188

Table 2. Effect of genotype, drought and their interaction on NDVI, $T_s - T_a$ and WDI, for each acquisition date.

Date	Variables	Genotype (G)		Drought (D)		G * D		Post-hoc test (D effect)	
		<i>F</i>	<i>p-value</i>	<i>F</i>	<i>p-value</i>	<i>F</i>	<i>p-value</i>	Mean NS	Mean S
07-16	NDVI	3.6	$< 10^{-15}$	0.6	n.s.	0.9	n.s.	0.108 ^a	0.106 ^b
	$T_s - T_a$	2	$< 10^{-5}$	307	$< 10^{-15}$	0.5	n.s.	4.149 ^b	6.402 ^a
	WDI	1.8	$< 10^{-4}$	506	$< 10^{-15}$	0.5	n.s.	0.277 ^b	0.495 ^a
08-03	NDVI	3.3	$< 10^{-14}$	15	$< 10^{-3}$	0.9	n.s.	0.238 ^a	0.225 ^b
	$T_s - T_a$	1.1	n.s.	902	$< 10^{-15}$	0.6	n.s.	0.935 ^b	2.902 ^a
	WDI	1.9	$< 10^{-4}$	775	$< 10^{-15}$	0.5	n.s.	0.228 ^b	0.405 ^a
08-17	NDVI	2.5	$< 10^{-8}$	18	$< 10^{-4}$	0.8	n.s.	0.224 ^a	0.208 ^b
	$T_s - T_a$	1.3	0.052	1739	$< 10^{-15}$	0.6	n.s.	7.969 ^b	11.832 ^a
	WDI	1.5	$< 10^{-2}$	1672	$< 10^{-15}$	0.6	n.s.	0.227 ^b	0.542 ^a

¹ In ANOVA *p*-values less than 0.05 indicate significant effects and n.s. non-significant *p*-values. In post-hoc Newman-Keuls test, means followed by different letters differ significantly at $P = 0.05$.

Figures

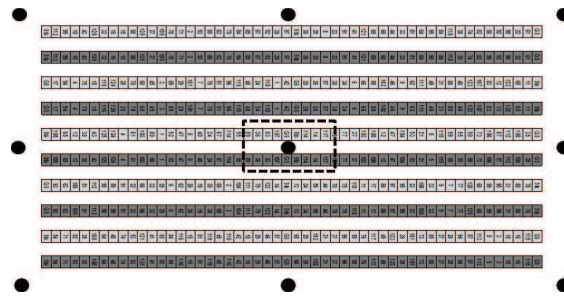


Fig. 1. Plan of the experimental field (ca. 6000m²). Aluminum targets (9 black points) located at the middle and periphery of the field were DGPS localized for accurate image geo-location. Non stressed (NS) rows are represented in dark grey and stressed (S) rows colored in clear grey. Soil water potential sensors are located in the dotted area.

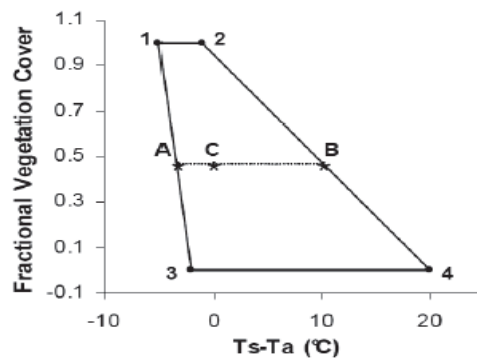


Fig. 2. Illustration of Moran's VIT concept and WDI calculation. Vertices of the trapeze represent: 1, well watered and fully covering vegetation; 2, water stressed and fully covering vegetation; 3, saturated bare soil; 4, dry bare soil. For any point C, WDI is equal to the ratio between AC / AB. Source: Moran et al., 1994.

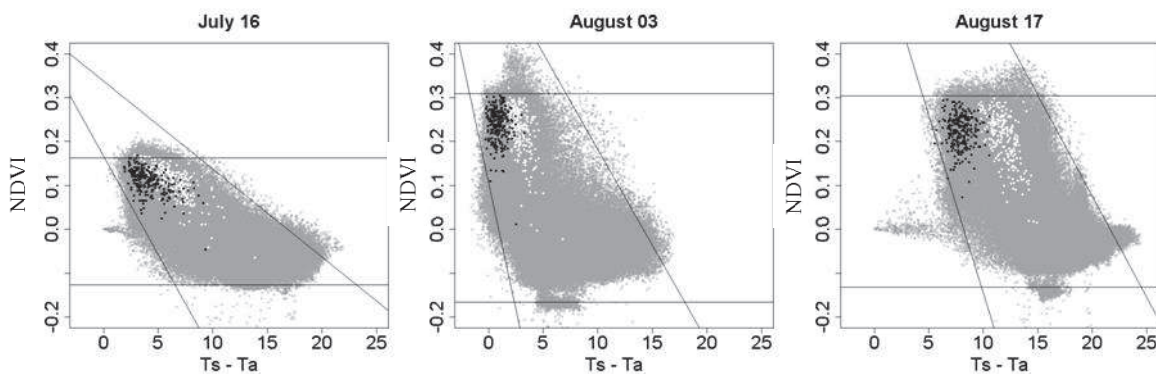


Fig. 3. Graphic representation of WDI values estimated from all pixels of TIR and NDVI images (grey points) and from pixels of a buffer zone delimited at the center of each apple tree. Black points represent NS trees and white ones S trees. $T_s - T_a$ is expressed in °C.

Regnard, J.L., et al. 2008. Phenotyping apple progeny for ecophysiological traits: how and what for? *Acta Hort.* 772:151-158.

Annexe 6: Communication avec actes dans un congrès international (ACTI) Congrès RHEA* – May 21-23, 2014, Madrid (Espagne) ; publiée.

*RHEA: 2nd International Conference on Robotics and associated High-technologies and Equipment for Agriculture and Forestry

HIGH RESOLUTION THERMAL AND MULTISPECTRAL UAV IMAGERY FOR PRECISION ASSESSMENT OF APPLE TREE RESPONSE TO WATER STRESS

David Gómez-Candón¹, Sylvain Labbé², Nicolas Virlet¹, Audrey Jolivot³, Jean-Luc Regnard¹

¹Montpellier SupAgro UMR AGAP 1334, CIRAD, TA-A -108/03, Avenue Agropolis, Montpellier Cedex 5, F-34398 France

²IRSTEA UMR TETIS, Maison de la Télédétection, 500 rue Jean-François Breton, 34093 Montpellier, France

³CIRAD UMR TETIS, Maison de la Télédétection, 500 rue Jean-François Breton, 34093 Montpellier, France

Abstract. This manuscript presents a comprehensive methodology to obtain Thermal, Visible and Near Infrared ortho-mosaics, as a previous step for the further image-based assessment of response to water stress of an experimental apple tree orchard. Using this methodology, multi-temporal ortho-mosaics of the field plot were created and accuracy of ortho-rectification and geo-location computed. Unmanned aerial vehicle (UAV) flights were performed on an irrigated apple tree orchard located in Southern France. The 6400 m² plot was composed of 520 apple trees which were disposed in 10 rows. In this field set-up, five well irrigated rows alternated with five rows submitted to progressive summer water constraints. For remote image acquisition, on 4th July, 19th July, 1st August and 6th September UAV flights with three cameras onboard (thermal, visible and near infrared) were performed at solar noon. On 1st August, five successive UAV flights were carried out at 8, 10, 12, 14 and 16 h (solar time). By using self-developed software, frames were automatically extracted from the recorded thermal video and turned in the right image format. The temperature of four different targets (hot, cold, wet and dry bare soil) was continuously measured by the IR120 thermo-radiometers during each flight, for radiometric calibration purpose. Based each on thirty images, all ortho-mosaics were successfully obtained. As high spatial resolution imagery requires high precision geo-location, and the root mean squared error (RMSE) of each ortho-mosaic positioning was calculated in order to assess its spatial accuracy. RMSE values were less than twice the pixel size in every case, which allowed a precise overlapping of the mosaics created. Canopy temperature data extracted from thermal images showed significantly higher temperatures in water stressed trees compared to well irrigated, difference being related to severity of water stress. Thanks to the ultra-high resolution of remote images obtained (<0.1m spatial resolution for thermal infrared images), and beyond its capacity to delineate efficiently each individual tree, the methodology presented here will also make it possible the analysis of intra-canopy variations and the accurate calculation of vegetation and water stress indices.

Keywords: Unmanned aerial vehicle, Thermal infrared, Drought, Phenotyping, Georeferencing, Ortho-mosaics, geometric correction

Introduction

In the context of climate change, statistical *trend toward* a general temperature increase, and more frequent and intense extreme *weather* events are expected (IPCC, 2007). Longer periods of drought are susceptible to occur in the future during spring and summer periods, notably in the Mediterranean region (Giorgi and Lionello, 2008), and this will likely threaten the temperate fruit production, in particular where irrigation is limited by water resources. Adapting fruit trees to abiotic stresses such as water stress is thus a new challenging issue for fruit crops, whose water use needs to be deeply re-considered.

Precision agriculture methods can contribute to drought assessment and irrigation scheduling. For the estimation of crop water status at tree scale, Unmanned Aerial Vehicle (UAV) imagery offers both global vision of the whole crop and the needed high spatial resolution. Furthermore, the UAV potential for assessing drought stress or estimating the latent heat flux (evapotranspiration flux density) of agricultural fields has already been shown in numerous studies (e.g. Sullivan et al., 2007; Berni et al., 2009a,b; González-Dugo et al., 2012; Zarco-Tejada et al., 2012). Technical progress in thermal imagery made it possible to widen its possibilities of application in plant sciences, with affordable devices that are suitable for airborne high resolution image acquisition. Monitoring stomatal conductance on the base of thermal imagery can be a better indicator of plant response to drying soil than monitoring the leaf water potential,

because stomatal closure can occur even before any change in plant water status (Jones 2004). Stoll and Jones (2007) explored the possibility of using thermal imaging as a tool for monitoring plant stress, showing that the canopy temperature difference between plants submitted to different water regimes can be very helpful to detect water stress. Sela et al. (2007) combined thermal and visible images to estimate leaf water potential status of cotton crops. Galleguillos et al. (2011) compared various temperature differencing methods to estimate daily grapevine evapotranspiration by using ASTER satellite data. More recently, Cohen et al. (2012) developed a methodology based on aerial thermal imagery and watershed image segmentation analysis, to estimate water status of palm trees from aerial thermal images.

Thermal imagery is particularly suitable for monitoring areas of small to medium size (up to some hundreds of hectares). In this context, using UAVs provides the possibility of frequent flights, allowing water stress assessment and irrigation scheduling among other applications. This kind of imagery has been successfully employed in multi-temporal studies over fruit tree orchards (González-Dugo et al., 2013). In low-altitude remote sensing, a large number of images, taken within a short time span, must be mosaicked. Software is available that creates a mosaicked and geo-referenced image relatively automatically, often using the GPS location of the UAV or airplane (e.g. Berni et al., 2009b). Some studies have been focused on the georeferencing improvement of mosaics from UAV-sensed images by determining the optimum number of Ground Control Points (GCPs) and the flying altitude (Gómez-Candón et al., 2011; Gómez-Candón et al., 2014). Wang et al. (2008) developed a practical method for mosaicking video frames from thermal infrared cameras based on Scale Invariant Feature Transform algorithm. In spite of this, thermal image processing still remains a time-consuming step that requires expert knowledge in both software and thermography. This must be largely automated before infrared thermography can be applied as a common tool in agricultural practice (Maes & Steppe, 2012).

Stress indices are a powerful tool for assessing the effects of drought on crop plants. One of the most commonly used is the Crop Water Stress Index (CWSI) developed by Idso et al. (1981). One extension of the CWSI is the Water Deficit Index (WDI), which has been proposed by Moran et al. (1994) for non-fully covering crops. This index, based on a combination of thermal imagery with other vegetation indices, enables the interpretation of canopy surface temperature. It beforehand determines, by inverting surface energy balance, the evaporative extremes that are used for the temperature differencing, which involves ancillary information about aerodynamic and micrometeorological conditions. Virlet et al. (2014) computed WDI through plotting the vegetation index value (using Normalized Difference Vegetation Index, NDVI) versus the difference between vegetation surface (T_s) and air (T_a) temperatures and demonstrated relevancy of WDI for assessing the variability of tree evapotranspiration in response to soil drought in a field phenotyping trial.

As part of a long term research to investigate the possibilities and limitations of UAV imagery in accurately mapping water stress in field crops, it is crucial to explore the potential of generating accurate ortho-mosaicked imagery from multiple overlapped frames for proper discrimination of illuminated leaves from shaded leaves and soil. This is particularly important when heterogeneous plant cover, like orchards or vineyards are considered. Such an approach should demonstrate the accuracy of the ortho-images obtained and the further possibility of generating accurate water stress indices. This can be helpful to assess the variability of raw temperatures and stress indices within individual tree canopies, as shown by González-Dugo et al. (2012).

In this paper we report a study of the geometric accuracy of the ortho-imagery obtained from multiple overlapped images taken in apple tree orchards using UAV-sensed imagery. The aim of this research is to present a comprehensive methodology to obtain thermal and multispectral ortho-mosaics over an apple tree field experiment. As the assessment of crop water status and its temporal development is focused, multi-temporal ortho-mosaics were created and their ortho-rectification accuracy compared. Furthermore, canopy temperature data were retrieved for well irrigated and water stressed trees in order to assess thermal difference between both treatments.

Material and methods

The proposed method is applicable for computation of water stress indices. It comprises the following main steps (Figure 1): image acquisition; image calibration; ortho-rectification and georeferencing; mosaicking; and image band combination to compute the final values of the stress index. UAV remotely-sensed thermal video files have to be pre-processed as following: first, image extraction from thermal video files; second, correction in geometry and radiometry; and third, ortho-mosaicking. This process requires the use of specific software and a system for concomitant ground temperature acquisition. UAV imagery and measurements *in planta* have been both developed during this research.

Locations and data acquisition

Studies were conducted in an apple tree orchard located at INRA Melgueil station (Diaphen experimental platform), near Montpellier, France (N43°36, E03°58, Figure 2). 520 adult apple trees, planted at 5m * 2m distance, were disposed into ten rows. In one row out of two, irrigation was restricted two weeks before the first flight, in order to induce progressive water deficit. Combination of a large genetic panel and contrasting water regimes was settled for spatial and temporal comparison purposes. Ortho-images were taken during summer 2013 by using a MikroKopter UAV (Figure 3a) equipped with a low weight Thermoteknix Miricle 307K thermal camera (640x480 detector resolution) and two Sigma DP1x digital cameras (2640 x 1760 pixels; Figure 3b), one of them being modified according to Lebourgeois et al. (2008) to acquire near infrared images. UAV flights and image acquisition were carried out under fully sun conditions, on 4th July, 19th July, 1st August and 6th September, and performed at solar noon. On 1st August, five UAV flights also took place at 8, 10, 12, 14 and 16 h (solar time) in order to yield intra-day dynamics of plant temperature. UAV images were acquired at 40m altitude and flight length was 4-6 minutes approximately, depending on wind conditions. The image along-track overlap was 80% and cross-track overlap was 60%. A series of 30 UAV navigation waypoints were fixed within each flight, to ensure stable conditions each 9 meters and prevent blurred RGB and NIR images. A total of 30 images per flight were needed to cover the whole field (one image each 8 seconds approximately). Over the plot, a total of 15 GCPs were placed and geo-referenced using a Leica RTK GPS (Leica Geosystems®) with an accuracy of 1cm. For radiometric correction purposes, IR120 thermo-radiometers (Campbell® Scientific Inc.) were installed to continuously measure the brightness temperature of four contrasted targets: cold (white polystyrene), hot (black-painted), and also dry and wet bare soil.

Thermal imagery pre-processing

Data were pre-processed in two main steps: image extraction from video files and geometric and radiometric calibration. Self-developed specific software was developed for automatically performing the process. The software is based on Python programming language (Python Software Foundation, 9450 SW Gemini Dr., ECM# 90772, Beaverton, OR 97008, USA) and the avconv command line program for transcoding multimedia files (Libav Open source audio and video processing tools, www.libav.org).

Video frames extraction and image format transformation

To avoid data errors due to overheating, the uncooled thermal camera itself had a system for continuous self-calibration, which was set to occur every 4 seconds. To minimize acquisition errors, only the first frame after every self-calibration was extracted. After extraction, each raw frame was automatically transformed into the desired image format.

Geometric correction and ground data-based radiometric calibration

Resulting thermal images had some errors due to some lens distortion effects. Geometric correction was based on lens geometric coefficients, which were provided by camera manufacturer.

Each flight was divided into two tracks, flying over the ground targets at the beginning and the end of each track. Radiometric calibration coefficients were calculated by linear interpolation, using the ground temperature data (from hot, cold, and soil targets). Afterwards, coefficients were applied to TIR images for radiometric calibration.

Ortho-mosaicking process

The exterior position and orientation parameters of the UAV were provided by the UAV inertial system. These parameters and GCPs coordinates were used as input data for the Leica Photogrammetric Suite 2010 (LPS, Leica Geosystems®, 2006) software, for ortho-rectification by aero-triangulation and mosaicking. For the near infrared and visible images (NIR and RGB), calibration parameters were calculated by comparing overlapping zones of consecutive images during the aero-triangulation process. Radiometric correction for RGB and NIR images was based on invariant field targets in each spectral band, with Date 1 as a reference, so that the acquisitions would be comparable from one date to the others.

For the thermal images, calibration was performed as explained in the previous section. Afterwards, the images were combined into a seamless ortho-mosaicked image of the entire field.

Accuracy assessment

Accuracy assessment consisted of estimating the error associated with ortho-rectification of the UAV imagery. This error is commonly expressed by the root mean squared error (RMSE) of the ortho-mosaicked image. The RMSE is a global indicator of the quality of the mosaic, and is based on the residuals of the image co-ordinates and the ground co-ordinates. The geometric accuracy of the ortho-rectified mosaic was assessed using the co-ordinates of seven out of 15 GCPs collected at ground level

using the differential GPS. Then, the RMSEs were calculated as follows: once the mosaic was generated, co-ordinates of the seven GCPs measured in the field were compared to the co-ordinates of these seven GCPs in the mosaicked image using ENVI software (Research System Inc., Boulder, CO, USA). Finally, the differences between DGPS co-ordinates and co-ordinates from the mosaicked image were used for calculating the RMSE.

The RMSE for an image with n validation points is assessed as follows (ERDAS, 1999):

$$RMSE = \left[\sum_{i=1}^n [(X_s - X_r)^2 + (Y_s - Y_r)^2] / n \right]^{1/2} \quad (1)$$

where X_s and Y_s are the geospatial co-ordinates of the point of the source image, and X_r and Y_r are the co-ordinates of the same point DGPS measured at field level.

Measurement of temperature difference

To assess performance of ortho-mosaics obtained, three dates were selected according to the increasing severity of water stress, 4th July (no stress), 1st August (medium stress) and 6th September (high stress). For each date, differences between apple tree canopy temperature (T_c) and air temperature (T_a) were calculated for the well watered (WW) and the water stressed (WS) trees separately. Finally analysis of variance was performed.

Results and discussion

For both situations, inter-day and intra-day flights, the UAV image series were successfully taken and ortho-rectified. Besides, as a result of the development of specific software, the image extraction and calibration was more automatic and faster than using the conventional methods.

Tables 1 and 2 show the measured RMSE of the ortho-mosaics taken at 4 different summer dates, along with the drought progression in field trial, and on 1st August for five different moments of the day. The ortho-mosaics generated had a spatial resolution of 0.02m for near infrared (NIR) and visible (RGB) bands and 0.10m in thermal infrared (TIR). Those spatial resolutions are appropriate for the water stress assessment at individual tree level, since canopies diameter were 1 to 3m.

The overall RMSEs were very similar between ortho-mosaics regardless of the moment of the flight or the kind of image acquired (TIR, NIR or RGB). Thus, the results did not show large differences in accuracy between ortho-mosaics which were similar whatever the date. One of the relevant results of the study is that the moment of acquisition did not affect the georeferencing accuracy of the mosaicked image. Furthermore, the final RMSE value was less than twice the image pixel size, which is accurate enough according to Laliberte et al (2010). Furthermore, ortho-mosaics were accurate enough to be applied on multi-temporal studies, according to the methodology proposed by Virlet et al. (2014), since they were radiometrically corrected too. The low RMSEs for RGB and NIR (about 1 pixel) permit the precise computation of vegetation indices. The fairly low RMSE for TIR image georeferencing (lower than 0.20m) will allow a satisfactory extraction of thermal data within the tree canopies, upon consideration of a representative central zone. On the basis of the image series obtained, analysis of intra-crown variations will also be possible. However, other factors must be taken into account while acquiring this kind of high resolution imagery at low flying height, like directional effects (Hakala et al., 2013).

Comparison between canopy surface temperature in WW and WS trees (all genotypes confounded) is represented in figure 4, while the environmental data during image acquisition are shown in table 3. There was no statistical difference in mean T_c - T_a values of WW and WS trees before water stress establishment (July 4th). In contrast, highly significant differences were found on the second and third dates. This result was consistent with the stem water potential data acquired (table 3) showing clear water status differences. Nevertheless, thermal data yielded in WW and WS trees for 3rd date showed less elevated T_c - T_a values than for 2nd date, due to lower irradiance conditions.

Conclusions

The proposed methodology is suitable for obtaining thermal and multispectral ortho-mosaics, reducing the pre-processing time needed for image extraction and calibration. Due to the automation of the process, its cost efficiency is increased. This kind of remotely-sensed imagery is presently contributing to a tree phenotyping program at field, whose aim is to analyze the genotypic variability of apple tree response to increasing water constraints. The spatial resolution obtained allows carrying out the water stress assessment at individual tree level. As UAV-borne image series can be acquired with short revisit time, temporal series can be developed at seasonal and daily scales. The accuracy obtained is enough to perform comparisons in these temporal series.

Acknowledgments

Thanks to Cyril Portal and Sébastien Martinez for helping in field imaging. This research was partly funded by Hiri-FAP Project (Open Science Nr 1202-070, Agropolis Fondation).

References

- Berni, J.A.J., Zarco-Tejada, P.J., Sepulcre-Canto, G., Fereres, E., Villalobos, F. Mapping canopy conductance and CWSI in olive orchards using high resolution thermal remote sensing imagery. In: *Remote Sensing of Environment* 113, 2380–2388. (2009a).
- Berni, J.A.J., Zarco-Tejada, P.J., Suarez, L., Fereres, E. Thermal and narrowband multispectral remote sensing for vegetation monitoring from an unmanned aerial vehicle. In: *IEEE Transactions on Geoscience and Remote Sensing* 47, 722–738. (2009b).
- Cohen, Y., Alchanatis, V., Prigojin, A., Levi, A., Soroker, V. Use of aerial thermal imaging to estimate water status of palm trees. In: *Precision Agriculture* 13, 123-140. (2012).
- ERDAS Inc. RMS error. ERDAS field guide (5th ed., 672 pp.). Atlanta, GA: ERDAS Inc. pp. 362–365. (1999).
- Galleguillos, M., Jacob, F., Prévot, L., French, A., Lagacherie, P. Comparison of two temperature differencing methods to estimate daily evapotranspiration over a Mediterranean vineyard watershed from ASTER data. In: *Remote Sensing of Environment* 115, 1326–1340. (2011).
- Giorgi, F., Lionello, P. Climate change projections for the Mediterranean region. In: *Global and Planetary Change* 63, 90-104. (2008).
- Gómez-Candón, D., López-Granados, F., Caballero-Novella, J. J., Gómez-Casero, M. T., Jurado-Expósito, M., García-Torres, L. Geo-referencing remote images for precision agriculture using artificial terrestrial targets. In: *Precision Agriculture*, 12, 876–891. (2011).
- Gómez-Candón, D., De Castro, A.I., López-Granados, F. Assessing the accuracy of mosaics from unmanned aerial vehicle (UAV) imagery for precision agriculture purposes in wheat. In: *Precision Agriculture*, 15, 44-56. (2014).
- González-Dugo, V., Zarco-Tejada, P., Berni, J.A.J., Suárez, L., Goldhamer, D. Fereres, E. Almond tree canopy temperature reveals intra-crown variability that is water stress-dependent. In: *Agricultural and Forest Meteorology* 154–155, 156–165. (2012).
- González-Dugo, V., Zarco-Tejada, P., Nicolás, E., Nortes, P.A., Alarcón J.J., Intrigliolo, D.S., Fereres, E. Using high resolution UAV thermal imagery to assess the variability in the water status of five fruit tree species within a commercial orchard. In: *Precision Agriculture* 14, 660-678. (2013).
- Hakala, T., Honkavaara, E., Saari, H., Mäkynen, J., Kaivosoja, J., Pesonen, L., Pölönen, I. Spectral imaging from UAVs under varying illumination conditions. *International Archives of the Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences* (XL-1/W2), 189–194. (2013).
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). *Climate Change 2007: The Physical Science Basis*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2007.

- Idso, S.B., Jackson, R.D., Pinter, P.J., Reginato, R.J., Hatfield, J.L. Normalizing the stress-degree-day parameter for environmental variability. *Agricultural and Forest Meteorology* 24, 45–55. (1981).
- Jones, H.G. Irrigation scheduling: Advantages and pitfalls of plant-based methods. In: *Journal of Experimental Botany* 55, 2427–2436. (2004).
- Laliberte, A.S., Herrick, J.E., Rango, A., Winters, C. Acquisition, orthorectification, and object based classification of unmanned aerial vehicle (UAV) imagery for rangeland monitoring. *Photogrammetric Engineering and Remote Sensing*, 76, 661–672. (2010).
- Lebourgeois V, Bégué A, Labbé S, Mallavan B, Prévot L, Roux B. 2008. Can commercial digital cameras be used as multispectral sensors? A crop monitoring test. *Sensors* 8, 7300-7322. (2008).
- Leica Geosystems. Leica Photogrammetry Suite Project Manager. Leica Geosystems Geospatial Imaging, LLC, Norcross, GA, (434 pp.) Retrieved July 25, 2013, from: <http://pdf.ebooks6.com/Leica-Photogrammetry-Suite-pdf.pdf> (2006).
- Maes, W.H. Steppe, K. Estimating evapotranspiration and drought stress with ground-based thermal remote sensing in agriculture: a review. In: *Journal of Experimental Botany* 63, 4671–4712. (2012).
- Moran, M., Clarke, T., Inoue, Y., Vidal, A. Estimating crop water deficit using the relation between surface–air temperature and spectral vegetation index. In: *Remote Sensing of Environment* 49, 246–263. (1994).
- Sela, E., Cohen, Y., Alchanatis, V., Saranga, Y., Cohen, S. and Möller, M. Thermal imaging for estimating and mapping crop water stress in cotton. In: J. V. Stafford (Ed.), *European conference in precision agriculture* (pp. 365–371). Wageningen: Academic Publications. (2007).
- Stoll, M., Jones, H.G. Thermal imaging as a viable tool for monitoring plant stress. In: *International Journal of Vine and Wine Sciences*. 41, 77–84. (2007).
- Sullivan, D.G., Fulton, J.P., Shaw, J.N., Bland, G. Evaluating the sensitivity of an unmanned thermal infrared aerial system to detect water stress in a cotton canopy. In: *Transactions of the ASABE* 50, 1955–1962. (2007).
- Virlet, N., Lebourgeois, V., Martinez, S., Costes, E., Labbé, S., Regnard, J.L. Stress indicators based on airborne thermal imagery for field phenotyping a heterogeneous tree population for response to water constraints. In: *Journal of Experimental Botany*. (In press, 2014). doi:10.1093/jxb/eru309.
- Wang, Y., Camargo, A., Fevig, R., Martel, F., Schultz, R.R. Image Mosaicking from Uncooled Thermal IR Video Captured by a Small UAV. In: *IEEE Southwest Symposium on Image Analysis and Interpretation*, 2008. 161-164. (2008).
- Zarco-Tejada, P.J., González-Dugo, V., Berni, J.A.J. Fluorescence, temperature and narrow-band indices acquired from a UAV platform for water stress detection using a micro-hyperspectral imager and a thermal camera. In: *Remote Sensing of Environment* 117, 322–337. (2012).

Table 1. Overall georeferencing errors at INRA Melgueil plot. UAV images were taken at 4 different dates. Images from three different cameras: Visible RGB (Red, Green, Blue), Near Infrared (NIR) and Thermal Infrared (TIR).

		Kind of image (spatial resolution)		
		RGB (0.02m)	NIR (0.02m)	TIR (0.10m)
4 th July 2013	RMSE $\pm$ s.d.	0.028 $\pm$ 0.023	0.025 $\pm$ 0.018	0.182 $\pm$ 0.095
19 th July 2013	RMSE $\pm$ s.d.	0.024 $\pm$ 0.015	0.026 $\pm$ 0.016	0.194 $\pm$ 0.100
1 st August 2013	RMSE $\pm$ s.d.	0.027 $\pm$ 0.010	0.025 $\pm$ 0.009	0.150 $\pm$ 0.070
6 th Sept.2013	RMSE $\pm$ s.d.	0.026 $\pm$ 0.009	0.025 $\pm$ 0.007	0.153 $\pm$ 0.090
Mean	RMSE $\pm$ s.d.	0.026 $\pm$ 0.002	0.026 $\pm$ 0.001	0.170 $\pm$ 0.021

RMSE (root mean squared error) $\pm$ standard deviation of validation points of each image (in meters).

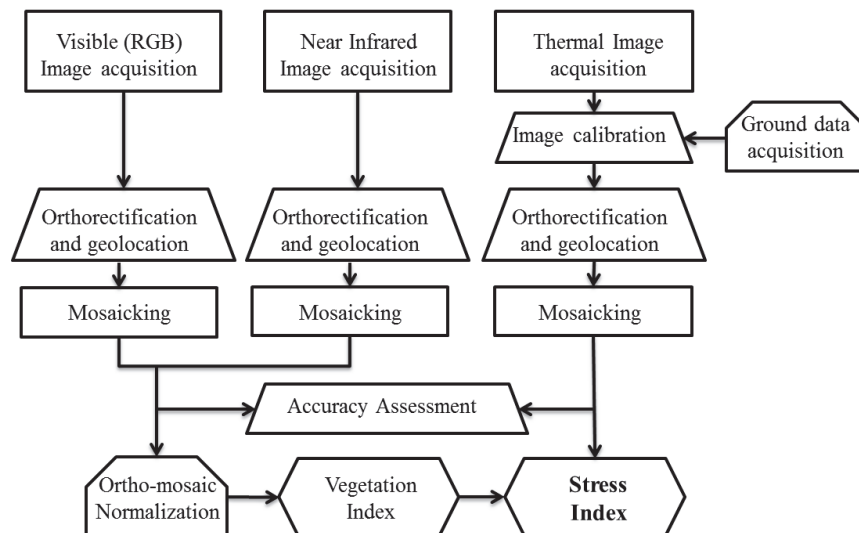


Fig. 1.Flowchart for Water Deficit Index (WDI) calculation.

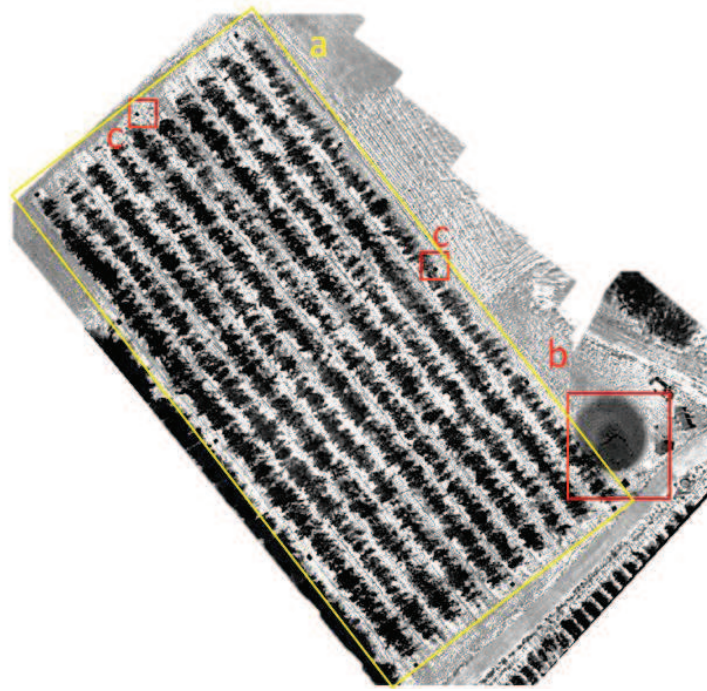


Fig. 2. Thermal ortho-mosaic of the study plot (August, 8th). (a) Apple tree orchard. (b) Hot and cold ground targets. (c) Georeferencing ground control points.

Table 2. Overall georeferencing errors at Melgueil plot. UAV images were taken on 1st August 2013 at 5 different moments of the day. Images from three different cameras: Visible RGB (Red, Green, Blue), Near Infrared (NIR) and Thermal Infrared (TIR).

		Kind of image (spatial resolution)		
		RGB (0.02m)	NIR (0.02m)	TIR (0.10m)
<u>Solar time</u>				
8:00	RMSE $\pm$ s.d.	0.027 $\pm$ 0.011	0.026 $\pm$ 0.012	0.196 $\pm$ 0.094
10:00	RMSE $\pm$ s.d.	0.027 $\pm$ 0.010	0.025 $\pm$ 0.009	0.150 $\pm$ 0.070
12:00	RMSE $\pm$ s.d.	0.029 $\pm$ 0.015	0.027 $\pm$ 0.006	0.191 $\pm$ 0.086
14:00	RMSE $\pm$ s.d.	0.027 $\pm$ 0.011	0.029 $\pm$ 0.013	0.194 $\pm$ 0.105
16:00	RMSE $\pm$ s.d.	0.028 $\pm$ 0.009	0.026 $\pm$ 0.011	0.192 $\pm$ 0.060
Mean	RMSE $\pm$ s.d.	0.028 $\pm$ 0.001	0.026 $\pm$ 0.001	0.185 $\pm$ 0.019

RMSE (root mean squared error) $\pm$ standard deviation of validation points of each image (in meters).

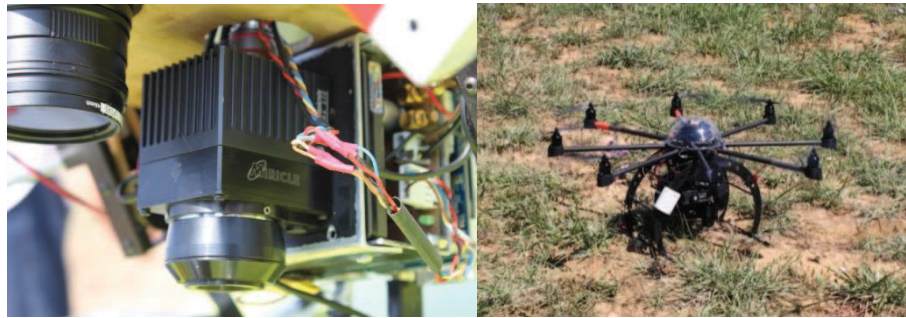


Fig. 3.a. Mikrokopter UAV. **b.** Detail of the camera mount with the thermal and one of the two DP1 cameras installed. The pico-computer controlling the thermal camera is also shown on the right side.

Table 3. Air Temperature, Relative Humidity, Solar Radiation and Stem Water Potential (Ψ_{stem}) during remote imagery acquisition. Three dates are shown, 4th July, 1st August and 6th September. Ψ_{stem} measured for a sample of 5 genotypes * 2 repetitions * 2 water regimes.

	Date		
	<u>07/06/2013</u>	<u>08/01/2013</u>	<u>09/06/2013</u>
Air Temp. (°C)	28.93 ± 0.13	29.10 ± 0.27	27.61 ± 0.22
HR (%)	31.78 ± 0.78	56.71 ± 1.54	46.09 ± 3.47
Solar Radiation (kW/m ²)	0.93 ± 0.00	0.93 ± 0.00	0.78 ± 0.03
Ψ WW (MPa)	-1.12 ± 0.21	-0.93 ± 0.21	-0.98 ± 0.52
Ψ WS (MPa)	-1.10 ± 0.20	-1.41 ± 0.36	-1.76 ± 0.48

Mean values $\pm$ s.d.

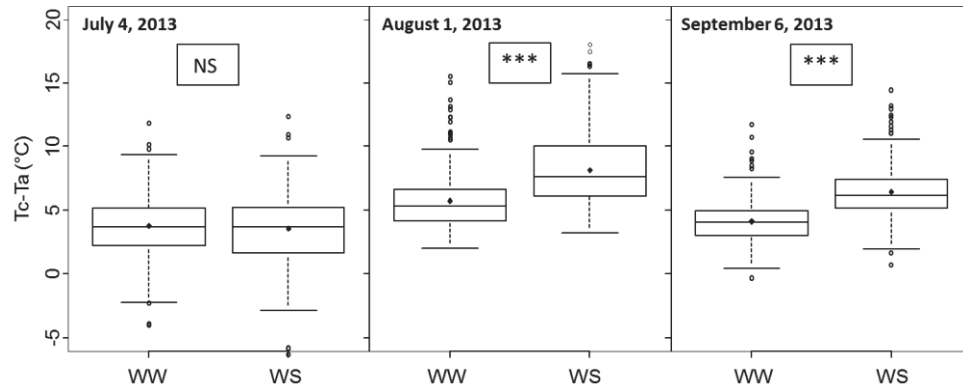


Fig. 4. Distribution of differences between canopy temperature and air temperature ($T_c - T_a$) for the well watered (WW) and the water stressed (WS) trees (122 genotypes). Three dates: 4th July (no stress), 1st August (medium stress) and 6th September (high stress). Each box plot shows the median value, the 1st and 3rd quartiles, and the 1st and 9th deciles. Significant p -values are represented as follows: *** for $p \leq 0.001$; NS: not significant.

Résumé

Dans le contexte des changements climatiques prévisibles et d'une demande évaporative accrue vis à vis des cultures, ce travail de thèse vise à évaluer la variabilité génétique du pommier pour sa réponse à la contrainte hydrique. Cette évaluation est d'un intérêt certain pour l'amélioration future de l'espèce, qu'il s'agisse de mieux tolérer le stress pouvant résulter d'une sécheresse temporaire du sol, ou d'une efficacité accrue d'utilisation de l'eau. Les méthodes de phénotypage actuellement disponibles pour l'étude de la réponse à la contrainte hydrique ne permettent pas un haut débit de mesure compatible avec les comparaisons simultanées entre de nombreux individus. En conséquence, ce travail de thèse s'est focalisé sur l'application de l'imagerie multi-spectrale aéroportée comme outil de phénotypage à haut débit en condition de plein champ et sur l'évaluation de sa pertinence pour l'analyse quantitative des réponses à la contrainte hydrique et la recherche des déterminismes génétiques associés. Les essais ont été réalisés sur une population hybride de pommiers (croisement Starkrimson x Granny Smith) âgée de 4 ans au début de l'étude, implantée dans le sud de la France. A partir d'images acquises dans les longueurs d'onde du visible, du proche infrarouge et de l'infrarouge thermique, à une résolution spatiale proche de 30cm, différents indices de végétation et de stress ont été calculés permettant d'apprécier la vigueur des arbres et leur transpiration. La prise en compte, dans des modèles linéaires mixtes, de six dates d'expérimentation, couvrant deux campagnes d'acquisitions, et de régimes d'irrigation différenciés sur la population a permis de mettre en évidence l'héritabilité des indices phénotypiques et conduit à la détection de nombreux QTLs. 18 QTLs se sont révélés indépendants de la date d'acquisition. Pour quatre de ces QTLs, dits adaptatifs, c'est-à-dire exprimés en conditions de stress, un certain nombre de gènes candidats potentiellement impliqués dans les réponses précoces responsables de la régulation stomatique ont été identifiés.

Mots clés : arbre fruitier, télédétection, indices spectraux, infrarouge thermique, transpiration, génétique quantitative.

Abstract

In the context of foreseen climate changes and higher evaporative demand in crops, this PhD work is aiming at assessing the apple tree variability in response to hydric constraints. This could be of great interest for future breeding programs in this species, either in respect to temporary abiotic stress tolerance, or looking at a better water use efficiency. Phenotyping methods presently available for evaluating the plant response to hydric constraints do not allow the high-throughput that could be compatible with simultaneous comparison of a high number of individuals. As a consequence, this thesis focused on the application of airborne multispectral imagery as a tool for high-throughput field phenotyping, and it assessed the relevancy of this method for quantitative analysis of response to drought and further dissection of associated genetic determinisms. Trials were realized on a segregating hybrid apple population (Starkrimson x Granny Smith cross), 4-year old at the beginning of study, installed in the South of France. Images acquired in visible, near infrared and thermal infrared, with a spatial resolution close to 30cm, were the calculation basis of various vegetation and stress indices, allowing estimation of individual tree vigor and transpiration. Linear mixed models taking account of six flight dates, covering two acquisition campaigns and including two contrasted irrigation regimes over the apple population, made it possible to highlight the heritability of phenotypic indices and to perform numerous QTLs mapping. Eighteen QTLs were revealed independently from the acquisition date. Out of this QTLs set, a further analysis on 4 of them, which were adaptive i.e. expressed in stress conditions, allowed first identification of putative candidate genes potentially involved in the early stomatal closure.

Keywords: fruit tree, remote sensing, spectral indices, thermal infrared, transpiration, quantitative genetics.