

L'ABONDANCE ISOTOPIQUE NATURELLE DU CARBONE 13 DES GRAINS DE BLÉ : DES INFORMATIONS SUR LE FONCTIONNEMENT PHOTOSYNTHÉTIQUE DES CULTURES EN CHAMP

Eliane DELEENS, Lynda HANNACHI et Thierry GENTER

Institut de Biotechnologie des Plantes, URA 1128,
groupe "Structure et Métabolisme des Plantes", Bat 630,
Université de Paris - Sud, Centre d'Orsay
91405 ORSAY Cedex

Le présent texte permet de comprendre l'utilisation d'un diagnostic isotopique pour caractériser l'efficacité d'utilisation de l'eau d'une plante ou d'une culture. Ce développement décrit succinctement les bases fondamentales de ce test isotopique et en donne des exemples d'utilisation pour la comparaison variétale chez le blé. Ces deux volets ont été précédemment décrits d'une manière plus détaillée dans deux articles d'un compte-rendu de colloque organisé par l'INRA (DELEENS *et al.*, 1994a et DELEENS *et al.*, 1994b).

1. - COMPOSITION ISOTOPIQUE DU CARBONE & EFFICACITÉ D'UTILISATION DE L'EAU

1.1 - Les isotopes stables

Pour une grande majorité de physiologistes et de biochimistes tant dans le domaine végétal qu'animal, les isotopes sont surtout représentés par les radioéléments utilisés pour la localisation et le traçage, le ^{14}C en est l'exemple typique. Or, les éléments constitutifs de la matière vivante existent *naturellement* sous différentes formes isotopiques stables. Ces formes isotopiques stables d'un même élément ont même nombre de protons, même cortège électronique mais des nombres différents de neutrons. Ainsi, il existe des isotopes stables pour le carbone (^{13}C & ^{12}C), l'azote (^{15}N & ^{14}N), l'oxygène (^{18}O & ^{17}O & ^{16}O), l'hydrogène (D&H), le soufre (^{32}S & ^{33}S & ^{34}S & ^{36}S). Les isotopes dits "légers" sont les plus abondants et les isotopes dits "lourds" sont les plus rares. Les pourcentages d'isotopes lourds par rapport à la totalité des éléments peuvent aller jusqu'à 1 %. Ces proportions se mesurent par spectrométrie de masse isotopique. Cette méthodologie a été mise en oeuvre initialement en 1954 par CRAIG. Elle a été traditionnellement développée en chimie et en géologie depuis. Elle a fait une entrée timide dans les sciences de la vie vers l'année 1975. Elle est maintenant couramment acceptée dans le domaine végétal et de nombreux laboratoires se sont équipés depuis 1985, date à laquelle l'automatisation des analyses a fait de grands progrès.

L'inégalité des masses des molécules comportant les deux isotopes de l'élément se traduit par des propriétés physiques (densité, point de fusion et d'ébullition, diffusion en milieu liquide ou gazeux) et chimiques (vitesse de réaction et constante d'équilibre) distinctes. La répartition sélective des deux isotopes au cours des transformations physiques ou chimiques est appelée fractionnement isotopique. La modification dans la répartition isotopique du produit engendrée par la transformation est de faible amplitude, mais c'est une grandeur reproductible qui obéit aux lois physico-chimiques. D'une manière simple, on comprend que l'effet isotopique est plus fort quand l'augmentation de masse apportée par l'isotope est importante comparée à la masse totale de la molécule. Le meilleur exemple est la molécule d'hydrogène H₂, masse 2 et DH, masse 3. La molécule qui nous intéresse ici est le CO₂. Elle va avoir la masse 44 lorsqu'elle ne comporte pas d'isotopes lourds, la masse 45 lorsqu'elle comporte soit un atome de ¹³C soit un atome de ¹⁷O et enfin la masse 46 lorsqu'elle comporte un atome de ¹⁸O. Au niveau naturel, en raison de la faible fréquence des isotopes lourds, il n'y a pas de molécules en quantité mesurable ayant conjointement deux isotopes lourds.

1.2 - Le fractionnement isotopique

L'ensemble des effets des différents facteurs intervenant sur le fractionnement isotopique se traduit par une valeur spécifique de composition isotopique naturelle d'un composé, d'un tissu ou d'un individu qui caractérisera un phénotype métabolique dans ses conditions de milieu. Le développement ci-dessous se propose de justifier cette affirmation.

Les compositions isotopiques des produits naturels représentent la résultante des effets de facteurs qui agissent sur le fractionnement isotopique. Ces facteurs sont :

- 1) la concentration et la disponibilité des éléments soumis à l'incorporation (CO₂, N₂, NO₃) ainsi que les contraintes liées à leur diffusion dans les milieux gazeux ou liquide (résistance de couche limite, passage à travers les stomates, circulation dans les méats, dissolution dans les milieux cellulaires) ;
- 2) le particularisme des réactions enzymatiques. Par exemple, *in vitro*, la phosphoénol pyruvate carboxylase qui est la carboxylase primaire des végétaux de type C₄ comme le maïs rejette faiblement le ¹³C alors que la RuBisCo, enzyme primaire des végétaux de type C₃ comme le blé le rejette fortement ;
- 3) le degré de limitation des étapes successives de la transformation de l'élément soumis à l'incorporation. En reprenant l'exemple de la molécule de CO₂, le fractionnement lors de la photosynthèse n'est pas la simple addition des fractionnements isotopiques à la diffusion et la carboxylation, mais va dépendre aussi des vitesses relatives des deux étapes.

Pour ce dernier aspect, on comprend intuitivement que si une première étape est limitante, elle fournit en quantité faible le substrat pour la transformation suivante. Dans ce cas, la deuxième transformation, plus rapide que la précédente, "choisira" tout d'abord les isotopes légers, puis, elle prendra une proportion de plus en plus forte de lourds, pour à terme utiliser la totalité des isotopes du substrat. Elle restitue donc un produit de composition isotopique identique à son substrat quand ce dernier est entièrement utilisé. Ainsi, les scientifiques ont déterminé les valeurs de fractionnement isotopique qui caractérisent chaque étape prise isolément : c'est le *fractionnement isotopique intrinsèque*. Dans une transformation

comprenant la succession de deux étapes, le fractionnement mesuré sur la transformation totale est le *fractionnement isotopique global*. Si la première étape est limitante, elle ne permet pas à la deuxième étape d'exercer son fractionnement propre. Le fractionnement global est alors proche du fractionnement intrinsèque de la première étape. A l'inverse, si la deuxième étape est limitante, le substrat intermédiaire s'accumule et la deuxième étape a tout loisir de marquer son fractionnement intrinsèque. *C'est l'étape limitante qui imprime son fractionnement isotopique, avec d'autant plus d'intensité que cette limitation est marquée.* Ce modèle décrivant le fractionnement isotopique d'une séquence peut être appliqué à tout niveau d'organisation du vivant (mécanisme réactionnel, séquence de réactions, fonction isolée, fonctionnement intégré, écosystème). Chaque information globale obtenue pour un niveau donné peut être incorporée comme information intrinsèque dans le niveau d'organisation supérieur. La diversité des isotopes stables que l'on peut utiliser ouvre un domaine d'étude à un très large éventail de questions métaboliques, tant du métabolisme carboné et azoté que des phénomènes de transfert de l'eau.

En agrophysiologie, on n'a pas attendu les isotopes stables et leur théorie d'usage pour trouver l'emplacement des étapes limitantes. Cependant, depuis 1984 grâce à FARQUHAR et RICHARDS, le formalisme isotopique a été compris. Il apporte un moyen de classer le degré de limitation fonctionnelle des voies métaboliques *in vivo* chez les végétaux. C'est un atout indispensable lorsque l'on veut utiliser la variabilité génétique et classer des génotypes.

1.3 - La composition isotopique des photosynthétats de plantes C3

La photosynthèse de type C3 est une transformation du CO₂ atmosphérique en carbone organique après deux étapes, diffusion et carboxylation. Ces deux étapes élémentaires ont les fractionnements isotopiques intrinsèques suivants, $a = 4,4 \cdot 10^{-3}$ pour la diffusion et $b_R = 30 \cdot 10^{-3}$ pour la carboxylation via la RuBisCo. L'expression la plus courante et la plus simple du fractionnement isotopique global (Δ) de la photosynthèse C3 est :

$$\Delta = a + P_i/P_a (b_R - a)$$

On constate que le fractionnement isotopique global de la photosynthèse C3 dépend de paramètres isotopiques constants (a et b_R respectivement) et d'un paramètre physiologique variable, P_i/P_a . P_i est la pression partielle du CO₂ à l'intérieur des feuilles et P_a , la pression partielle du CO₂ dans l'atmosphère. Le fractionnement isotopique Δ est aussi en relation simplifiée la différence entre la composition isotopique du CO₂ de l'atmosphère et la composition isotopique des produits de la photosynthèse.

Le rapport P_i/P_a dépend de l'importance relative de la diffusion (qui fait augmenter la réserve interne de CO₂) vis-à-vis de la carboxylation (qui fait diminuer la réserve interne de CO₂). Ainsi, le contenu en ¹³C des photosynthétats est un enregistrement continu de la concentration interne du CO₂ dans la feuille : une feuille riche en ¹³C a un faible P_i , une feuille pauvre en ¹³C a un fort P_i . L'augmentation de P_i peut être obtenue soit par une augmentation de la diffusion stomatique, soit par une carboxylase moins active. On conçoit dans ces deux cas que la fixation du C ne sera pas la même. Une plante à faible P_i , riche en ¹³C peut être soit une plante à faible biomasse (diffusion limitante), soit à forte biomasse (carboxylation active). Le classement des espèces et des variétés en fonction du

fractionnement isotopique de la photosynthèse va donc permettre de rendre compte des différences spécifiques ou variétales des limitations d'origine stomatique comparativement à la limitation de la carboxylase.

Les stomates contrôlent non seulement le flux entrant de CO₂ mais aussi le flux sortant de vapeur d'eau. FARQUHAR et RICHARDS (1984) ont coordonné le modèle décrivant le fractionnement isotopique et celui décrivant l'efficacité d'utilisation de l'eau, tous deux articulés autour de la variable P_i/P_a . Les plantes fixant le plus de carbone par quantité d'eau transpirée sont les plantes qui ont une concentration interne du CO₂ faible. Elles ont donc un fractionnement isotopique petit et des compositions isotopiques du C fixé riches en ¹³C. Les plantes économes en eau sont riches en ¹³C. Le blé, le haricot, la tomate ont des biomasses d'autant plus grandes que l'efficacité d'utilisation de l'eau diminue (plantes pauvres en ¹³C), l'arachide et le tournesol ont des biomasses plus fortes lorsque l'efficacité d'utilisation de l'eau augmente (plantes riches en ¹³C).

La photosynthèse C₄ est plus complexe en raison de la coopération de deux compartiments tissulaires, mésophylle et gaine et ne répond pas au même modèle isotopique. Les variations de composition isotopique du carbone restent très faibles pour ce type métabolique.

2 - LES TESTS ISOTOPIQUES EN AGRONOMIE ET EN SÉLECTION

2.1 - Le développement de ces diagnostics

Le succès actuel du test isotopique s'explique d'une part par l'héritabilité de ce critère (HANDLEY *et al.*, 1994) et d'autre part par le caractère intégratif de l'information fournie. Les étapes successives de la justification de ce test sont :

- 1) un modèle physiologique (FARQUHAR et RICHARDS, 1984), décrit succinctement plus haut ;
- 2) sa validation pour chaque niveau d'organisation de la plante (CONDON *et al.*, 1990) et son extension à la culture (CONDON *et al.*, 1987), la plante modèle étant le blé ;
- 3) la transposition du phénotype métabolique sous la forme d'autres diagnostics pertinents corrélés aux δ ; il s'agit du % C, du % de cendres ou de silice dans les feuilles (MASLE *et al.*, 1992, MAYLAND *et al.*, 1993) ;
- 4) l'établissement de l'héritabilité des critères et la caractérisation moléculaire des phénotypes triés d'après ce critère isotopique (MARTIN et THORSTENSON, 1988, MARTIN *et al.*, 1989, HUBICK *et al.*, 1988) ;
- 5) l'établissement de gammes étalonnées de ces diagnostics pour différentes espèces C₃ connues et différents lieux (HUBICK et FARQUHAR, 1989, HUBICK, 1990, VIRGONA *et al.*, 1990, WHITE *et al.*, 1990) ;
- 6) la mise en place des candidats à la sélection sur ces gammes (JOHNSON *et al.*, 1990, JOHNSON et BASSETT, 1991, READ *et al.*, 1991 et 1992, ISMAEL et HALL, 1992, HALL *et al.*, 1992 etc..).

2.2 - Un exemple, le blé

Méthodes

Le matériel végétal est prélevé en conditions de champ sur des parcelles voisines afin que le CO₂ atmosphérique ait la même composition isotopique et la même concentration. Les mesures des plantes donneront alors des valeurs qui seront directement comparables. Pour des plantes provenant de lieux différents, il est nécessaire de mesurer la composition isotopique du CO₂ des différentes localisations. Le prélèvement de plantes doit être représentatif de la parcelle. Le prélèvement d'échantillons frais doit être séché, à l'étuve ou au micro-ondes, avant le broyage. Il est souhaitable de faire des analyses distinctes par organes des plantes prélevées, car les compositions isotopiques peuvent être sensiblement différentes selon l'organe considéré. Quelques exemples seront donnés ci-après. Comme les analyses se font sur des poudres fines homogènes, le caractère d'homogénéité de structure de la matière à broyer est important, d'autant plus que les parties aliquotes de poudre pour l'analyse isotopique sont de faible importance (de l'ordre du mg).

Les mesures se font à l'aide d'un analyseur quantitatif couplé à un spectromètre de masse isotopique (CASABIANCA, 1994). En France, actuellement, on dispose d'un certain nombre de dispositifs de ce type dans des laboratoires publics ou privés. C'est un équipement semi-lourd de l'ordre de 1,5 million de Francs. Nous développons ce thème isotopique depuis un certain temps déjà (DELEENS, 1976) et maintenant, grâce à l'acquisition récente d'un tel équipement, nous avons pu développer davantage cette thématique. En raison de divers programmes obtenus en relations de travail étroites avec l'ITCF, nous avons un certain nombre de références utiles dans le domaine du blé. Nous avons aussi tenté de sensibiliser les utilisateurs de variétés à ces méthodes par leur description dans *Perspectives Agricoles* (Avril, 1994).

La composition isotopique s'exprime en δ , c'est une différence relative entre des rapports isotopiques ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), celui de l'échantillon contre celui du standard international.. Comme le standard est plus riche en ^{13}C que les échantillons de matière organique naturelle, les valeurs sont négatives et d'autant plus négatives que cette matière est pauvre en ^{13}C . Il est quasi-impossible de revenir sur le choix du standard effectué par CRAIG, le fondateur des principes de mesure en 1954 ! Pour comparer les quelques valeurs que nous allons donner en exemple, il faut retenir que l'on va considérer que 2 valeurs de δ sont distinctes si elles diffèrent de 0,3 ‰ ou, dit autrement 0,3 unité delta. Cette différence de 0,3 représente approximativement une différence de δ entre 5 et 10 ppm. C'est une petite différence mais elle peut avoir son importance si on considère que c'est une moyenne qui intègre toute la durée de vie du végétal. Les gammes de variations rencontrées pour une même espèce C3 selon la variété et les conditions extérieures sont de 6 unités delta. Nous indiquerons par comparaison pour les espèces C4 (qui ne répondent pas au même modèle) que pour 16 variétés commerciales de maïs, la variation n'excède pas 1 delta.

Cas des feuilles

Sur la figure 1, sont représentées les variations de la composition isotopique de feuilles de deux variétés de blé, Thésée et Soissons, sur 2 lieux et deux années différentes en parcelles fertilisées ou non fertilisées. L'efficacité d'utilisation de l'eau du couvert augmente au cours du temps comme le montre l'enrichissement progressif en ^{13}C au cours du temps. On observe que la fertilisation modifie la composition isotopique des feuilles spécialement sur le lieu 2 et de manière forte sur les premières feuilles de Thésée. Les variations observées pour les compositions isotopiques des feuilles soutiennent une comparaison variétale.

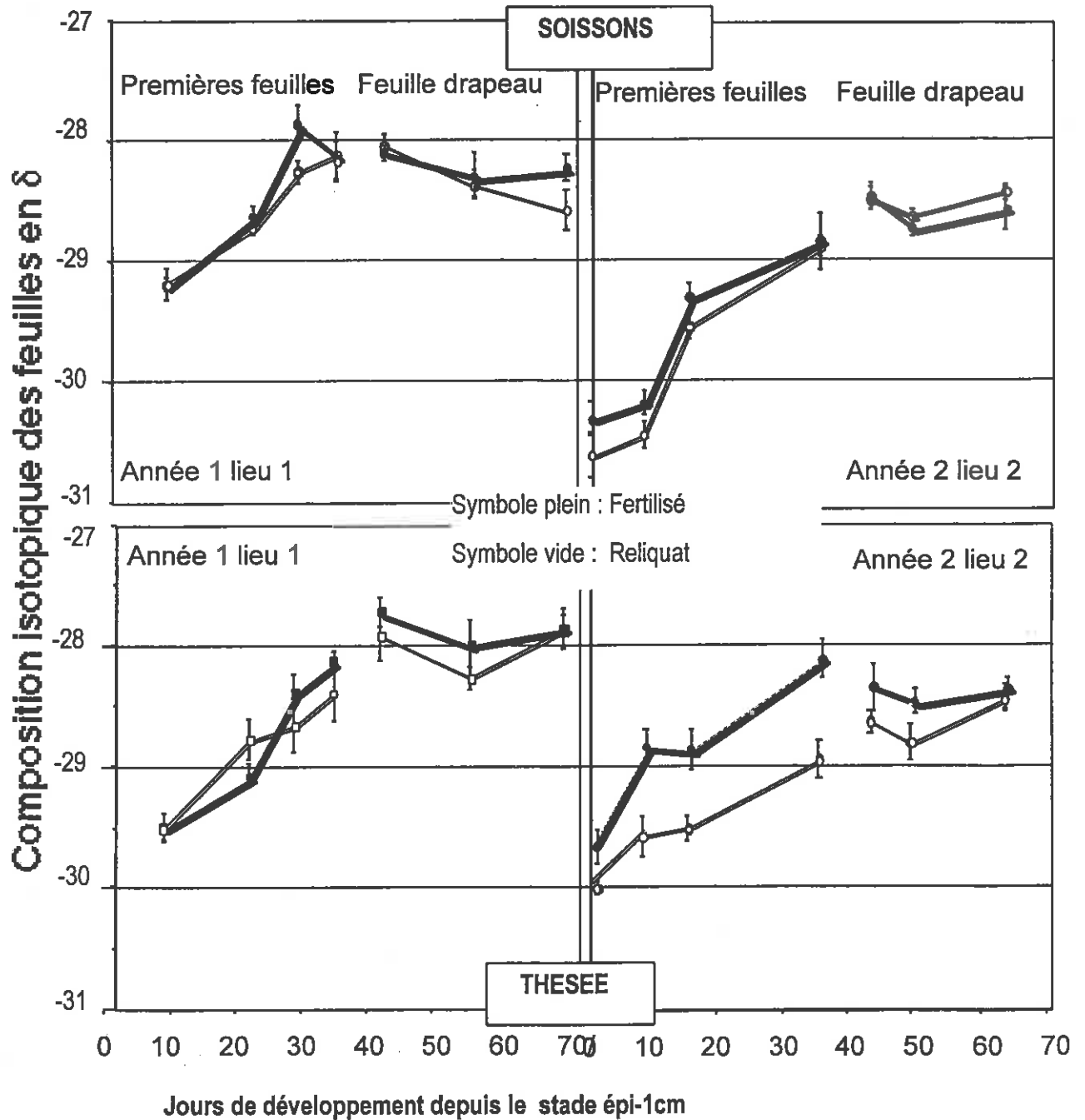


Figure 1. Compositions isotopiques du carbone des feuilles récoltées au cours du temps sur deux années en deux lieux différents. Moyenne de 3 parcelles indépendantes.

Cas des grains

La composition isotopique de grains de blé résulte d'un mélange de trois sources isotopiques naturelles, trouvant leur origine dans le fonctionnement photosynthétique propre à 3 types d'organes qui assurent le remplissage des grains, *i.e.* les limbes, la tige et les parties vertes de l'épi. Chacun de ces organes verts, selon ses capacités photosynthétiques, délivre des assimilats dont la teneur en ^{13}C traduit son efficacité d'utilisation de l'eau, intégrée sur toute la durée de son fonctionnement photosynthétique. Nous donnerons ici en exemple l'évolution des δ des parties aériennes de 4 variétés de blé à 3 périodes de son développement sous deux régimes d'irrigation dans le sol (figure 2, travail de collaboration avec l'ITCF). Un lot de plantes a été maintenu à l'ETM durant tout son développement tandis qu'un deuxième lot a été privé d'irrigation de la floraison à la maturité. Les limbes puis la tige+gaine et enfin l'épi ont des δ respectivement croissants, allant de -30 à -26 ‰.

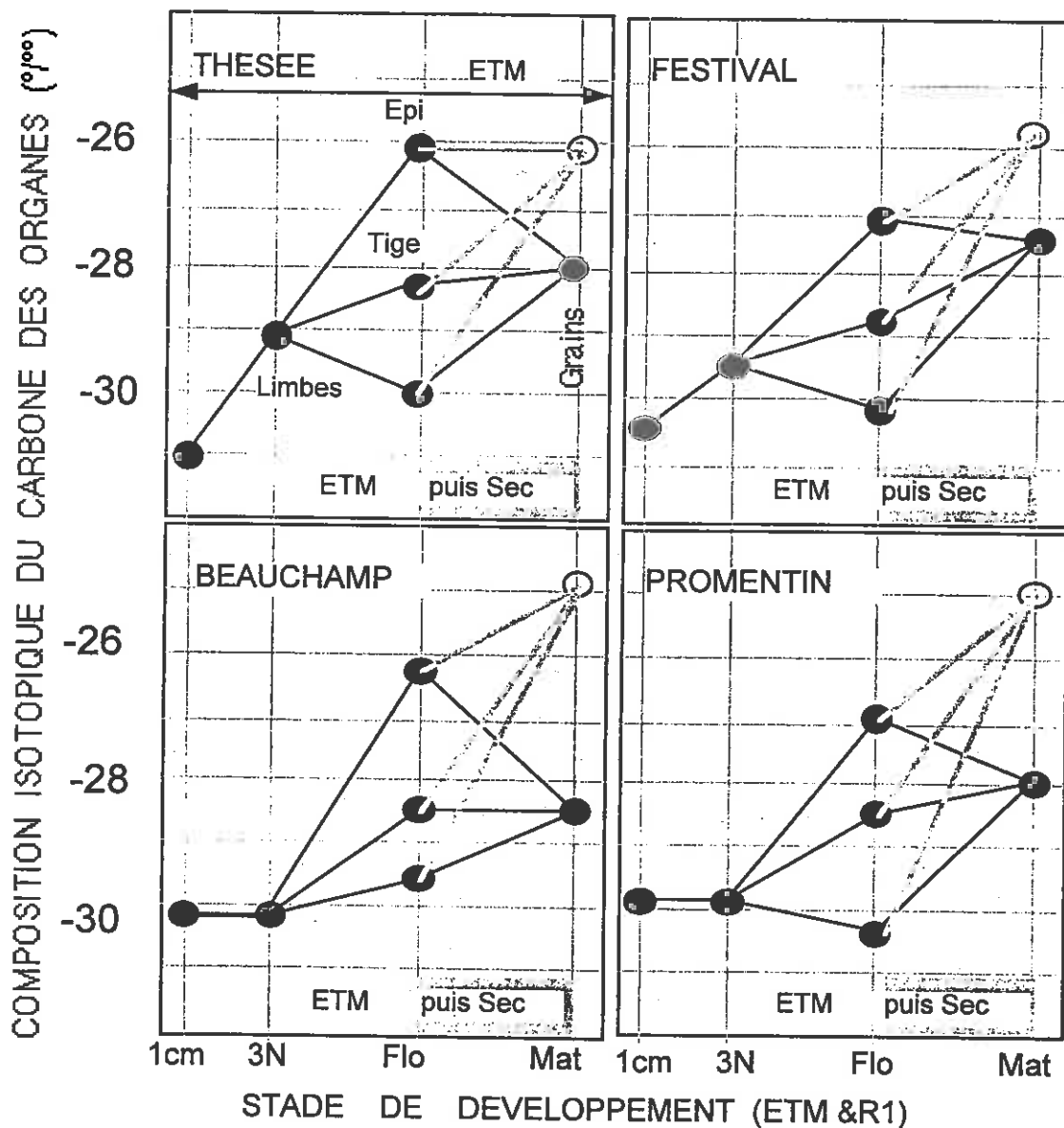


Figure 2. Compositions isotopiques des feuilles (stade épi-1cm, 3N et floraison) de la tige et de l'épi à floraison et du grain à maturité pour 4 variétés de blé sous deux régimes hydriques de la floraison à la maturité, ETM et sec.

La limitation en eau durant la période de remplissage a un effet très marqué sur la composition isotopique des grains qui dans l'ensemble vont gagner 2 unités δ . Beauchamp et Promentin sont les plus enrichis par rapport au témoin arrosé. Ces diagrammes ainsi représentés révèlent rapidement des différences de comportement variétal, tant durant la période préfloraison qu'à la maturité.

Composition isotopique des grains et consommation en eau des cultures

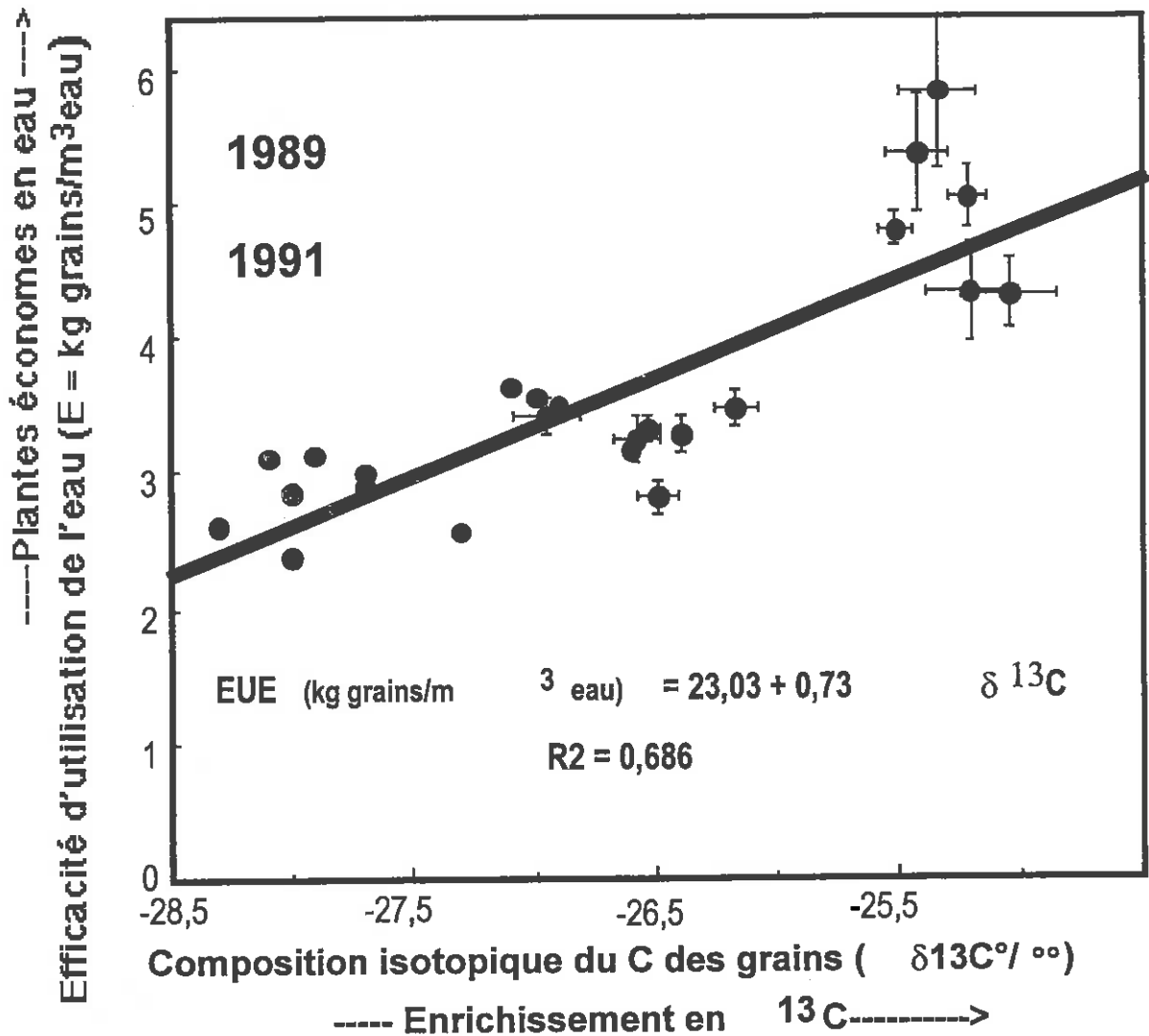


Figure 3. Relation entre la composition isotopique des grains de 6 variétés sur deux années en fonction du rapport kg de grains par m³ d'eau ayant été donnés à la culture. Lieu Le Magneraud. Moyenne de 3 parcelles.

La courbe de calibration (Figure 3) du δ des grains contre la valeur de l'efficacité d'utilisation de l'eau de la culture pendant tout son développement ($EUE = \text{kg grains/m}^3 \text{ eau}$) mesurée expérimentalement (collaboration IBP-ITCF, Le Magneraud, sous serres mobiles) est obtenue à l'aide des résultats de deux années de culture : $E=23,03+0,73 \delta^{13}C$. A partir de ce type de corrélation, on peut déduire des valeurs de rendements et des compositions isotopiques des grains, la valeur EUE et donc recalculer la quantité d'eau ayant transité par la culture de blé jusqu'à sa maturité. Cette relation doit être reproduite et élargie à d'autres variétés et lieux. Une telle relation, bien établie géographiquement, deviendrait ensuite un outil irremplaçable pour une région, les références de chaque année apportant de nouvelles

informations sur le comportement hydrique des cultures et les consommations en eau. Cette calibration est de plus généralisable à toutes les plantes cultivées à métabolisme C3. On voit donc que des courbes de calibration de l'efficacité d'utilisation de l'eau et de la composition isotopique naturelle des organes récoltables dans les zones ayant un nombre restreint de types de grandes cultures permettraient d'estimer les consommations en eau à une échelle régionale.

CONCLUSION

Pourquoi ne pas mieux développer ce que la nature met à notre disposition pour mesurer les réponses intégrées des variétés ? La répartition naturelle des isotopes stables du carbone, de l'azote et des éléments hydrogène et oxygène de l'eau seront, peut-être, les diagnostics agronomiques du troisième millénaire.

BIBLIOGRAPHIE

- CASABIANCA H., 1994. La spectrométrie de masse isotopique. Les couplages. La reproductibilité de la technique pour le carbone et pour l'azote. Dans Utilisation des isotopes stables pour l'étude du fonctionnement des plantes. Éditeurs P. MAILLARD et R. BONHOMME. *INRA Édition*. pp 11-26.
- CONDON A. G., RICHARDS R. A. et FARQUHAR G. D., 1987. Carbon Isotope Discrimination Is Positively Correlated with Grain Yield and Dry Matter Production in Field - Grown Wheat. *Crop Science*, 27, 996-1000.
- CONDON A. G., FARQUHAR G. D. et RICHARDS R. A., 1990. Genotypic Variation in Carbon Isotope Discrimination and Water Use Efficiency in Wheat. Leaf Gas Exchange and Whole Plant Studies. *Australian J. of Plant Physiol* ; 17, 9-22.
- CRAIG H., 1954. Isotopic Standards for Carbon and Oxygen, and Correction Factors for Mass Spectrometry Analysis of Carbon Dioxide. *Geochim. Cosmochim Acta*, 12, 133-149.
- DELEENS E., 1976. La discrimination du C13 et les trois types de métabolisme des plantes. *Physiol. Vég.* 14,641-656.
- DELEENS E., HANNACHI L., BOUSSER A. (CNRS, Orsay), CASABIANCA H., JAMES H., BIGOIS (CNRS, Lyon), GATE P., VIGNIER L., BOUTHIER A. (ITCF), 1994. Caractérisation variétale. Un nouvel outil : l'analyse de la composition isotopique. *Perspectives agricoles*, 190, 108-122.
- DELEENS E., BARTHES L. et PRIOUL J.-L., 1994. Modélisation du fractionnement isotopique du flux de carbone photosynthétique chez les végétaux à métabolisme C3 et C4 et les applications obtenues en chambre d'assimilation. Dans Utilisation des isotopes stables pour l'étude du fonctionnement des plantes. Éditeurs P. MAILLARD et R. BONHOMME. *INRA Édition*. pp 43-64.
- DELEENS E., HANNACHI L., GATE P., BOUTHIER A. et CASABIANCA H., 1994. Composition isotopique du carbone du blé au cours du développement : efficacité d'utilisation de l'eau de la plante et des différents organes verts participant au remplissage. Dans Utilisation des isotopes stables pour l'étude du fonctionnement des plantes. Éditeurs P. MAILLARD et R. BONHOMME. *INRA Édition*. pp 65-82.
- FARQUHAR G. D. et RICHARDS R. A., 1984. Isotopic Composition of Plant Carbon Correlates with Water Use Efficiency of Wheat Genotypes. *Australian J of Plant Physiology*, 11, 539-552.
- HANDLEY L. L., NEVO E., RAVEN J. A., MARTINEZ-CARRASO, SCRIMGEOUR, PAKNIYAT H. and FORSTER B. P. F. Chromosome 4 Controls Potential Water Use Efficiency ($\delta^{13}\text{C}$) in Barley. *Journal of Experimental Botany*, 45, 1681-1663.

- HUBICK K. T., SHORTER R. et FARQUHAR G. D., 1988. Heritability and Genotype x Environment Interactions of Carbon Isotope Discrimination in Diverse Peanut (*Arachis*) Germplasm. *Australian J. of Plant Physiol.*, 15, 799-813.
- HUBICK K. T. et FARQUHAR G. D., 1989. Carbon Isotope Discrimination and the Ratio of Carbon Gain to Water Lost in Barley Cultivars. *Plant, Cell and Environment*, 12, 795-804.
- HUBICK K. T., 1990. Effects of Nitrogen Source and Water Limitation on Growth, Transpiration Efficiency and Carbon Isotope Discrimination of Peanut Cultivars. *Aust. J. of Plant Physiol.* 17, 413-430.
- ISMAEL A. M. et HALL A. E., 1992. Correlation between Water Use Efficiency and Carbon Isotope Discrimination in Diverse Cowpea Genotypes and Isogenic Lines. *Crop science*, 32, 7-12.
- MARTIN B. et THORSTENSON Y. R., 1988. Stable Carbon Isotope Composition ($\delta^{13}\text{C}$), Water Use Efficiency and Biomass Productivity of *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon pennelli* and the F1 Hybrids. *Plant Physiology*, 88, 213-217.
- MARTIN B., NIENHUIS J., KING G. et SCHAEFFER A., 1989. Restriction Fragment Length Polymorphism Associated with Water Use Efficiency in Tomato. *Science*, 243, 1725-1728.
- MASLE J., FARQUHAR G. D. et Wong S. C. 1992. Transpiration Ratio and Plant Mineral Content Are Related among Genotypes of a Range of Species. *Australian J of Plant Physiol*, 19, 709-721.
- MAYLAND H. F., JOHNSON D. A., ASAY K. H. and READ J. J., 1993. Ash, Carbon Isotope Discrimination and Silicon as Estimators of Transpiration efficiency in Crested Wheatgrass. *Australian J. of Plant Physiol.*, 20, 361-369.
- READ J. J., JOHNSON D. A., ASAY K. H. et TIESZEN L. L. 1991. Carbon Isotope Discrimination, Gas Exchanges and Water Use Efficiency in Crested Wheatgrass Clones. *Crop Science*, 31, 1203-1208.
- READ J. J., JOHNSON D. A., ASAY K. H. et TIESZEN L. L. 1992. Carbon Isotope Discrimination : Relationship to Yield Gas Exchange and Water Use Efficiency in Field Grown Crested Wheatgrass. *Crop Science*, 32, 168-175.
- VIRGONA J. M., HUBICK K. T., RAWSON H. M., FARQUHAR G. D. et DOWNES R. W., 1990. Genotypic Variation in Transpiration Efficiency, Carbon Isotope Discrimination and Dry Matter Partitioning during Early Growth in Sunflower. *Australian J. of Plant physiol.* 17, 207-214.
- WHITE J. W., CASTILLO J. A. et EHRLINGER J. R., 1990. Associations Between Productivity, Root Growth and Carbon Isotope Discrimination in *Phaseolus vulgaris* under Water Deficit. *Australian J. of Plant Physiol.* 17, 189-198.