

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES
LABORATOIRE DE BIOLOGIE DES LIGNEUX ET DES GRANDES CULTURES

THÈSE présentée par : **Ludovic BONHOMME**

soutenue le : 27 mars 2009

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Physiologie et Biologie des Organismes - Populations - Interactions

Protéome Foliaire et Efficience d'Utilisation de l'Eau chez le Peuplier

THÈSE dirigée par :

Mr Franck BRIGNOLAS
Mr Domenico MORABITO

Professeur, Université d'Orléans, directeur de thèse
Maître de conférences, Université d'Orléans, co-encadrant

RAPPORTEURS :

Mr Reinhart CEULEMANS
Mr Michel ZIVY

Professeur, Université d'Anvers (Belgique)
Chargé de recherche, HDR, CNRS Gif-sur-Yvette

JURY :

Mr Franck BRIGNOLAS
Mr Reinhart CEULEMANS
Mr Pierre DIZENGREMEL
Mr Philippe LABEL
Mr Domenico MORABITO
Mme Chantal PICHON
Mr Christophe PLOMION
Mr Michel ZIVY

Professeur, Université d'Orléans
Professeur, Université d'Anvers (Belgique)
Professeur, Université de Nancy
Directeur de recherche, INRA Orléans
Maître de conférences, Université d'Orléans
Professeur, Université d'Orléans
Directeur de recherche, INRA Bordeaux
Chargé de recherche, HDR, CNRS Gif-sur-Yvette

Remerciements

~

Je remercie toutes les personnes qui de part leurs contributions directes ou indirectes, ont contribué à la réalisation de ce travail. Merci à la Région Centre d'avoir soutenu financièrement cette thèse.

Je voudrais remercier particulièrement deux personnes, Domenico Morabito et Franck Brignolas, car sans eux je n'aurais jamais eu la possibilité de vivre une expérience aussi enrichissante.

Domenico, si ce travail se finalise, c'est sans nul doute grâce à tes qualités scientifiques et humaines. Alors même s'il est étrange d'avoir à écrire ce qui d'habitude se suffit d'un signe complice et pudique (!), merci pour ton aide, tes conseils, ton soutien, ta disponibilité, ta générosité et la confiance que tu m'as accordé. Des retours nocturnes au labo pour vérifier le « front de migration » aux sorties mémorables au royaume des gothiques finlandais, des interrogations interminables sur le « pourquoi ça marche pas, t'as vérifié le SDS ? » aux soirées bordelaises, des week-ends studieux aux barbecues bien arrosés, merci pour tout, et le reste... Il est bien évident que quelques lignes ne suffiront pas à t'exprimer toute ma reconnaissance, mais saches qu'il existe des rencontres que l'on ne peut oublier.

Franck, ce travail est aussi le tien, sans tes précieux conseils, ces longues séances de corrections d'articles, sans ton soutien, ta disponibilité, ta confiance, cela aurait été tout autre. Merci pour toutes ces discussions enrichissantes, merci pour les souvenirs des campagnes d'échantillonnage à Bariteau (« c'est à gauche ou à droite ? ») toujours agrémentées d'un bon petit resto, et surtout un grand merci pour m'avoir fait découvrir une nouvelle passion... les statistiques ! Je ne te remercierais jamais assez pour tout l'investissement que tu as pu m'offrir même lorsque tu as traversé des moments personnels les plus douloureux. J'en suis sûr, nous aurons encore beaucoup de bons moments à partager.

Je remercie Francis Delmotte de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire dès mon master II, pour ses conseils et surtout pour son investissement personnel sans équivoque pour que j'obtienne cette bourse de thèse.

Je remercie Messieurs Reinhart Ceulemans et Michel Zivy d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et pour le temps et l'intérêt qu'ils ont dédié à l'évaluation de ce travail.

Je remercie Pierre Dizengremel, Philippe Label, Chantal Pichon et Christophe Plomion d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse. Je tiens également à remercier Philippe Label et Christophe Plomion du temps qu'ils ont consacré pour répondre à mes interrogations et pour tous les précieux conseils qu'ils m'ont offerts pour valoriser mes travaux.

J'adresse mes remerciements à Cécile Barbaroux pour son investissement lors des expériences menées à Bariteau et pour son aide sans faille pour l'exploitation des résultats. Un grand merci également à Erwin Dreyer et Marc Villar pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et tout ce qu'ils lui ont apporté. Et merci à Dominique Meese de nous avoir donné l'opportunité de travailler au sein de sa peuplèraie.

J'adresse également mes remerciements à Delphine Vincent et Stéphane Claverol. Merci Delphine pour tous ces enseignements que tu m'as offert, pour ton accueil et ta disponibilité. Merci Stéphane de m'avoir permis de passer quelques jours au sein de la plateforme de protéomique de Bordeaux et du temps que tu m'as consacré pour me permettre de mieux comprendre ce qu'est la spectrométrie de masse.

Je tiens à remercier Jean-Louis Dacheux et Valérie Labas pour les premières phases d'identification de spots et pour avoir consacré du temps à mes interrogations.

Je remercie Jean-Charles Bastien pour l'utilisation des serres de l'INRA d'Orléans.

Je tiens à adresser tous mes remerciements aux personnes qui ont partagé ma présence au Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures : Valérie Altemayer, Stéphanie Bankhead, Sabine Carpin, Françoise Chefdor, Didier Delay, Christiane Depierreux, Daniel Hagège, François Héricourt, Claude Joseph, François Lieutier, Stéphane Maury, Gilles Moreau, Jean Michel Petit, Géraldine Roux, Aurélien Sallé, Jean Claude Vala, Agnès, Coralie, Fotini, Jonathan, Marie-Véronique, Sophie, Bruno, Régis, Sylvain, Thomas et Romain. J'aimerais adresser un énorme « Mési Depi fond ché moin » tout particulier à Sab ; une chose est sûre, nos discussions et rigolades ne s'arrêteront pas avec la fin de cette thèse... Un énorme merci à Géraldine, merci pour tout ton soutien et ta générosité. Un grand merci également à Romain pour qui je garde une pensée émue. Merci à Christiane et Valérie d'avoir toujours tout mis en œuvre pour que mes enseignements se réalisent dans les meilleures conditions.

Je remercie ma famille, mes parents, ma grand-mère, Stéphane, Damien, belle moune et beau pouné, Rô, ainsi qu'Anne-Marie et Joseph pour tout le soutien qu'ils ont su m'apporter chaque jour de cette thèse.

Je dédie cette thèse à la mémoire de mon oncle Pierre, avec qui j'aurais tellement aimé partager ce moment.

Enfin, le plus grand des mercis à Laure. Si aujourd'hui j'en suis à écrire ces remerciements c'est grâce à toi. Merci pour tous ces sacrifices et pour ton extraordinaire soutien. L'aventure ne fait que commencer et je sais qu'elle sera '6' belle...

Table des matières

~

TABLE DES MATIÈRES	1
ABRÉVIATIONS	3
INTRODUCTION GÉNÉRALE	6
1. LE PEUPLIER	6
2. DEVENIR DE LA POPULICULTURE	9
3. DÉFINITIONS.....	10
3.1. Efficience d'utilisation de l'eau	10
3.2. Tolérance à la sécheresse.....	13
4. PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS.....	14
CHAPITRE I : VARIATION GÉNÉTIQUE DE L'EFFICIENCE D'UTILISATION DE L'EAU - IMPACT DU DEGRÉ DE FERTILITÉ ET D'ALIMENTATION EN EAU DES SITES CULTIVÉS.....	19
1. ÉTAT DES CONNAISSANCES CHEZ LE PEUPLIER	19
1.1. Variation génétique de l'efficience d'utilisation de l'eau	19
1.2. Relations entre efficience d'utilisation de l'eau, productivité et tolérance à la sécheresse	20
2. STRATÉGIE	22
PUBLICATION 1 : VARIATION GÉNÉTIQUE DE LA PRODUCTIVITÉ, DE CARACTÈRES FOLIAIRES ET DE LA DISCRIMINATION ISOTOPIQUE VIS-A-VIS DU CARBONE CHEZ DES HYBRIDES DE PEUPLIER CULTIVÉS SUR DES SITES CONTRASTÉS.....	24
CHAPITRE II : APPROCHE PROTÉOMIQUE DES VARIATIONS GÉNÉTIQUES DE L'EFFICIENCE D'UTILISATION DE L'EAU CHEZ <i>P. ×EURAMERICANA</i> - IMPACT D'UNE SÉCHERESSE MODÉRÉE	36
1. ÉTAT DES CONNAISSANCES	36
1.1. Effet du déficit hydrique sur les protéomes des plantes	38
1.2. État des connaissances des bases moléculaires de l'efficience d'utilisation de l'eau.....	47
2. STRATÉGIE	55
PUBLICATION 2 : VARIATION GÉNÉTIQUE ET RÉPONSE A LA SÉCHERESSE DU PROTÉOME FOLIAIRE DE DEUX GENOTYPES <i>POPULUS</i> ×<i>EURAMERICANA</i> CULTIVÉS DANS DES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES CONTRASTÉES	59
PUBLICATION 3 : ANALYSE DU PROTÉOME FOLIAIRE DE HUIT GÉNOTYPES <i>POPULUS</i> ×<i>EURAMERICANA</i> : LES VARIATIONS GÉNÉTIQUES DE LA RÉPONSE A LA SÉCHERESSE ET DE L'EFFICIENCE D'UTILISATION DE L'EAU IMPLIQUENT DES PROTÉINES LIÉES AUX PROCESSUS PHOTOSYNTHÉTIQUES.....	112

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	161
1. VARIATION GÉNÉTIQUE DE LA DISCRIMINATION ISOTOPIQUE VIS-A-VIS DU ¹³ C CHEZ LES PEUPLIERS.....	161
2. VARIATION GÉNÉTIQUE DU PROTÉOME FOLIAIRE DE GÉNOTYPES DE PEUPLIERS EURAMERICAINS ET RELATION AVEC LA DISCRIMINATION ISOTOPIQUE VIS-A-VIS DU ¹³ C	163
BIBLIOGRAPHIE	171
VALORISATION DES RÉSULTATS	196
ANNEXES	199

Abréviations

~

2-DE : électrophorèse bidimensionnelle
2-D DIGE : électrophorèse bidimensionnelle différentielle
Δ : discrimination isotopique vis-à-vis du carbone 13
A : assimilation nette du CO₂
ABA : acide abscissique
aBiom : biomasse aérienne
ADN : acide desoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
APX : ascorbate peroxidase
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ASR : ABA-, stress-, and ripening-induced protein
ATP : adenosine triphosphate
BSA : albumine de sérum bovin
CBB : Bleu de Coomassie colloïdal
CHAPS : 3-[(3-CHolamidopropyl)diméthylAmmonio]-1-Propane-Sulfonate
COMT : Catechol-O-methyl transferase
C_M : teneur en carbone des feuilles par unité de masse
DTT : Dithiothreitol
ESI : ionisation par électronébuliseur
EST : expressed sequences tags
HSC : heat-shock cognate protein
Hsp / HSP : heat-shock proteins
IEF : focalisation iso-électrique
IPG : gradient de pH immobilisé
LEA : late embryogenesis-abundant
MALDI-TOF : matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight
MDHAR : monodehydroascorbate reductase
ME : enzyme malique
M_r : masse moléculaire
NADPH : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
N_M : teneur en azote des feuilles par unité de masse
PDI : protéine disulfide-isomerase
pH : potentiel Hydrogène
pI : point iso-électrique

PQL : Protein Quantity Loci
PR : Pathogen Response
QTL : Quantitative Trait Loci
qPCR : PCR quantitative en temps réel
RFLP : Restriction fragment length polymorphism
ROS : espèces activées de l'oxygène
RuBisCO : Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
RuBP : Ribulose-1,5-bisphosphate
SLA : surface massique
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
SOD : superoxyde dismutase
SDS : sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TC : tentative consensus
TCA : trichloro-acetic acid
Wi : efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau
WUE : efficacité d'utilisation de l'eau
WUE_{inst} : efficacité d'utilisation de l'eau instantanée

Introduction Générale

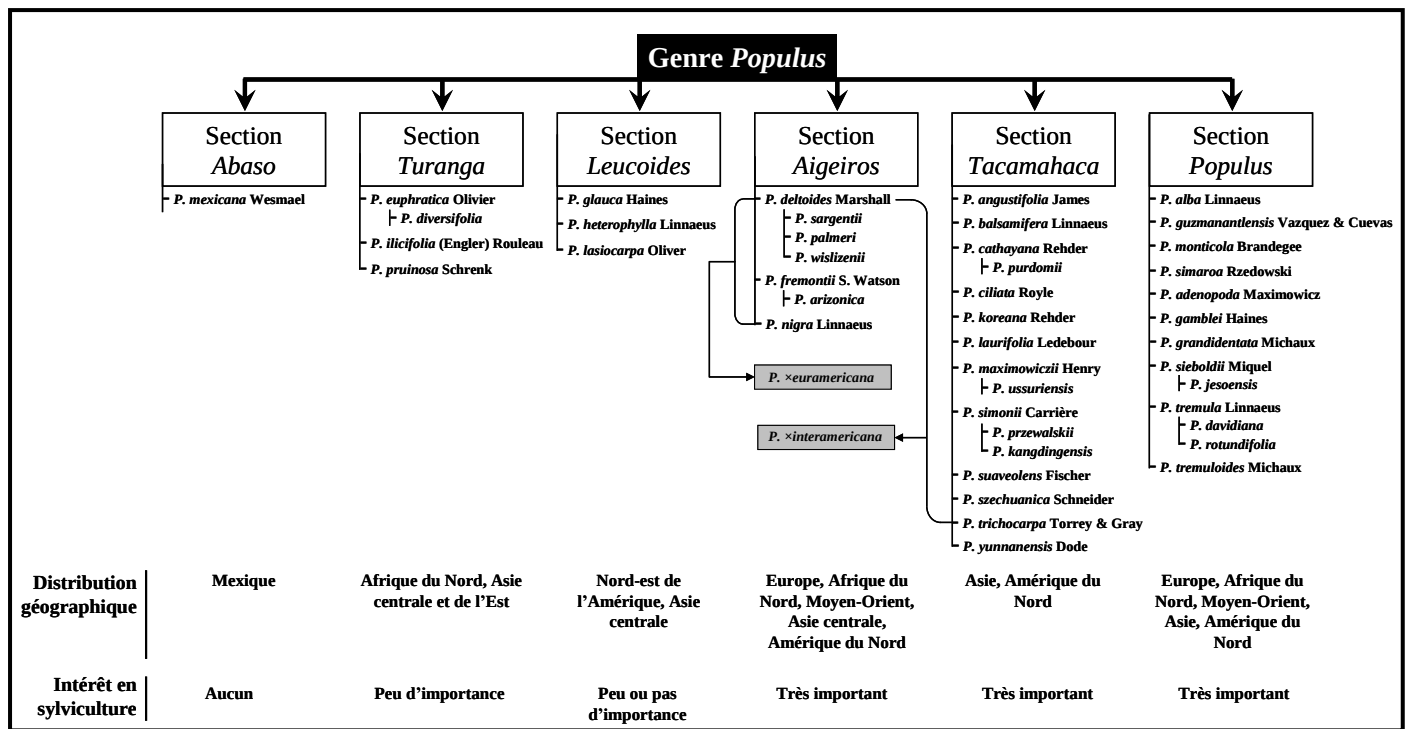


Figure I.2. Fossile de feuille de *Populus wilmattae* datée de -58 millions d'années. D'après Dickmann et Kuzovkina, 2008.

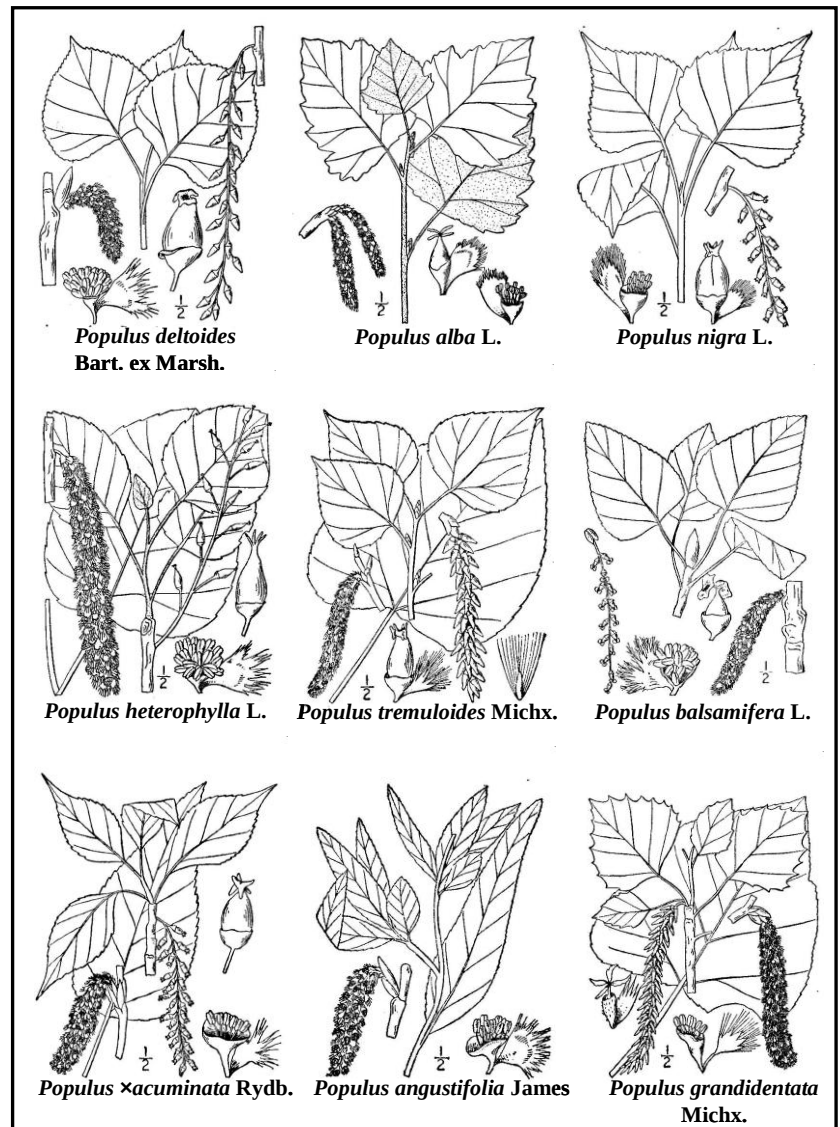


Figure I.3. Variabilité morphologique au sein du genre *Populus*. D'après Britton et Brown, 1913.

Introduction générale

1. Le peuplier

De la famille des Salicacées comme le genre éponyme *Salix*, le genre *Populus* est subdivisé en 6 sections botaniques (Figure I.1). Bien que les opinions divergent largement vis-à-vis de la distinction de certains taxa, les taxonomistes ont déterminé une trentaine d'espèces (Dickmann et Kuzovkina, 2008). Le plus ancien témoignage de l'existence du peuplier est une feuille fossilisée datée de la fin du Paléocène (-58 millions d'années environ ; Collinson, 1992) (Figure I.2). Cette feuille proviendrait d'un taxon de la section *Abaso* : *Populus wilmattae* Cockerell, également décrit comme *P. cinnamomoides* (Lesquereux) MacGinitie (Eckenwalder, 1980). Les observations deviennent plus fréquentes dès la fin de l'Éocène dans les zones nord américaines et européennes (Manchester et al., 1986 ; Collinson, 1992). Ainsi, les sections *Leucoides*, *Tacamahaca*, *Aigeiros* et *Populus* seraient apparues respectivement à la fin de l'Éocène, à la fin de l'Oligocène, au Miocène, et au Pliocène (Collinson, 1992 ; Dickmann et Kuzovkina, 2008).

Les représentants du genre sont des espèces diploïdes ($2n = 38$), toutefois la triploïdie ($2n = 57$) ainsi que la tétraploïdie ($2n = 76$) ont également été observées dans la section *Populus* (Einspahr et al., 1963 ; Every et Wiens, 1971 ; Johnsson, 1942). La séquence complète du génome est désormais disponible chez *Populus trichocarpa* (Tuskan et al., 2006), faisant du peuplier le premier arbre et la troisième espèce végétale après *Arabidopsis thaliana* et *Oryza sativa* dont le génome a été séquencé. La taille du génome du peuplier est d'environ 485 millions de paires de base soit près de quatre fois plus que le génome d'*A. thaliana* mais respectivement, 6 et 40 fois moins que celui de *Zea mays* et de *Pinus taeda*.

Les peupliers sont des arbres à feuilles caduques (certaines espèces sont exceptionnellement semi-sempervirentes), alternes, simples et à longs pétioles. Toutefois, une importante variabilité morphologique caractérise les membres du genre. Aucun phyllotype n'est défini (Figure I.3), les feuilles peuvent être linéaires, rondes, rhombiques, deltoïdes, lancéolées, oblongues, obovées, cordées ou réniformes alors que

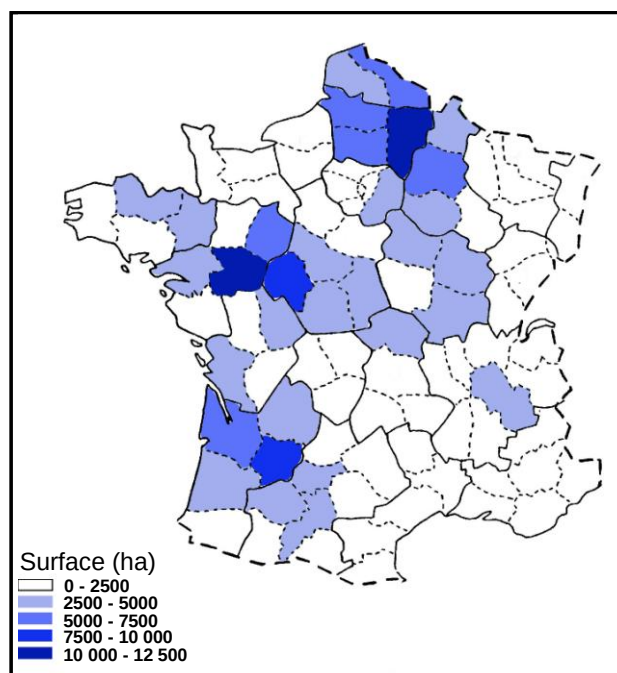


Figure I.4. Surface des peupleraies françaises par département. Données IFN / AFOCEL (2002 ; www.fcba.fr).

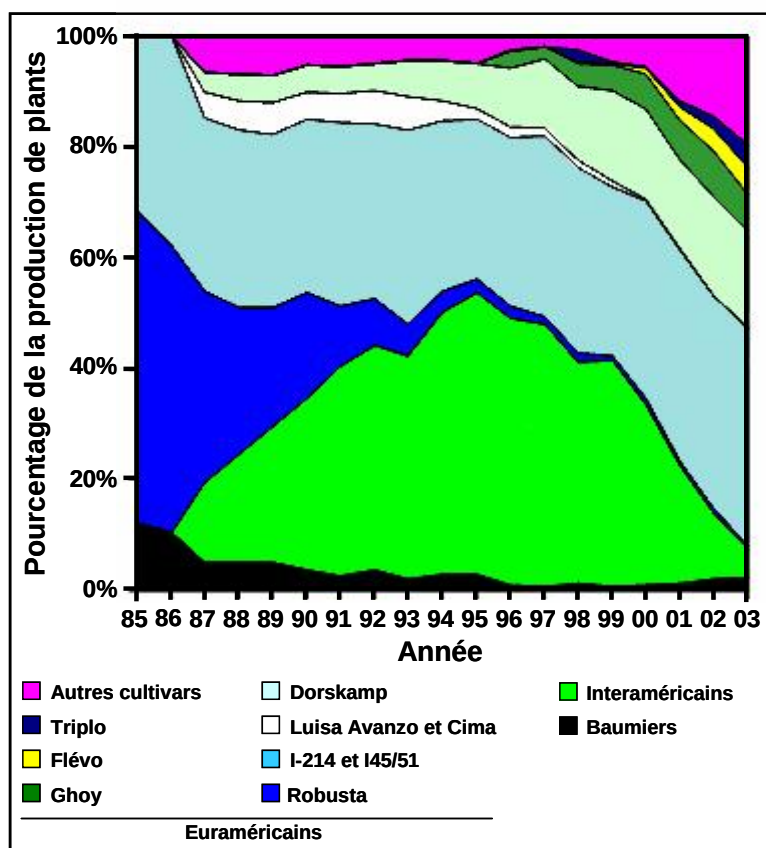


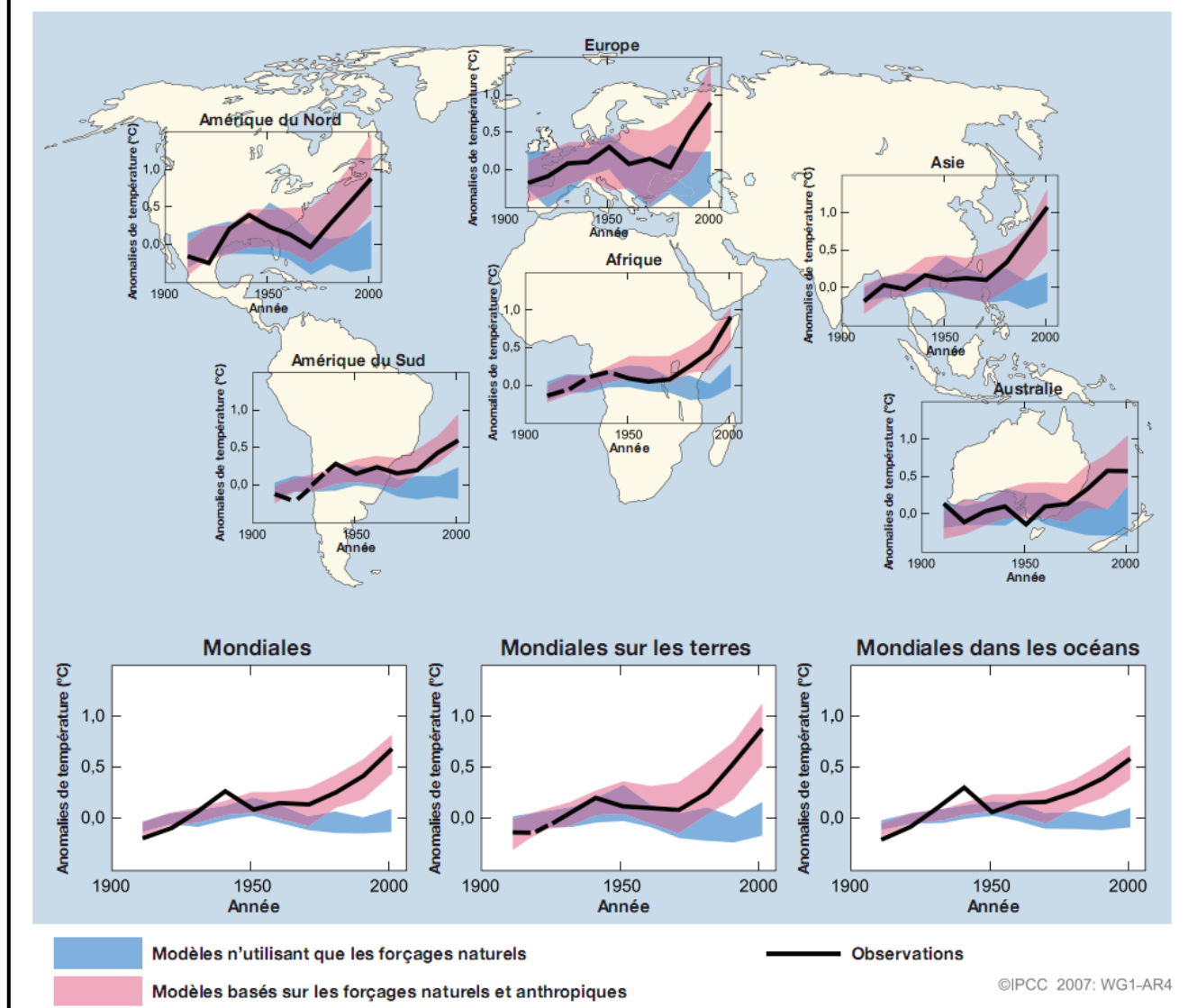
Figure I.5. Évolution de l'importance relative des variétés de peuplier commercialisées en France entre 1985 et 2003. D'après Berthelot et Chantre, 2004.

la section du pétiole peut être ronde ou aplatie, le tronc linéaire, vrillé ou de forme arbustive.

L'aire naturelle de répartition des espèces du genre *Populus* est très vaste. Dans l'hémisphère nord, elle s'étend du cercle équatorial jusqu'aux limites septentrionales de croissance des arbres. Dans l'hémisphère sud, leur distribution est sporadique et localisée principalement dans les zones de plantations d'Amérique du sud, d'Afrique du sud et de Nouvelle-Zélande. En France, les seules espèces spontanées sont *P. nigra*, *P. tremula* et *P. alba*. Les hybridations spontanées sont communes entre espèces sympatriques d'une même section botanique et également entre espèces des sections *Aigeros* et *Tacamahaca* (Eckenwalder, 1996 ; Dickmann et Kuzovkina, 2008). Les croisements interspécifiques entre les sections *Abaso*, *Turanga*, *Leucoides* et *Populus* sont rares ou inexistants (Stettler *et al.*, 1980 ; Zsuffa, 1973) et certaines hybridations sont unidirectionnelles. Ainsi, l'hybridation entre *P. nigra* et *P. deltoides* n'est possible que dans le sens *P. deltoides* femelle et *P. nigra* mâle. Ces hybrides spontanés ont largement contribué au développement de la populiculture depuis le XVIII^{ème} siècle.

Le peuplier est présent sur près de 80 millions d'hectares dans le monde dont 25 millions sont cultivés (FAO, 2008). La populiculture est essentiellement localisée dans l'hémisphère nord. En France, les peupleraies cultivées représentaient environ 236 000 hectares en 2007 (FAO, 2008), soit moins de 2 % des surfaces boisées du territoire (35 % pour le chêne et 8 % pour le hêtre). Toutefois, sa vitesse de croissance particulièrement élevée assure une production annuelle de près de 1,5 millions de m³ de bois d'œuvre, faisant du peuplier la deuxième essence feuillue en terme de volume de bois récolté, après le chêne. Près de 80 % de cette production est destinée au déroulage et au sciage pour la confection d'emballages dits légers (contreplaqués, panneaux de particules, allumettes) ou lourds (palettes, caisses, menuiserie). Les principaux massifs populicoles se situent dans des zones de vallées (Figure I.4) ; les milieux alluviaux répondent en effet à l'exigence en eau élevée du peuplier. Il existe par ailleurs, des milieux hors vallées convenant également à cette essence, l'alimentation en eau y est alors assurée par des précipitations élevées et une réserve utile en eau du sol suffisante. Près de 80 % de la surface populicole française se concentre sur 3 zones géographiques : (i) la Picardie et le Bassin Parisien (environ 35 %), (ii) la région Centre et la basse vallée de la Loire (environ 20 %) et (iii) la région Poitou-Charentes et le bassin Aquitain (environ 25 %). Les cultivars utilisés en populiculture proviennent pour l'essentiel des

ÉVOLUTION DES TEMPÉRATURES AUX ÉCHELLES MONDIALE ET CONTINENTALE



espèces *P. deltoides*, *P. trichocarpa* et *P. nigra*. Il s'agit principalement d'hybrides interspécifiques (*P. ×euramericana* issus du croisement *P. deltoides* × *P. nigra*, et de *P. ×interamericana* issus des croisements *P. deltoides* × *P. trichocarpa* ou *P. trichocarpa* × *P. deltoides*) ; les espèces pures, bien que moins fréquentes, sont également exploitées (i.e., *P. deltoides* et *P. trichocarpa*). Les hybrides interaméricains associaient initialement une remarquable vigueur hybride à une résistance qualitative aux différents pathotypes de rouille foliaire. De ce fait, de 1987 à 1997, d'importantes surfaces ont été plantées avec ces cultivars. Néanmoins, depuis le contournement de sa résistance par de nouvelles virulences de rouille en 1997, son utilisation a brutalement chuté au profit des cultivars euraméricains (Breton, 2000 ; Paillassa, 2001 ; Balzinger et Ginisty, 2002) (Figure I.5). La rotation de production nécessitant environ 20 ans d'exploitation, la part relative des différents cultivars au sein des peupleraies françaises en 2020, sera donc très différente de celle d'aujourd'hui. Ainsi, les cultivars euraméricains constitueront près de 95 % de la surface cultivée totale alors que les cultivars interaméricains, qui ne sont quasiment plus plantés depuis 2000, ne constitueront plus que 4 % des plantations (Thivolle-Cazat, 2003).

2. Devenir de la populiculture

En 1998, l'organisation mondiale de météorologie (WMO) s'est associée au programme des Nations Unies pour l'environnement afin de constituer une structure intergouvernementale d'étude des changements climatiques : *Intergovernmental Panel on Climate Change* (IPCC : <http://www.ipcc.ch/>). Depuis 10 ans, leurs enregistrements confirment une évolution rapide et globale du climat (Figure I.6). Comme le prouvent les observations des accroissements des températures moyennes mondiales de l'air et des océans, la modification du système climatique est sans équivoque, et d'importantes modifications sont attendues à l'échelle mondiale et régionale. En France, les modèles de prévisions climatiques prévoient une augmentation de température de l'ordre de 2-3 °C à 3-4 °C (Figure I.7), avec une augmentation nettement plus marquée pour la saison la plus chaude. Cette élévation des températures risque d'augmenter le nombre de canicules d'ici 2100 (Météo France : <http://climat.meteofrance.com/>). Alors que le nombre de jours de canicule est actuellement de 3 à 10 par an, il pourrait atteindre une moyenne de 20 à 40 en 2100. En outre, les précipitations seraient plus importantes en

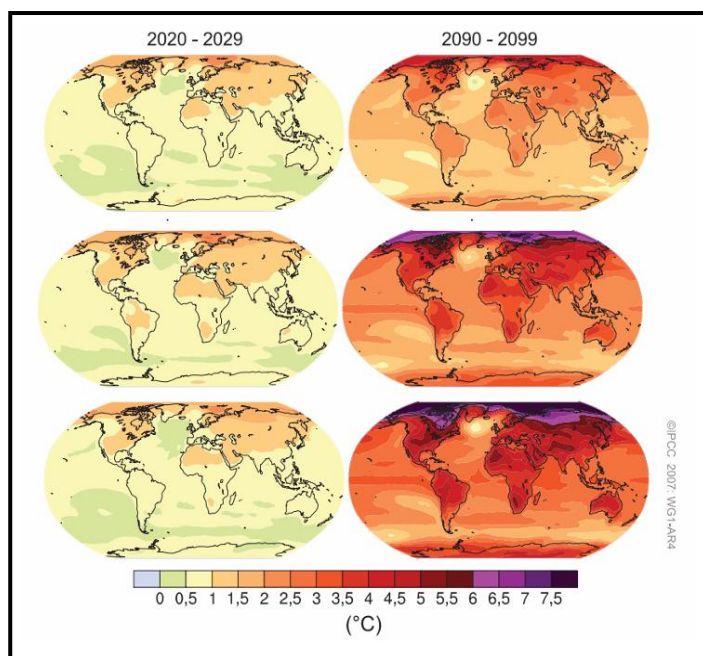


Figure I.7. Modifications des températures de surface simulées pour le début et la fin du XXI^e siècle par rapport à la période 1980–1999. Les planches représentent les moyennes des simulations faites à l’aide de modèles de circulation générale océan-atmosphère couplés pour les scénarios B1 (au-dessus), A1B (au centre) et A2 (en bas), moyennés sur les décennies 2020–2029 (gauche) et 2090–2099 (droite). D’après IPCC, 2007 (<http://www.ipcc.ch>).

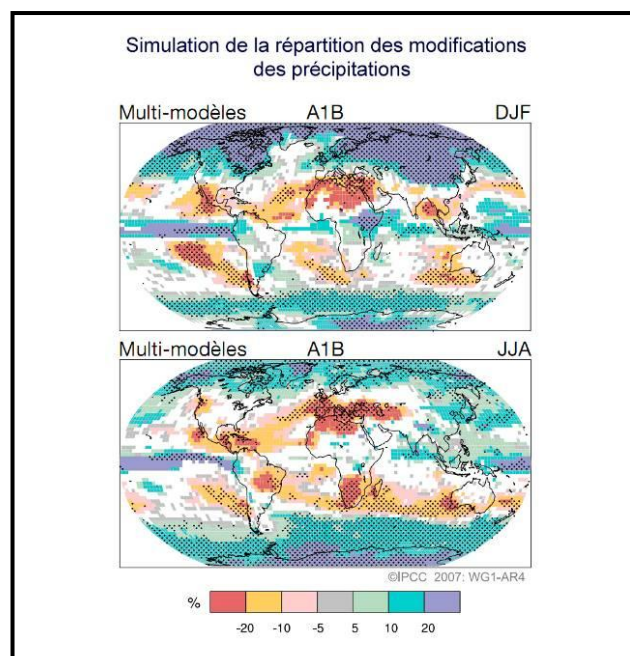


Figure I.8. Changements relatifs des précipitations (en pourcentages) pour la période 2090-2099 par rapport à 1980–1999. Les valeurs sont issues de moyennes sur de nombreux modèles basés sur le scénario A1B pour les mois de décembre à février (en haut) et de juin à août (en bas). Les aires blanches représentent les zones où moins de 66% des modèles concordent sur le signe du changement, les zones hachurées correspondent aux cas où plus de 90% des modèles concordent sur le signe du changement. D’après IPCC, 2007 (<http://www.ipcc.ch>).

Scénario A1B : croissance économique très rapide, maximum de population mondiale au milieu du siècle pour décliner ensuite, nouvelles technologies, convergence entre régions, renforcement des capacités et des interactions culturelles et sociales, équilibre entre les énergies fossiles et autres que fossiles.

Scénario A2 : monde très hétérogène, autosuffisance et préservation des identités locales, accroissement continu de la population mondiale, orientation régionale du développement économique, croissance économique par habitant et évolution technologique fragmentées et lentes.

Scénario B1 : monde convergent avec la même population mondiale culminant au milieu du siècle et déclinant ensuite, changements rapides dans les structures économiques, économie de services et d’information, réductions dans l’intensité des matériaux et introduction de technologies propres et utilisant les ressources de manière efficiente.

hiver, mais moindres en été (Figure I.8). Ainsi, les régions connaissant des durées de plus de 25 jours consécutifs sans pluie, actuellement limitées au sud-est de la France, s'étendraient à la moitié ouest du territoire. Les experts annoncent donc une banalisation d'évènements climatiques comparables aux épisodes de sécheresses et de canicules survenus au cours des étés 2003 et 2005.

Au cours de ces évènements climatiques de 2003 et 2005, les peupleraies installées hors des vallées et sur sols à nappe superficielle ont montré logiquement les symptômes délétères les plus forts (dépérissement, chutes précoces de feuilles, dessèchements), cependant dans 25 % des cas ces problèmes ont également été signalés sur des peuplements situés en vallée (Belrose *et al.*, 2004). Bien que peu de mortalités directes n'aient été observées, un fort ralentissement de la croissance et un affaiblissement général des arbres a été signalé. On peut donc s'interroger sur le devenir de la populiculture si de tels évènements climatiques tendent à se banaliser dans les années à venir. D'après les projections, ces modifications climatiques pourraient conduire à une chute substantielle du rendement de la production sylvicole et avoir un impact particulièrement marqué sur les espèces à courtes rotations telles que les peupliers (Loustau *et al.*, 2005). Jusqu'à présent, les principaux critères de sélection des cultivars commercialisés en Europe se focalisaient sur leur niveau de productivité et leur niveau de tolérance aux agents pathogènes (Berthelot et Chantre, 2004). Ainsi, savoir si les gains génétiques espérés des hybrides actuellement commercialisés seront réellement réalisés dans le contexte de changement climatique, est une question centrale sur laquelle il convient dès maintenant de se pencher. Compte tenu de l'intérêt économique du peuplier et de la demande effective en bois au sein de l'union européenne, il apparaît essentiel de prendre en compte l'adaptabilité des variétés futures à la modification de l'environnement.

Une stratégie qui permettrait de limiter la chute de production populicole, occasionnée par les changements climatiques attendus, pourrait être d'apporter aux sélectionneurs des ressources génétiques capables de produire du bois à moindre coût en eau. Afin de répondre à une telle attente, il apparaît nécessaire de disposer de génotypes dont le rapport entre biomasse produite et eau consommée est favorable, *i.e.* des génotypes efficaces pour l'utilisation de l'eau. Par ailleurs, il est indéniable que la demande en bois de peuplier ne cesse de croître au niveau de l'Europe ; la France étant le premier exportateur, nous devons d'ores et déjà réfléchir à une façon raisonnable

d'augmenter la production et donc d'étendre les plantations. Dans un souci de préservation de la biodiversité des ripisylves (*e.g.* introgression de gènes ou propagations de pathogènes au sein des populations de peupliers noirs sauvages) (Benetka *et al.*, 1999 ; Pinon et Frey, 1997), cette extension nécessite de multiplier des zones de plantations dites hors vallées, là où la disponibilité en eau est essentiellement conditionnée par les apports pluviométriques. Afin de soutenir cette extension et d'assurer le maintien des plantations déjà existantes dans ces milieux où la disponibilité en eau peut devenir ponctuellement un facteur limitant, la populiculture de demain nécessite la sélection de génotypes capables de limiter l'impact de contraintes édaphiques ponctuelles et modérées sur leur niveau de productivité, *i.e.* des génotypes tolérants les sécheresses modérées. Les besoins populicoles nécessitent donc aujourd'hui, d'associer aux critères de sélection actuels, des traits tels que l'efficacité d'utilisation de l'eau et la tolérance aux variations de disponibilité en eau du sol.

3. Définitions

3.1. Efficience d'utilisation de l'eau

L'efficacité d'utilisation de l'eau (WUE) est un trait complexe qui peut être défini à différentes échelles spatiales et temporelles. A l'échelle de la plante entière, elle est définie comme le rapport entre la biomasse produite et l'eau consommée pendant le même laps de temps. Cette mesure est intégrée dans le temps et peut être ainsi considérée à l'échelle de la vie de la plante. Néanmoins, ce rapport est difficilement quantifiable lorsque le modèle d'étude est un arbre ; les difficultés de mesure des flux d'eau transpirés par les parties aériennes et des pertes foliaires annuelles s'ajoutent aux limites d'évaluation de la biomasse des parties souterraines. Au niveau de la feuille, WUE peut être estimée directement et de façon instantanée (WUE_{inst}), par le ratio entre l'assimilation nette de CO_2 et la transpiration. WUE_{inst} est sous le contrôle de deux composantes. La première est environnementale et représente le déficit de pression de saturation de la vapeur d'eau au niveau de la surface foliaire. La seconde composante est biologique, et correspond au rapport entre l'assimilation nette de CO_2 et la conductance stomatique à la vapeur d'eau ; ce ratio se définit comme l'efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau (W_i). W_i peut également être estimée indirectement à partir de mesures de la discrimination isotopique vis-à-vis du ^{13}C (Δ) de la matière organique. En

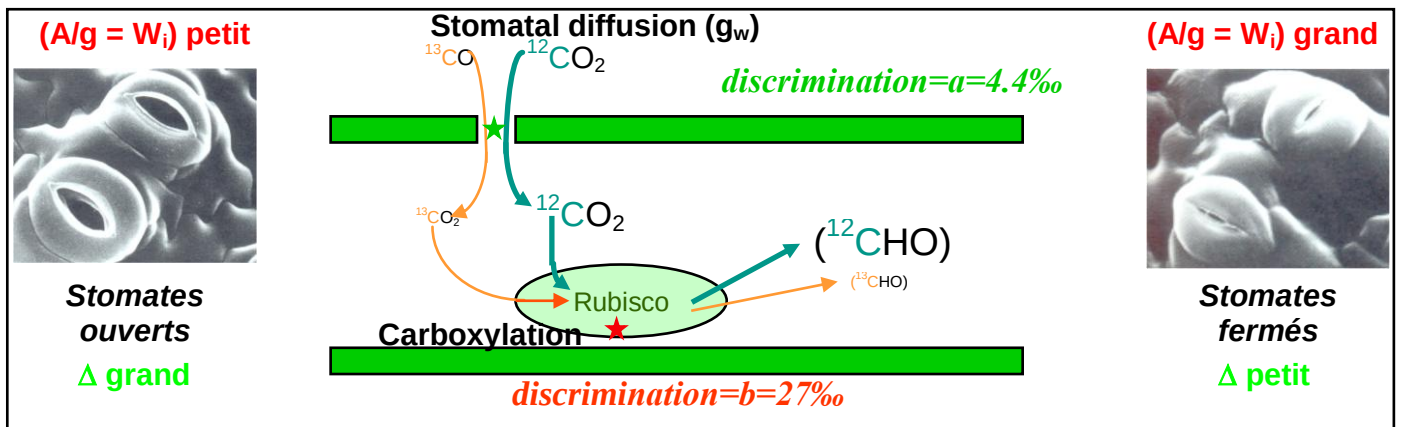


Figure I.9. Représentation schématique des étapes de discrimination de l'isotope ^{13}C . Lorsque l'ouverture des stomates est importante, la plante fixe préférentiellement l'isotope ^{12}C , ce qui se traduira par une augmentation de Δ . Lorsque l'ouverture des stomates diminue, la plante fixera les deux isotopes, ce qui se traduit par une baisse de Δ .

effet, à l'état naturel l'élément carbone présente deux isotopes stables, le ^{12}C et le ^{13}C . L'abondance du ^{12}C est largement supérieure à l'isotope ^{13}C , ainsi dans l'atmosphère le rapport $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ est de l'ordre de 1,1 %. La composition isotopique en ^{13}C ($\delta^{13}\text{C}$) s'exprime par rapport à un standard (Craig, 1957) : le ratio $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de la Pee Dee Belemnite (1,1237 %):

$$\delta^{13}\text{C} = ((R_{\text{éch}} / R_{\text{std}}) - 1) \times 1000 ;$$

où $R_{\text{éch}}$ et R_{std} correspondent aux rapports isotopiques de l'échantillon et du standard, respectivement.

Les mesures réalisées dans les végétaux témoignent d'un appauvrissement en ^{13}C de leur matière organique par rapport à l'atmosphère. Cette discrimination se mesure ainsi (Farquhar et Richards, 1984):

$$\Delta (\text{‰}) = ((\delta_{\text{atmosphère}} - \delta_{\text{plante}}) / (1000 + \delta_{\text{plante}})) \times 1000.$$

Chez les plantes de type C3, telles que l'essentiel des espèces ligneuses, deux étapes participent à cette discrimination. La première est réalisée lors de la diffusion stomatique du CO_2 et la seconde est exercée lors de la carboxylation du ribulose-1,5-bisphosphate par la RuBisCO (Figure I.9). Cette discrimination a été modélisée ainsi :

$$\Delta (\text{‰}) = a + (b - a) \times (C_i / C_a), \text{ (Farquhar et al., 1982);}$$

où a et b représentent respectivement, les coefficients de discrimination isotopique du ^{13}C exercés lors de la diffusion stomatique (4,4 ‰ ; O'Leary, 1981) et lors de la carboxylation (27 ‰ ; Farquhar et Richards, 1984). C_i / C_a représente le rapport entre la fraction molaire en CO_2 dans les espaces intercellulaires de la feuille et la fraction molaire en CO_2 de l'atmosphère.

Compte tenu que l'assimilation nette de CO_2 réalisée par la plante (A) est sous le contrôle de la conductance stomatique pour le CO_2 (g_{sc}) et des fractions molaires en CO_2 de l'air (C_a) et des espaces intercellulaires de la plante (C_i) :

$$A = g_{\text{sc}} \times (C_a - C_i).$$

Ainsi, considérant que la conductance stomatique à la vapeur d'eau (g_s) est 1,6 fois plus importante que celle du CO_2 (g_{sc}), une relation linéaire théorique entre W_i et Δ a été proposée (Farquhar et al., 1982) :

$$W_i \text{ (i.e. } A / g_s) = (C_a / 1,6) \times ((b - \Delta) / (b - a)).$$

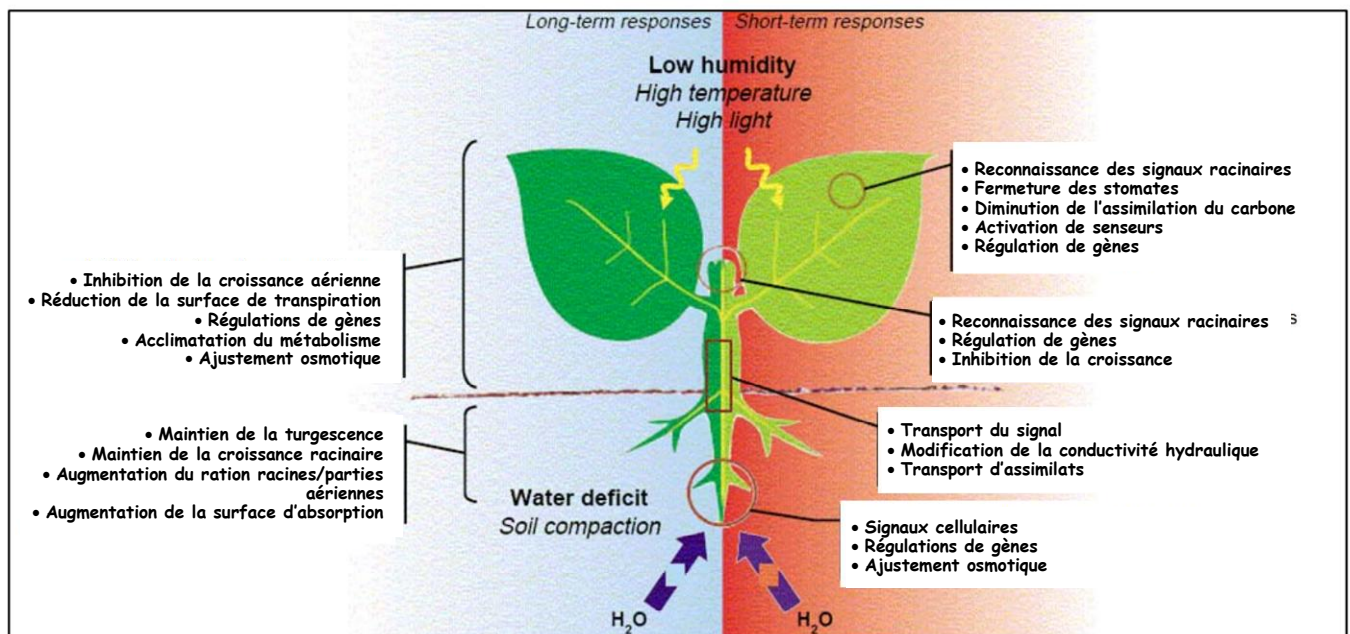


Figure I.10. Réponses des végétaux à la sécheresse. A gauche, réponses à long terme ou acclimatation ; A droite, réponses à court terme. D'après Chaves *et al.* (2003).

Par la suite, des mesures intégrées à une échelle de temps plus importante, chez de nombreuses espèces herbacées et ligneuses, ont confirmé une relation linéaire et négative entre Δ et WUE (Farquhar et Richards, 1984 ; Farquhar *et al.*, 1989 ; Hall *et al.*, 1994 ; Guehl *et al.*, 1995 ; Ponton *et al.*, 2002). Les valeurs de Δ reflètent donc la balance qui s'exerce entre la maximisation des gains associés à l'assimilation de CO₂ et la minimisation des flux d'eau transpirés (Ehleringer, 1993).

3.2. Tolérance à la sécheresse

Le terme *sécheresse* présente de nombreuses définitions. Dans son acception générale, la sécheresse se réfère à un déficit de pluviométrie. Cette caractérisation météorologique de la sécheresse est essentiellement liée à la durée des périodes sans pluie *i.e.*, le nombre de jours consécutifs sans pluie. Toutefois, si l'installation d'une sécheresse est conditionnée par le déficit pluviométrique, elle dépend également des capacités de stockage en eau du sol et de la demande évaporatoire de l'air. L'intensité de la sécheresse à un moment donné peut donc être caractérisée physiquement par l'état hydrique du sol et celui de l'atmosphère (Jones, 1992). Lorsque le déficit de pluviométrie est systématique sur une région donnée, cette région devient une zone aride. Dans ce contexte, la tolérance à la sécheresse des plantes repose sur des stratégies de survie souvent au dépend de leur productivité (cycle court, modification de la taille des organes, métabolisme photosynthétique privilégiant la limitation des pertes en eau). Dans les régions tempérées, la sécheresse peut être considérée comme un phénomène climatique aléatoire qui se caractérise davantage par une déviation par rapport à une valeur moyenne de pluviométrie (Jones, 1992). Ainsi lorsque l'on s'intéresse aux cultures de nos régions, une sécheresse se définit par toute diminution de la disponibilité en eau qui ne permet pas aux plantes cultivées d'exprimer le rendement qui serait attendu en situation favorable, ou qui peut affecter la qualité des produits récoltés (Voltas *et al.*, 2005 ; Tardieu *et al.*, 2007). Dans ce cas précis, la tolérance à la sécheresse se définit comme la capacité d'une plante ou d'un génotype à limiter sa chute de productivité en réponse à une sécheresse ponctuelle (Passioura, 2002). La tolérance repose donc sur des stratégies de régulation permettant d'atteindre une production aussi élevée que possible dans un scénario donné de sécheresse. Les mécanismes impliqués dans la réponse des plantes à la sécheresse peuvent être classés selon qu'ils entrent en jeu à court, moyen ou long terme pendant la sécheresse (Figure I.10). Les effets les plus précoces sont une réduction de l'élongation cellulaire et une chute de la conductance

stomatique occasionnée par la fermeture des stomates (Lawlor et Cornic, 2002 ; Tardieu *et al.*, 2007). La signalétique du contrôle stomatique fait intervenir des messages chimiques qui transitent entre les racines et les feuilles *via* le xylème. Il s'agit en particulier du pH de la sève (Wilkinson et Davies, 1997) et de la concentration en acide abscissique synthétisée par les organes en dessèchement (Tardieu et Davies 1993 ; Hartung *et al.*, 2002). Si la fermeture des stomates n'est pas totale, en raison de la différence entre les coefficients de diffusion de l'eau et du CO₂ dans la feuille, la transpiration est plus réduite que l'assimilation nette : l'efficacité d'utilisation de l'eau est alors augmentée. Le fonctionnement stomatique est également étroitement lié à la conductivité hydraulique des tissus de la plante. Les aquaporines peuvent moduler le trajet de l'eau au travers des membranes des cellules (Martre *et al.*, 2002 ; Tyerman *et al.*, 2002 ; Luu et Maurel, 2005). Si le contrôle de l'ouverture des aquaporines n'est pas encore parfaitement connu, il est évident que le déficit hydrique, l'augmentation des concentrations en acide abscissique ou la nutrition azotée affectent la conductivité hydraulique des racines (Carvajal *et al.*, 1996 ; Zhu *et al.*, 2005). A moyen terme, un ajustement osmotique se réalise pour assurer un maintien de la turgescence de la plante. Cet ajustement est effectué *via* l'accumulation de solutés compatibles avec la vie de la cellule, ou osmoprotectants tels que la proline, la glycine bêtaïne, les polyols (mannitol, sorbitol, D-ononitol), le trehalose, le glucose, le fructose, le saccharose ou les fructanes (Kishor *et al.*, 1995 ; Hayashi *et al.*, 1997 ; Shen *et al.*, 1997 ; Zhang *et al.*, 1999 ; Garg *et al.*, 2002 ; Abebe *et al.*, 2003). A long terme, la plante ajuste sa transpiration *via* une réduction des surfaces foliaires (Roden *et al.*, 1990 ; Zhang *et al.*, 1999 ; Reymond *et al.*, 2003) ; la vitesse de division cellulaire décroît (Granier *et al.*, 2000), les parois cellulaires qui doivent se déformer pour permettre la croissance cellulaire, deviennent plus rigides (Cosgrove, 2005) et la turgescence diminue (Bouchabke *et al.*, 2006). Une modification de l'allocation du carbone aux différents organes de la plante intervient également : les racines sont favorisées aux dépens des feuilles et de la tige (Wesgate et Boyer, 1985 ; Saab *et al.*, 1990 ; Tuberosa *et al.*, 2002).

4. Problématique et objectifs

L'équipe d'Écophysiologie et Biologie Moléculaire des Ligneux – USC2030 INRA 'Arbres et Réponses aux Contraintes Hydrique et Environnementales' (ARCHE) du laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures UPRES EA1207 de l'Université d'Orléans s'intéresse aux mécanismes physiologiques et moléculaires impliqués dans l'efficacité d'utilisation de l'eau et dans la tolérance aux contraintes environnementales chez les plantes ligneuses. Ces travaux se réalisent en étroite collaboration avec les centres INRA d'Orléans (Unité d'Amélioration Génétique et Physiologie Forestière), de Nancy (équipe de bioclimatologie et écophysiologie de l'UMR-1137 'Écologie et Écophysiologie Forestière'), de Bordeaux (équipe de génétique de l'UMR-1202 'Biodiversité, Gènes et Communautés'), de Clermont-Ferrand (équipe HYDRO de l'UMR_A 547 'Physique et Physiologie Intégratives de l'Arbre Fruitier et Forestier') et avec le groupe 'Plant and Vegetation Ecology' de l'Université d'Anvers (University of Antwerp, Belgique).

La problématique de l'équipe est de développer une approche intégrée de la physiologie du peuplier face à des variations de disponibilité en eau du sol. Cette problématique est abordée au travers de deux disciplines principales, l'écophysiologie et la biologie moléculaire, et s'étend à tous les niveaux d'études, des populations aux molécules. Au niveau **écophysiologique**, nous nous intéressons aux compartiments cultivés (hybrides *P. ×euramericana* et *P. ×interamericana*) et sauvages (*P. nigra*). Chez les peupliers cultivés, l'objectif vise à juger des liens entre productivité, efficacité d'utilisation de l'eau, tolérance à la sécheresse et propriétés structurales et fonctionnelles du bois. Chez les peupliers sauvages, l'objectif consiste à déterminer les facteurs écophysiologiques qui pourraient influencer la régénération de *P. nigra* en milieu naturel. Au niveau moléculaire, les travaux se déclinent selon 3 axes : épigénétique, protéomique et 'signalisation'. L'axe **épigénétique** s'intéresse au contrôle épigénétique de la plasticité de l'appareil végétatif en réponse à des variations de disponibilité en eau du sol. L'axe **protéomique** vise à rechercher des marqueurs protéiques liés à l'efficacité d'utilisation de l'eau et à la tolérance à différentes contraintes abiotiques. Enfin, le dernier axe constitue l'axe **'signalisation'** qui vise à caractériser la voie de signalisation induite par une contrainte hydrique.

L'ensemble des travaux, développés depuis 1998 au sein de cette équipe, a pour but de juger de la possibilité de sélectionner des hybrides plus performants et mieux adaptés à leur environnement à partir de nouveaux critères tels que l'efficacité d'utilisation de l'eau et la tolérance à la sécheresse.

L'étude des variations génétiques de l'efficacité de l'utilisation de l'eau chez le peuplier a été abordée en serre et en pépinière dans le cadre des thèses de Nicolas Marron (2000-2003) et de Romain Monclus (2002-2005). Les travaux de N. Marron ont mis en évidence de fortes variations génétiques de l'efficacité d'utilisation de l'eau chez 31 géotypes de peuplier *P. ×euramericana* âgés de trois mois et cultivés en serre en conditions hydriques non limitantes. Par ailleurs, aucun lien n'a été détecté entre la productivité et l'efficacité d'utilisation de l'eau. Dans la continuité de ce travail, les travaux de thèse de R. Monclus ont visé, tout d'abord, à juger des variations génétiques de la productivité et de l'efficacité d'utilisation de l'eau au sein d'hybrides *P. ×euramericana* enracinés depuis quatre ans et recépés annuellement, en pépinière. Ensuite, ses objectifs ont consisté à juger des liens entre productivité, efficacité d'utilisation de l'eau et tolérance à la sécheresse. Ses travaux ont confirmé l'existence de fortes variations génétiques de l'efficacité d'utilisation de l'eau chez des plants cultivés en pépinière. À l'instar des études menées en serre, aucune relation n'a pu être établie entre la productivité et l'efficacité d'utilisation de l'eau.

Afin de valider la pertinence du développement d'un programme de sélection sur l'efficacité d'utilisation de l'eau chez le peuplier, il convenait donc maintenant de déterminer si les variations génétiques, observées en serre et en pépinière, étaient encore décelables lorsque les arbres étaient plus âgés. La populiculture s'étendant hors des zones alluviales, il convenait également d'évaluer l'influence de la nature du sol sur ces variations génétiques. Au delà de cette validation, il était également nécessaire de s'interroger sur la possibilité de distinguer des marqueurs moléculaires qui pourraient permettre de discriminer des géotypes contrastés pour leur efficacité d'utilisation de l'eau. Ainsi, le développement de l'axe protéomique associé à ces traits pourrait permettre d'une part, de distinguer des marqueurs protéiques utiles pour distinguer des géotypes tolérants et/ou efficaces pour l'utilisation de l'eau et d'autre part, contribuer à la compréhension des mécanismes moléculaires et physiologiques sous-jacents.

Ce travail de thèse s'inscrit à l'interface entre l'**axe écophysiological et protéomique** ; il repose par conséquent, sur deux objectifs majeurs :

1. **Au niveau écophysiological**, l'objectif de cette recherche consiste à (i) évaluer la variation génétique de l'efficacité d'utilisation de l'eau chez des arbres cultivés en milieu populeux et (ii) juger de l'influence du type de sol (en termes de pédologie et d'alimentation en eau) sur le classement de géotypes de peupliers pour leur efficacité d'utilisation de l'eau.
2. **Au niveau protéomique**, l'objectif consiste à juger du degré de variation génétique des profils protéiques foliaires de géotypes de peupliers euraméricains contrastés pour leur efficacité d'utilisation de l'eau et cultivés dans des conditions d'alimentation en eau variées.

Cette thèse est structurée en deux parties principales correspondant aux aspects écophysiological (chapitre 1) et protéomiques (chapitre 2) de l'efficacité d'utilisation de l'eau. Dans chaque chapitre, nous exposerons un état des connaissances actuelles, puis nous présenterons la stratégie que nous avons adoptée pour apporter des éléments de réponse aux objectifs définis et enfin, nous terminons avec les résultats produits et leurs interprétations. Ce travail est complété par une conclusion générale où nous exposerons également les perspectives de ce travail.

CHAPITRE I

Variation génétique de l'efficiencia d'utilisation de l'eau

- Impact du degré de fertilité et d'alimentation en eau des sites cultivés -



Peupleraie commerciale du Moulin de Bariteau (Poitou-Charentes). Photo L. Bonhomme.

CHAPITRE I

Variation génétique de l'efficacité d'utilisation de l'eau

- Impact du degré de fertilité et d'alimentation en eau des sites cultivés -

1. Etat des connaissances chez le peuplier

1.1. Variation génétique de l'efficacité d'utilisation de l'eau

Les variations génétiques de l'efficacité d'utilisation de l'eau chez le peuplier ont principalement été abordées au niveau foliaire par des mesures d'échange de gaz (W_i) et/ou par l'outil isotopique Δ . Au même titre que de nombreuses espèces ligneuses (e.g., *Castanea sativa*, [Lauteri et al., 1997](#) ; *Eucalyptus globulus*, [Pita et al., 2001](#) ; *Faidherbia albida*, [Roupsard et al., 1998](#) ; *Pinus pinaster*, [Brendel et al., 2002](#), [Nguyen-Queyrens et al., 1998](#) ; *Pseudotsuga menziesii*, [Zhang et al., 1993](#) ; *Quercus robur* et *Q. petraea*, [Ponton et al., 2001](#)), les peupliers présentent d'importantes variations génétiques pour Δ et W_i ([Rae et al., 2004](#) ; [Zhang et al., 2004](#) ; [Marron et al., 2005](#) ; [Monclus et al., 2005 et 2006](#) ; [Voltas et al., 2006](#) ; [Dillen et al., 2008](#)). Chez près de 30 hybrides *P. ×euramericana*, l'étendue de variation des moyennes génotypiques était de l'ordre de 3 ‰ ([Marron et al., 2005](#) ; [Monclus et al., 2005 et 2006](#)), une variabilité importante compte tenu que l'étendue de variation pour l'ensemble des plantes de type C_3 est de l'ordre de 15 ‰ ([Dawson et al., 2002](#)). De nombreuses études ont décrit Δ comme un caractère très héritable chez les hybrides *P. ×interamericana* ([Rae et al., 2004](#)), *P. ×euramericana* ([Marron et al., 2005](#) ; [Monclus et al., 2005](#)) et chez *P. davidiana* (Dode) Schneider de la section *Populus* ([Zhang et al., 2004](#)), suggérant un fort contrôle génétique de l'efficacité d'utilisation de l'eau.

1.2. Relations entre efficacité d'utilisation de l'eau, productivité et tolérance à la sécheresse

Les relations entre efficacité d'utilisation de l'eau, estimée indirectement par Δ , et niveau de productivité diffèrent largement entre espèces. En effet, le sens de la corrélation varie selon que l'efficacité d'utilisation de l'eau est principalement contrôlée par les capacités photosynthétiques ou par la conductance stomatique (Farquhar *et al.*, 1989). Si les variations de Δ sont essentiellement influencées par des modulations des capacités photosynthétiques, alors la productivité sera corrélée négativement à Δ et positivement à l'efficacité d'utilisation de l'eau. En revanche, si les variations de Δ résultent de modulations de la conductance stomatique, alors la productivité ne sera ni corrélée à Δ ni à l'efficacité d'utilisation de l'eau (Farquhar *et al.*, 1989). Au sein du genre *Populus*, les relations entre productivité et efficacité d'utilisation de l'eau diffèrent. Une corrélation positive entre Δ et productivité a été observée parmi une population de *P. davidiana* (Dode) Schneider (Zhang *et al.*, 2004), alors qu'aucun lien n'a pu être mis en évidence chez des hybrides *P. ×interamericana* ou *P. ×euramericana* (Rae *et al.*, 2004 ; Marron *et al.*, 2005 ; Monclus *et al.*, 2005 et 2006 ; Dillen *et al.*, 2008).

Bien que les peupliers soient parmi les espèces ligneuses les plus sensibles à la sécheresse (Dreyer *et al.*, 2004 ; Marron *et al.*, 2008), ils présentent néanmoins d'importantes variations génétiques d'une part dans les mécanismes mis en œuvre dans la réponse aux variations de disponibilité en eau du sol et d'autre part, dans leur niveau de tolérance à des sécheresses modérées. En réponse à des sécheresses modérées, les peupliers diffèrent par leur niveau de productivité (Monclus *et al.*, 2006), par leur vulnérabilité à la cavitation (*i.e.*, rupture des colonnes d'eau dans la plante ; Hukin *et al.*, 2005) et par de nombreux traits physiologiques et morphologiques, tels que la régulation du degré d'ouverture des stomates (Liu et Dickman, 1992 ; Blake *et al.*, 1996 ; Marron *et al.*, 2002), l'ajustement osmotique (Gebre *et al.*, 1994 ; Marron *et al.*, 2002), la régulation de la croissance et de l'abscission des feuilles ainsi que le contrôle du rapport racine / tige (Liu et Dickmann, 1992 ; Chen *et al.*, 1997 ; Ibrahim *et al.*, 1997 ; Tschaplinski *et al.*, 1998 ; Marron *et al.*, 2003 ; Monclus *et al.*, 2006). Chez 29 hybrides *P. ×euramericana*, aucun lien n'a été démontré entre tolérance à la sécheresse et productivité (Monclus *et al.*, 2006). Néanmoins, la plupart des génotypes très productifs présentait de forte sensibilité à la sécheresse alors que toute la gamme de

tolérance était observée au sein des génotypes moins productifs. Chez 33 génotypes F1 *P. ×interamericana*, une corrélation négative a été mise en évidence entre tolérance à la sécheresse et productivité, ce qui suggère qu'au sein de cette formule hybride, la plupart des génotypes très productifs sont aussi très sensibles à la sécheresse (Monclus, 2006). Ces résultats soulignent l'antagonisme entre productivité en conditions hydriques non limitantes et tolérance à la sécheresse décrit lors d'études antérieures (Brignolas *et al.*, 2000 ; Marron *et al.*, 2002 et 2003)

Indépendamment des stratégies de tolérance, certains auteurs suggèrent que le maintien d'une efficacité d'utilisation de l'eau élevée lors de baisse de disponibilité en eau du sol pourrait contribuer aux mécanismes de tolérance à la sécheresse (McKay *et al.*, 2001 ; Dawson *et al.*, 2002 ; Jones, 2004). Selon cette hypothèse, une forte efficacité d'utilisation de l'eau pourrait alors offrir un avantage considérable dans l'amélioration de la productivité végétale des zones prédisposées à des sécheresses ponctuelles (Braatne *et al.*, 1992 ; Araus *et al.*, 2002 ; Condon *et al.*, 2002 ; Rebetzke *et al.*, 2002, Cao *et al.*, 2007). Cependant, les liens entre efficacité d'utilisation de l'eau et tolérance à la sécheresse chez le peuplier sont encore peu clairs et peu d'études ont tenté de les clarifier. Chez les hybrides *P. ×euramericana*, aucune relation directe n'a été rapportée (Monclus *et al.*, 2006). Toutefois, les auteurs de cette étude ont relevé que parmi les génotypes de peuplier pour lesquels la discrimination isotopique du ^{13}C tendait à augmenter en réponse à la sécheresse, aucun n'étaient des génotypes tolérants. Cette observation suggère que la capacité d'un génotype à augmenter son efficacité d'utilisation de l'eau est nécessaire pour disposer d'un niveau élevé de tolérance à la sécheresse. Cependant, la gamme entière de niveaux de tolérance à la sécheresse était observée parmi les génotypes pour lesquels Δ diminuait ou tendait à diminuer. Ce constat suggère qu'une efficacité d'utilisation de l'eau élevée est un critère nécessaire, mais non suffisant, pour expliquer les variations génétiques de la tolérance à la sécheresse parmi ces hybrides *P. ×euramericana*. Si la capacité d'un génotype (i) à diminuer sa conductance stomatique à la vapeur d'eau et (ii) à maintenir son taux d'assimilation nette de CO_2 , suggère une tolérance à la sécheresse accrue, celle-ci n'est certainement pas régie uniquement par l'efficacité d'utilisation de l'eau mais implique probablement beaucoup d'autres traits qui contribuent à la tolérance d'un génotype particulier (Liu et Dickmann 1992 ; Gebre *et al.*, 1994 ; Chen *et al.*, 1997 ; Ibrahim *et al.*, 1997 ; Tschaplinski *et al.*, 1998 ; Marron *et al.*, 2002, 2003 et 2008).

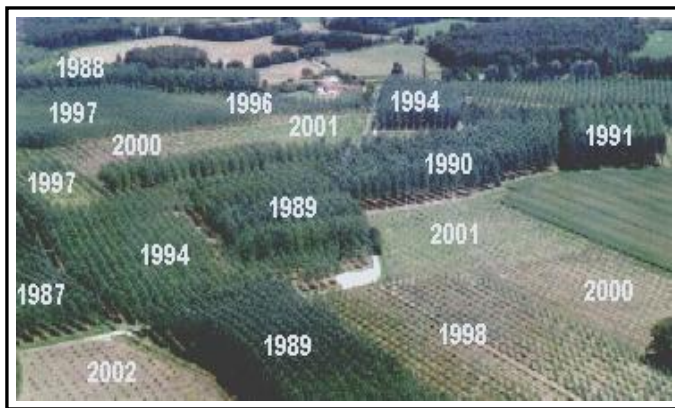


Figure Eco.1. Vue aérienne de la zone populicole du Moulin de Bariteau (Indre et Loire), propriété de D. Meese ; 200 ha, 34 000 individus de 4 à 20 ans, 250 géotypes ; les années indiquées représentent les dates de plantation des parcelles. Photo D. Meese.



Figure Eco.2. Vue satellitaire (www.geoportail.fr) de la zone populicole du Moulin de Bariteau (Indre et Loire) indiquant les sites alluviaux (en bleu) localisés sur les rives du ruisseau 'le Chavenay' et les sites non alluviaux (en rouge) localisés sur les coteaux adjacents.

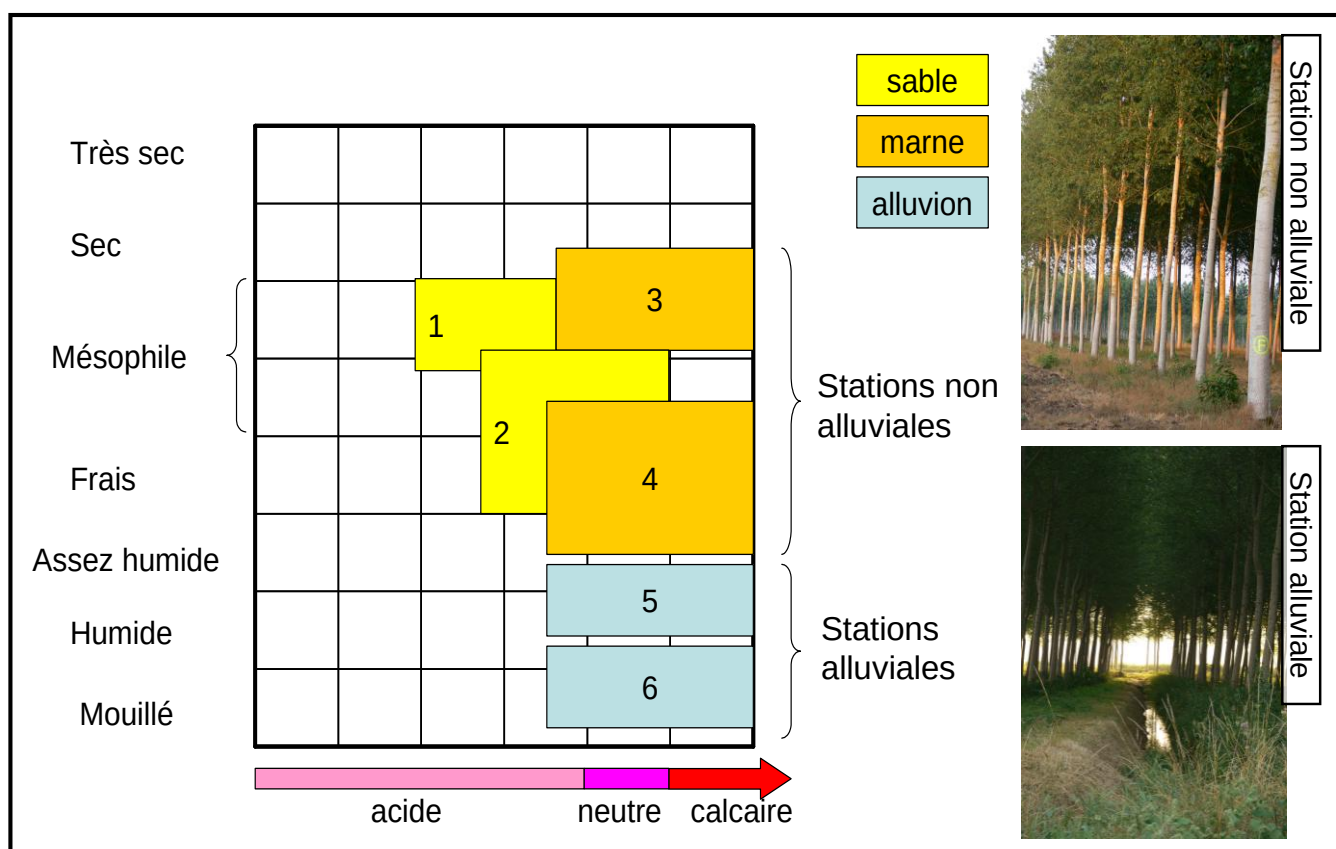


Figure Eco.3. Caractérisation des sols des différents sites (1 à 6) cultivés au Moulin de Bariteau (Indre et Loire). Photos L. Bonhomme.

2. Stratégie

L'absence de lien évident entre efficacité d'utilisation de l'eau, productivité et tolérance à la sécheresse, du moins chez les hybrides *P. ×euramericana*, suggère la possibilité de sélectionner des génotypes associant productivité élevée, forte efficacité d'utilisation de l'eau et tolérance à la sécheresse satisfaisante. Toutefois, la majorité des études ont été réalisées à partir de jeunes boutures cultivées dans des conditions peu représentatives des milieux populicoles. S'il demeure peu adapté d'apprécier le niveau de tolérance à la sécheresse de génotypes cultivés en peupleraies commerciales, il apparaît néanmoins nécessaire (i) de valider l'existence de variations génétiques de l'efficacité d'utilisation de l'eau chez des arbres plus âgés cultivés en milieu populicole et (ii) d'évaluer l'influence du type de sols cultivés sur le classement des génotypes pour leur efficacité d'utilisation de l'eau.

Dans cette optique, les expérimentations ont été menées à la peupleraie commerciale du Moulin de Bariteau (Beuxes, Vienne). Monsieur Dominique Meese, populteur privé du Moulin de Bariteau, nous a fourni des sites expérimentaux rassemblant des génotypes d'âge comparable, cultivés sur des sols contrastés. Cette peupleraie s'étend sur plus de 200 ha entre la Région Centre et la Région Poitou-Charentes (Figure Eco.1 et Figure Eco.2); elle comprend plus de 34 000 individus de 4 à 20 ans appartenant à 250 génotypes. La diversité des sols cultivés nous a permis de distinguer 2 types de sites (Figure Eco.3). L'un appelé site alluvial, localisé exclusivement sur les rives du ruisseau « Le Chavenay » traversant la plantation et le second appelé site non alluvial, comprenant les plantations installées sur les coteaux adjacents à ce cours d'eau.

En juillet 2005, nous avons sélectionné 14 génotypes de peuplier âgés de 5 à 14 ans parmi lesquels neuf étaient communs aux sites alluviaux et non alluviaux. Au total, 357 arbres ont été étudiés. L'efficacité d'utilisation de l'eau a été estimée indirectement par l'analyse de la discrimination isotopique (Δ) vis-à-vis du ^{13}C de la sève élaborée et de la matière organique des feuilles d'ombre de chaque arbre. En juillet 2006, nous avons réitéré les mesures uniquement dans le site alluvial qui constitue le site le plus propice à la populture.

Publication I

**Variation génétique de la productivité, de caractères foliaires
et de la discrimination isotopique vis-à-vis du carbone chez
des hybrides de peuplier cultivés sur des sites contrastés**

Variation génétique de la productivité, de caractères foliaires et de la discrimination isotopique vis-à-vis du carbone chez des hybrides de peuplier cultivés sur des sites contrastés

Auteurs

Ludovic Bonhomme, Cécile Barbaroux, Romain Monclus, Domenico Morabito, Alain Berthelot, Marc Villar, Erwin Dreyer et Franck Brignolas.

Annals of forest Science 65 (2008) 503.

Résumé

Productivité, caractères foliaires et discrimination isotopique vis-à-vis du carbone de la matière organique des feuilles (Δ_1) et de la sève élaborée (Δ_s) ont été étudiés à partir d'hybrides *Populus deltoides* $\times$ *P. nigra* et *Populus trichocarpa* $\times$ *P. deltoides* âgés de plus de cinq ans, cultivés en peupleraie sur des sites alluviaux et non alluviaux.

Des différences génotypiques ont été observées pour toutes les variables. Le classement des génotypes était conservé entre deux années, alors qu'il variait entre sites une année donnée. Δ_1 était corrélé positivement avec Δ_s et aucun lien n'a été détecté entre Δ_1 ou Δ_s et productivité. Une interaction significative entre génotype et site a été observée pour toutes les variables. Les arbres du site non alluvial se caractérisaient par une plus faible productivité et des feuilles plus épaisses et/ou denses avec des teneurs en azote et en carbone plus faibles. De façon intéressante, le classement des génotypes pour Δ_1 était maintenu entre les expériences réalisées sur site alluvial et celles précédemment menées en serre.

Toutes expériences confondues, il semble possible de sélectionner des génotypes productifs et efficaces pour l'utilisation de l'eau afin d'étendre les plantations à des terrains enclins à des sécheresses modérées.

Genetic variation in productivity, leaf traits and carbon isotope discrimination in hybrid poplars cultivated on contrasting sites

Ludovic BONHOMME^{1,2}, Cécile BARBAROUX^{1,2}, Romain MONCLUS^{1,3†}, Domenico MORABITO^{1,2},
 Alain BERTHELOT⁴, Marc VILLAR⁵, Erwin DREYER³, Franck BRIGNOLAS^{1,2*}

¹ Université d'Orléans, UFR-Faculté des Sciences, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207, rue de Chartres, BP 6759, 45067 Orléans Cedex 02, France

² INRA, USC2030 'Arbres et Réponses aux Contraintes Hydrique et Environnementales' (ARCHE), 45067 Orléans, France

³ INRA, Nancy Université, UMR1137 INRA-UHP 'Écologie et Écophysiologie Forestières', IFR 110 'Génomique, Écophysiologie et Écologie Fonctionnelle', INRA Nancy, 54280 Champenoux, France

⁴ FCBA, station Nord-Est, 60 route de Bonnencontre, 21170 Charrey-sur-Saône, France

⁵ INRA, UR 'Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières', BP 20619, Ardon, 45166 Olivet Cedex, France

(Received 15 November 2007; accepted 3 March 2008)

Abstract –

• We examined the relationships between productivity, leaf traits and carbon isotope discrimination in bulk leaf matter (Δ_l) and in phloem sap (Δ_s) from more than 5-year-old trees belonging to *Populus deltoides* × *P. nigra* and *Populus trichocarpa* × *P. deltoides*; trees were grown in alluvial and non alluvial sites in a commercial poplar plantation.
 • On both sites, a large genetic variability was evidenced for all variables. The genotypic ranking remained stable between years for all variables, while it differed between sites. Δ_l scaled positively with Δ_s and neither Δ_l nor Δ_s were correlated with productivity. A significant genotype by site interaction was evident for all variables. The non alluvial site resulted in lower productivity, and in thicker/denser leaves with lower nitrogen and carbon contents. Noteworthy, the genotypic ranking for Δ_l measured at the alluvial site was similar to that previously established in a glasshouse.
 • As observed in previous studies from younger trees, there is a potential to select genotypes, combining high productivity and high water-use efficiency, for growth in moderately drought-prone areas.

hybrid poplars plantation / soil characteristics / genetic variability / carbon isotope discrimination (Δ) / leaf traits

Résumé – Variation génétique de la productivité, de caractères foliaires et de la discrimination isotopique vis-à-vis du carbone chez des hybrides de peuplier cultivés sur des sites contrastés.

• La productivité, des caractères foliaires et la discrimination isotopique vis-à-vis du carbone de la matière organique des feuilles (Δ_l) et de la sève élaborée (Δ_s) ont été étudiés chez *Populus deltoides* × *P. nigra* et *Populus trichocarpa* × *P. deltoides* à partir d'arbres âgés de plus de cinq ans, cultivés en peupleraie sur des sites alluviaux et non alluviaux.
 • Des différences génotypiques ont été observées pour toutes les variables. Le classement des génotypes était conservé entre deux années, alors qu'il variait entre sites une année donnée. Δ_l était corrélé positivement avec Δ_s et aucun lien n'a été détecté entre Δ_l ou Δ_s et productivité. Une interaction significative entre génotype et site a été observée pour toutes les variables. Les arbres du site non alluvial se caractérisaient par une plus faible productivité et des feuilles plus épaisses/denses avec des teneurs en azote et en carbone plus faibles. De façon intéressante, le classement des génotypes pour Δ_l était maintenu entre les expériences réalisées sur site alluvial et celles précédemment menées en serre.
 • Toutes expériences confondues, il semble possible de sélectionner des génotypes productifs et efficaces afin d'étendre les plantations à des terrains enclins à des sécheresses modérées.

peupleraie / caractéristiques du sol / variabilité génétique / discrimination isotopique vis-à-vis du carbone (Δ) / caractères foliaires

1. INTRODUCTION

Poplars are among the fastest growing trees under temperate latitudes. Their high productivity is associated with a tight dependency upon water availability (Barigah et al., 1994; Ceulemans et al., 1988; Tschaplinski and Blake, 1989; Tschaplinski et al., 1994; Zsuffa et al., 1996). Poplar cultivation tends to extend from flood plains and bottomlands towards

uplands where soil water availability is subjected to seasonal changes. To sustain this trend, it might be useful to select cultivars with improved water-use efficiency over the growth cycle. Intrinsic water-use efficiency (W_i), i.e., the ratio between net CO₂ assimilation and stomatal conductance, is an important component of this efficiency which may be indirectly estimated at leaf level, via the carbon isotope discrimination (Δ) (Farquhar and Richards, 1984; Farquhar et al., 1989; Monclus et al., 2006; Ponton et al., 2001). A large genetic variability of Δ has already been reported among poplar genotypes (Marron et al., 2005; Monclus et al., 2005 and 2006; Zhang et al., 2004).

* Corresponding author: franck.brignolas@univ-orleans.fr

† In memoriam (September 2006).

The selection of genotypes combining a satisfactory productivity and high water-use efficiency would be a considerable advantage for growth in moderately drought-constrained areas, as stated by Braatne et al. (1992) for poplar and by Condon et al. (2002) for cereals.

The links between productivity and Δ differ according to poplar species: a positive relationship was found for *Populus davidiana* (Dode) Schneider (Zhang et al., 2004), whereas none was detected for *Populus trichocarpa* $\times$ *P. deltoides* (TD hybrids) and *Populus deltoides* $\times$ *P. nigra* (DN hybrids) (Marron et al., 2005; Monclus et al., 2005; 2006; Rae et al., 2004). The lack of correlation observed for these two hybrids suggests the possibility to select genotypes displaying simultaneously a high productivity and water-use efficiency.

A detailed study with several commercial poplar genotypes (DN hybrids) grown as young cuttings in glasshouse (3-month-old rooted cuttings; Marron et al., 2005) or in a nursery (1 to 4-year-old rooted cuttings coppiced each year; Monclus et al., 2005; 2006) indicated consistent genotypic differences in W_i , and a lack of correlation between W_i and productivity. The stability of these observations remains to be established under a wider range of environmental conditions and with older trees, as some juvenility effects might interfere with the observed ranking. Therefore, we have extended the comparative approach to trees at least 5 years old grown in a commercial poplar plantation for wood production, and managed with conventional forestry practices. Tested clones were genotypes of DN hybrids and TD hybrids. Two sites were chosen in the plantation according to soil water availability and fertility. Genetic variability was studied on alluvial and non alluvial sites on the basis of 12 and 11 genotypes, respectively. The site effect was quantified by comparing 9 genotypes common to both sites. Comparisons with previous experiments carried out in glasshouse and in nursery were done using 9 DN genotypes. The productivity of each tree was computed as the ratio between the circumference measured at 1.30 m height and the age of the tree; leaf traits encompassed specific leaf area and carbon and nitrogen contents; carbon isotope discrimination was used as a surrogate for intrinsic water-use efficiency.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Study site

The experiment was carried out in the commercial poplar plantation of *Le Moulin de Bariteau* (Vienne, France, 47° 7' N, 0° 10' E; 36 m a.s.l.) which extends over 200 ha and includes about 34 000 hybrid poplar trees. The climate is oceanic, characterized by mild temperatures (11.1 °C annual mean) and a constant distribution of precipitation (650 mm per year for the last three decades) (Météo France, <http://www.meteofrance.com>). The poplar plantation occupies both sides of the *Chavenay* river, upstream of its junction with the *Négron* river and the adjacent slopes.

Soil fertility and soil water availability were analysed during 1994, for areas located on the river banks and for areas located on adjacent slopes, by the *Association Forêt Cellulose* (AFOCEL) in the *Laboratoire de la chambre d'agriculture de la Sarthe* (LARCA 72, Le Mans, France). Data related to soil characteristics are available

at <http://www.peupliersdefrance.org/indexbariteau.htm>. Soil fertility was rated according to its cationic exchange capacity (CEC; meq. 100g⁻¹) and its saturation rate (S/CEC; %); ratio between soil base cationic content (S; meq. 100 g⁻¹) and CEC. Maximal available soil water (PAW_M; mm) was assessed from soil texture (Jamagne et al., 1977). Based on LARCA data, two sites, named alluvial and non alluvial, were selected for the present study. The alluvial site displayed a CEC above 40 meq. 100 g⁻¹, a S/CEC of 100%, a PAW_M above 250 mm and the level of the water table near the soil surface year round; this zone was restricted to the banks of the *Chavenay*. The non alluvial site displayed a CEC below 23 meq. 100 g⁻¹, a S/CEC of about 90% and a PAW_M ranging from 100 to 200 mm; this site was on the adjacent slopes.

2.2. Plant material

Fourteen poplar genotypes including 10 *Populus deltoides* $\times$ *P. nigra* (DN hybrids) and 4 *Populus trichocarpa* $\times$ *P. deltoides* (TD hybrids) were selected; among them, 9 grew on both sites (Tab. I). Overall, 357 trees were studied; their age ranged from 6 to 14-year-old and their height varied from 14 to 28 m. All trees were grown at 7 $\times$ 7 m spacing.

2.3. Plant measurements

From July 18 to 21, 2005, one mature leaf was collected from the lowest branch of each tree and six calibrated discs (2 cm²) were cut from each lamina. Discs were dried at 60 °C during two days, weighted and specific leaf area (SLA, cm² g⁻¹) was computed. During the same period, phloem sap was collected from each tree with the method described by Scartazza et al. (2004) and modified by Gessler et al. (2004). On July 19, from 11:00 a.m. to 5:00 p.m., a thin strip of bark (2 cm long and 1 cm wide) still attached to the trunk was removed and plunged into tubes filled with 1 mL pure water for 4 h. This mixture was membrane filtered (0.45 μ m pore size, Millipore), put into tin capsules and oven-dried at 60 °C over one day. From July 10 to July 13, 2006, the sampling was repeated from mature leaves of trees grown in the alluvial site only. During November 2006, the productivity of each tree was estimated as the mean annual radial increment (RI, mm y⁻¹; i.e., the ratio between the circumference measured at 1.30 m height and the age of the tree), assuming a circular section of the trunk.

Carbon isotope composition ($\delta^{13}\text{C}$) and carbon and nitrogen contents (C_M , N_M ; mg g_{dw}⁻¹) of bulk leaf material were assessed from 1 mg homogenous dry powder obtained from the oven-dried calibrated discs. $\delta^{13}\text{C}$ of phloem sap was analysed from the dried phloem extracts. These analyses were conducted by the Scottish Crop Research Institute (Dundee, Scotland, UK) from a CF-IRMS (Europa Scientific ANCA-NT 20-20 Stable Isotope Analyser with ANCA-NT Solid/Liquid Preparation Module, Europa Scientific Ltd., Crewe, UK). $\delta^{13}\text{C}$ was calculated relative to Pee Dee Belemnite limestone standard as described in Craig (1957):

$$\delta^{13}\text{C} = \frac{(R_{\text{sample}} - R_{\text{standard}})}{(R_{\text{standard}})} \times 1000 (\text{‰}),$$

where R_{sample} and R_{standard} are the ¹³C/¹²C ratio in plant tissue and the standard, respectively. Carbon isotope discrimination (Δ_1 and Δ_s

Table I. Plant material description including hybrid crosses, genotypes, abbreviations, origins and the number of trees used for each genotype and for each type of site. The age (years) of trees are indicated into brackets.

Hybrid	Genotype	Abbreviation	Origin	Alluvial site	Non alluvial site
				Number of tree (Age)	Number of tree (Age)
<i>P. deltoides</i> × <i>P. nigra</i>	A4A	A4	Italy	10 (6)	
	Brenta	Bt	Italy		6 (5) + 10 (6)
	Dorskamp	Ds	The Netherlands	10 (6)	10 (5)
	I214	I2	Italy	10 (7)	30 (7)
	I45/51	I4	Italy	10 (9)	9 (10) + 10 (14)
	Koster	Ks	The Netherlands	9 (6)	
	Lambro	Lb	Italy		9 (5) + 10 (6)
	Luisa-Avanzo	La	Italy	9 (7)	
	Mella	MI	Italy	9 (6)	4 (5)
	Soligo	Sg	Italy	9 (6)	3 (5)
<i>P. trichocarpa</i> × <i>P. deltoides</i>	Beaupré	Bp	Belgium	10 (9) + 10 (8)	20 (12)
	Boelare	Bl	Belgium	10 (9)	30 (7) + 10 (13)
	Hunnegen	Hn	Belgium	10 (7)	30 (7)
	Raspalje	Rs	Belgium	10 (8)	10 (5) + 10 (6) + 10 (8) + 10 (7)

for bulk leaf matter and phloem sap respectively, ‰) was calculated according to Farquhar and Richards (1984), as:

$$\Delta = \frac{(\delta_{\text{air}} - \delta_{\text{plant}})}{(1 + (\delta_{\text{plant}}/1000))} (\text{‰}),$$

where δ_{air} and δ_{plant} are $\delta^{13}\text{C}$ of the atmospheric CO_2 (assumed to be close to -8‰) and the sample, respectively.

2.4. Statistical analyses

Results were analysed with the SPSS statistical software package (SPSS, Chicago, IL, USA) and with R software (version 2.0.1, A Language and Environment, Copyright 2004). For each variable, the normality of the distribution was tested with a Shapiro–Wilk test. Levels of significance were * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ and ns = non significant. Genotypic means are expressed with their standard error.

Genetic variability was evaluated for each site by a two-way ANOVA using the following model: $Y_{ijk} = \mu + H_i + H_i(G_j) + \varepsilon_{ijk}$; where Y_{ijk} refers to individual values, μ is the general mean, H_i is the effect of hybrid cross i , $H_i(G_j)$ is the effect of genotype j in hybrid cross i and ε_{ijk} is the error. For each site, relationships between variables were computed by linear correlation (Pearson's coefficients), and illustrated by a principal component analysis (PCA) using genotypic means. The variables were standardized and orthogonal factors (= F1 and F2 axis) were successively built as linear combinations of these variables to maximize the fraction variability explained by these factors. Variables were first represented on the plane defined by the two main factors of the PCA; their coordinates were their linear correlation coefficients (Pearson's coefficient) with these factors. Variables projected as supplementary variables in the main plane F1 × F2 were obtained by computing linear correlations between these variables and scores F1 and F2 obtained from the initial PCA.

Station effect was evaluated by a three-way ANOVA using the following model: $Y'_{ijkl} = \mu + H_i + H_i(G_j) + S_k + H_i \times S_k + H_i(G_j) \times S_k + \varepsilon_{ijkl}$;

where Y'_{ijkl} refers to individual values, μ is the general mean, H_i is the effect of hybrid cross i , $H_i(G_j)$ is the effect of genotype j in hybrid cross i , S_k is the site effect, $H_i \times S_k$ is the hybrid cross by site interaction, $H_i(G_j) \times S_k$ is the genotype in hybrid cross by site interaction and ε_{ijkl} is the error. This analysis was performed with the 9 genotypes common to both sites; noteworthy, each genotype displayed the same age on alluvial and non alluvial sites (Tab. I).

Crossing comparisons with previous studies realized in our research unit were analysed by rank correlation (Spearman's coefficient), from DN hybrids. As a whole, 9 genotypes were common with previous studies; among them 7 belonged to the alluvial site (Dorskamp, I214, I45/51, Koster, Luisa-Avanzo, Mella and Soligo) and 7 belonged to the non alluvial site (Brenta, Dorskamp, I214, I45/51, Lambro, Mella and Soligo).

3. RESULTS

3.1. Genetic variability in the alluvial site

During 2005 and 2006, significant differences were recorded between DN hybrids and TD hybrids for all variables, except for Δ_s measured in 2005 and for Δ_l measured in 2006 (Fig. 1). Overall, DN hybrids displayed higher values of RI, N_M and C_M than TD hybrids, while they displayed the lowest values of SLA and Δ_l , at least during 2005. A significant genotype effect within hybrid cross was detected for all variables in 2005 and 2006. With all genotypes grouped, the genotype ranking (Spearman coefficients, r_s) remained stable from 2005 to 2006 for N_M ($r_s = 0.59^*$), SLA ($r_s = 0.92^{***}$) and Δ_l ($r_s = 0.84^{**}$) whereas it varied significantly for C_M ($r_s = 0.46^{ns}$). In 2005, genetic variability was of the same magnitude for Δ_l and for Δ_s with values ranging from 20.1‰ to 22.3‰ and genotypic ranking remained comparable between Δ_l and Δ_s ($r_s = 0.68^*$). Values measured for SLA and

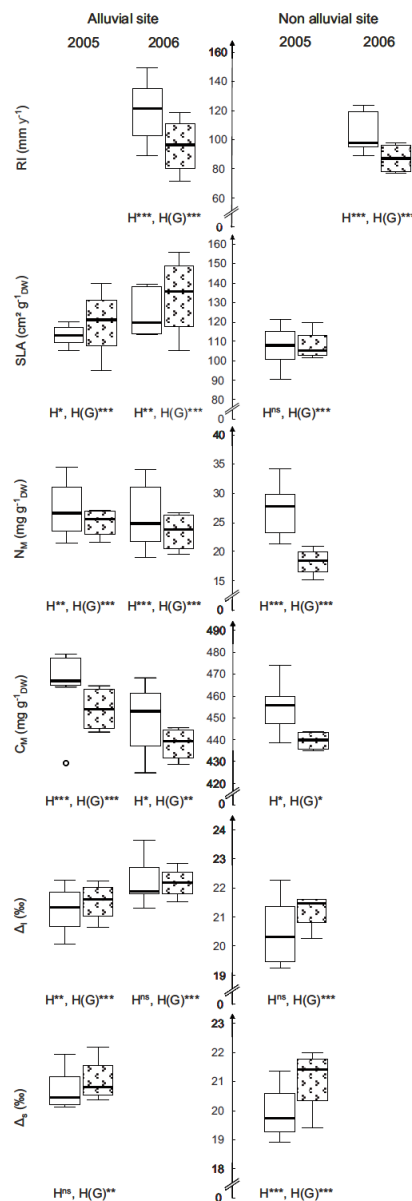


Figure 1. Genetic variability of productivity, leaf traits and variables related to water-use efficiency in DN hybrids (white boxes) and TD hybrids (hyphenated boxes) from two sites, during 2005 and 2006. Sites were alluvial (8 DN hybrids and 4 TD hybrids) and non alluvial (7 DN hybrids and 4 TD hybrids). Box plots are shown for mean annual radial increment (RI, mm y⁻¹), specific leaf area (SLA, cm² g⁻¹ dw), leaf nitrogen and carbon contents (N_M and C_M, mg g⁻¹ dw), and leaf and phloem sap carbon isotope discrimination (Δ₁ and Δ_s, respectively, ‰). Each box represents the quartile below (Q1) and above (Q3) the median value. Vertical bars show minimum and maximum values except for genotypes away from 1.5 times from the top of the inter-quartile (Q3–Q1) range. Values outside this range are represented by open circles. Levels of significance are indicated for the hybrid cross effect (H) and for the genotype in hybrid cross one [H(G)] (ns = non significant; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$).

Δ₁ were significantly higher in 2006 than in 2005; these differences could be explained by a higher cumulated rainfall (computed between January and August of each year) in 2006 than in 2005 (350 mm vs. 224 mm) (*Chambre d'agriculture d'Indre et Loire*, <http://www.indre-et-loire.chambagri.fr>). Genetic variability was of the same magnitude during the two years for Δ₁ (2.3%), while it was higher in 2006 than in 2005 for SLA.

With all genotypes grouped, the main factorial plane of the PCA (F1 × F2, Figs. 2a and 2b) explained 68.8% of the genetic variability, with 39.9% for F1 alone, while the F3 axis did not differentiate the genotypes (data not shown). Two independent groups of variables were identified from the F1 × F2 plane (Fig. 2a). The first one included Δ₁ and Δ_s and the second one RI and N_M. In each group, the variables were positively correlated (Tab. II). There was no clear grouping among genotypes in the F1 × F2 plane (Fig. 2b). Genotypes Koster and Dorskamp displayed high RI whereas Hunnegen displayed the lowest one; Raspalje had high values of Δ whereas Mella and Soligo displayed the lowest values. Interestingly, we were unable to detect any correlation between RI and Δ (Tab. II). The projection on the main plane (F1 × F2) of the variables measured in 2006, as supplementary variables, showed a similar distribution to 2005 except for C_M (Fig. 2a).

3.2. Genetic variability in the non alluvial site – comparison with the alluvial site

During 2005, significant differences were recorded between DN hybrids and TD hybrids for RI, N_M, C_M and Δ_s (Fig. 1). Overall, DN hybrids displayed higher values of RI, N_M and C_M than TD hybrids, while they displayed the lowest values of Δ_s. A significant genotype in hybrid cross effect was detected for all variables (Fig. 1). With all genotypes grouped, genotypic ranking remained comparable between Δ₁ and Δ_s ($r_s = 0.86^{**}$). The main plane of the general PCA (F1 × F2), performed at genotypic level (Figs. 2c and 2d), explained 90.8% of the genetic variability, with 63% for F1 alone, while the F3 axis did not differentiate the genotypes (data not shown). Three groups of variables were defined from the F1 × F2 plane (Fig. 2c); the first group included Δ₁ and Δ_s, the second one N_M and C_M and the third one included SLA and RI. The F1 axis of the PCA opposed Δ (Δ₁ and Δ_s) to N_M and C_M; within each group, variables were positively correlated while they were negatively correlated between groups (Tab. II). The F2 axis was defined by SLA and RI, but these variables did not correlate (Tab. II). Genotypes I214, I45/51 and Boelare displayed a high RI, a large SLA and high values of Δ₁ and Δ_s while Raspalje, Dorskamp, Mella and Brenta displayed low values of RI, SLA, Δ₁ and Δ_s; Soligo and Lambro displayed low values of Δ₁ and Δ_s while Beaupré and Hunnegen were characterized by high values of Δ₁ and Δ_s (Fig. 2d). Interestingly, we were unable to detect any correlation between RI and Δ (Tab. II).

A significant site effect was detected for all variables except Δ_s and Δ₁ (Appendix A1). Values recorded for RI, SLA, N_M and C_M were significantly lower in the non alluvial site.

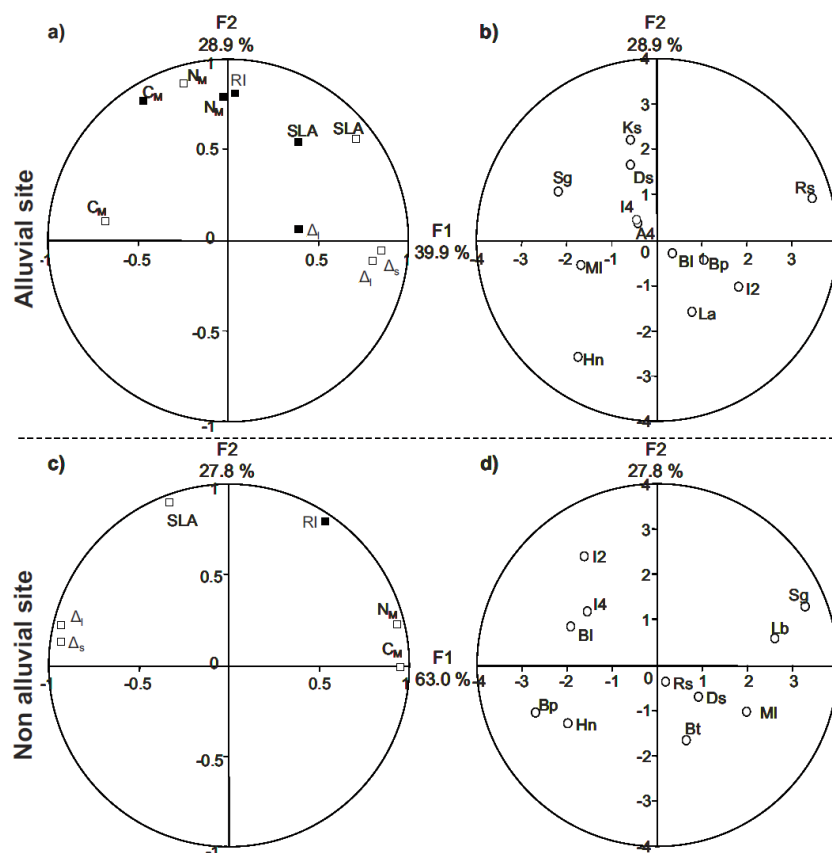


Figure 2. Factorial analysis (Principal Components Analysis) of genetic variability measured in the alluvial (a and b) and non alluvial sites (c and d). For the alluvial site, the distribution of 10 variables (a) and the projection of the 12 hybrid poplars genotypes (b) are shown in the main factorial plane $F1 \times F2$ of PCA. $F1$ and $F2$ are linear combinations of the 5 variables measured during 2005 (white squares) plus mean annual radial increment (RI) measured in 2006 (black square). The others variables recorded during 2006 in the alluvial site (black squares) were projected as supplementary variables on the main $F1 \times F2$ plane. For the non alluvial site, the distribution of 6 variables (c) and the projection of the 11 hybrid poplar genotypes (d) are shown in the main factorial plane $F1 \times F2$ of a PCA. $F1$ and $F2$ are linear combinations of the 5 variables measured during 2005 (white squares) plus mean annual radial increment (RI) measured in 2006 (black square). See Table I for genotype abbreviations.

A significant hybrid cross by site interaction was detected for N_M and SLA only (Appendix A1). TD hybrids displayed greater decrease in N_M and SLA than DN hybrids. A significant genotype in hybrid cross by site interaction was observed for all variables (Appendix A1). With all genotypes grouped, genotypic ranking varied significantly for RI, SLA, Δ_1 , Δ_s and C_M , while it remained stable for N_M ($r_s = 0.68^*$).

3.3. Comparison of field grown trees with rooted cuttings grown under either nursery (Monclus et al., 2005 and 2006) or glasshouse (Marron et al., 2005) conditions

Although growth conditions, plant size and age of the plants largely differed among the experiments, the genetic variability detected during experiments was of similar magnitude for all

leaf traits, except SLA. SLA displayed a greater variability and higher values in the glasshouse ($190 < \text{SLA} (\text{cm}^2 \text{g}_{\text{DW}}^{-1}) < 235$; Marron et al., 2005) than in the nursery ($104.4 < \text{SLA} (\text{cm}^2 \text{g}_{\text{DW}}^{-1}) < 126.3$) or in the poplar plantation ($90.3 < \text{SLA}_{2005} (\text{cm}^2 \text{g}_{\text{DW}}^{-1}) < 121.3$). In all experiments, the productivity index did not correlate with Δ measured from bulk leaf dry matter. Only one significant and positive correlation was detected between values of Δ_1 measured in 2005 or 2006 in the alluvial site and values previously measured in glasshouse from younger cuttings (Fig. 3).

4. DISCUSSION

Compared to TD hybrids, DN hybrids displayed the highest productivity (estimated via RI), the highest water-use efficiency (estimated via Δ) and thicker/denser leaves (estimated

Table II. Linear correlations (Pearson's coefficients) between mean annual radial increment (RI, mm y⁻¹), specific leaf area (SLA, cm² g⁻¹), leaf carbon and nitrogen contents (C_M, N_M; mg g_{DW}⁻¹) and, leaf and phloem sap carbon isotope discrimination (Δ_1 and Δ_s respectively, ‰). Correlations were computed at genotype level, from 12 poplar genotypes cultivated in alluvial site (above the diagonal line) and from 11 poplar genotypes cultivated in non alluvial site (below the line) in 2005. Significant correlations are indicated in bold (ns = non significant; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; nd = not determined).

	SLA		C _M		N _M		Δ_1		Δ_s	RI
	2005	2006	2005	2006	2005	2006	2005	2006	2005	
SLA	2005	0.78**	-0.46 ^{ns}	0.12 ^{ns}	0.31 ^{ns}	0.50 ^{ns}	0.41 ^{ns}	0.20 ^{ns}	0.48 ^{ns}	0.33 ^{ns}
	2006	nd	-0.16 ^{ns}	0.45 ^{ns}	0.35 ^{ns}	0.67*	0.31 ^{ns}	0.19 ^{ns}	0.17 ^{ns}	0.35 ^{ns}
C _M	2005	-0.34 ^{ns}	nd	0.45 ^{ns}	0.31 ^{ns}	0.02 ^{ns}	-0.26 ^{ns}	0.17 ^{ns}	-0.39 ^{ns}	0.02 ^{ns}
	2006	nd	nd	nd	0.65*	0.47 ^{ns}	-0.42 ^{ns}	-0.06 ^{ns}	-0.49 ^{ns}	0.70*
N _M	2005	-0.09 ^{ns}	nd	0.94***	nd	0.66*	-0.30 ^{ns}	0.03 ^{ns}	-0.15 ^{ns}	0.48 ^{ns}
	2006	nd	nd	nd	nd	nd	-0.15 ^{ns}	-0.09 ^{ns}	-0.16 ^{ns}	0.62*
Δ_1	2005	0.45 ^{ns}	nd	-0.86**	nd	-0.77**	nd	0.77**	0.69*	0.01 ^{ns}
	2006	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.43 ^{ns}	0.07 ^{ns}
Δ_s	2005	0.41 ^{ns}	nd	-0.81**	nd	-0.78**	nd	0.91***	nd	0.07 ^{ns}
	RI	0.46 ^{ns}	nd	0.49 ^{ns}	nd	0.62*	nd	-0.30 ^{ns}	nd	-0.41 ^{ns}

via SLA) with higher N_M and C_M contents at both sites. The site effect was similar for all variables between hybrid cross except for SLA and N_M; TD hybrids displayed the greatest decline in SLA and N_M when planted on the non alluvial site compared with DN hybrids. Nevertheless, all these results must be taken cautiously because of the unbalanced number of genotypes within each hybrid cross.

4.1. Genetic variability of productivity, leaf traits and variables related to water-use efficiency – year and site effects

Significant genotype variability was observed within each hybrid cross for all traits in alluvial and non alluvial sites. Such genetic variability had already been observed from younger plant material in previous studies in hybrid poplars growing in a glasshouse or in the field (Al Afas et al., 2007; Ceulemans and Deraedt, 1999; Marron et al., 2005; Monclus et al., 2005; 2006; Voltas et al., 2006).

All genotypes grouped, genotypic rankings were comparable between 2005 and 2006 for most of the variables measured from the alluvial site showing stability overtime in genetic variability. Such stability over 2 years had already been observed in nursery from 3-year-old rooted cuttings of 29 DN hybrid genotypes (Monclus et al., 2006). Δ_1 and SLA increased between 2005 and 2006; these variations can be attributed to inter-annual climatic changes and more particularly, to higher cumulated rainfall measured in 2006 than in 2005 (350 mm vs. 224 mm). Such environmental effects had similarly been observed by Monclus et al. (2006).

In 2005, a significant interaction between genotype in hybrid cross and site was detected for all variables. Taking into account that each genotype displayed the same age between alluvial and non alluvial sites, these results suggest that the effect of soil fertility and soil water availability on productivity,

on variables related to WUE and on leaf traits strongly depends on the genotype. As a whole, RI was clearly larger in the alluvial site than in the non alluvial one; this can be easily explained by higher soil fertility and soil water availability in the alluvial site. Differences between sites were corroborated by differences in some leaf traits such as SLA and N_M. The lowest values of SLA and N_M measured in the non alluvial site can be ascribed to lower soil water availability and fertility (Abrams et al., 1990; Cunningham et al., 1999; Li et al., 2005; Marron et al., 2002; Monclus et al., 2006; Niinemets et al., 1998; Poorter and de Jong, 1999). N_M decreased between alluvial and non alluvial sites while genotypic ranking remained stable suggesting that N_M variations mainly depended on the environment.

It is noteworthy that the genotype ranking was maintained for Δ_1 between experiments conducted in a glasshouse and in the alluvial station only. In both cases, plants grown on fertilized and well-watered soils and the collected leaves were exposed to low irradiance. Therefore, the genotype ranking for Δ_1 was conserved regardless of the age of the plants whereas it strongly varied for plants of similar age when grown under contrasting environmental conditions. Further experiments are needed to build a consistent data basis for age and site related effects on genotype rankings for Δ .

4.2. Relationships between productivity, leaf traits and variables related to WUE

Although Δ_1 was estimated from leaves located on the lowest branches and thus from shade leaves, a strong and positive relationship was observed between Δ_1 and Δ_s during 2005, for both sites. While Δ_1 is an integrative indicator of intrinsic water-use efficiency at a leaf life time-scale (Farquhar and Richards, 1984), Δ_s integrates the whole canopy but may reflect short-term fluctuations of C_i/C_a (Cernusak et al., 2003;

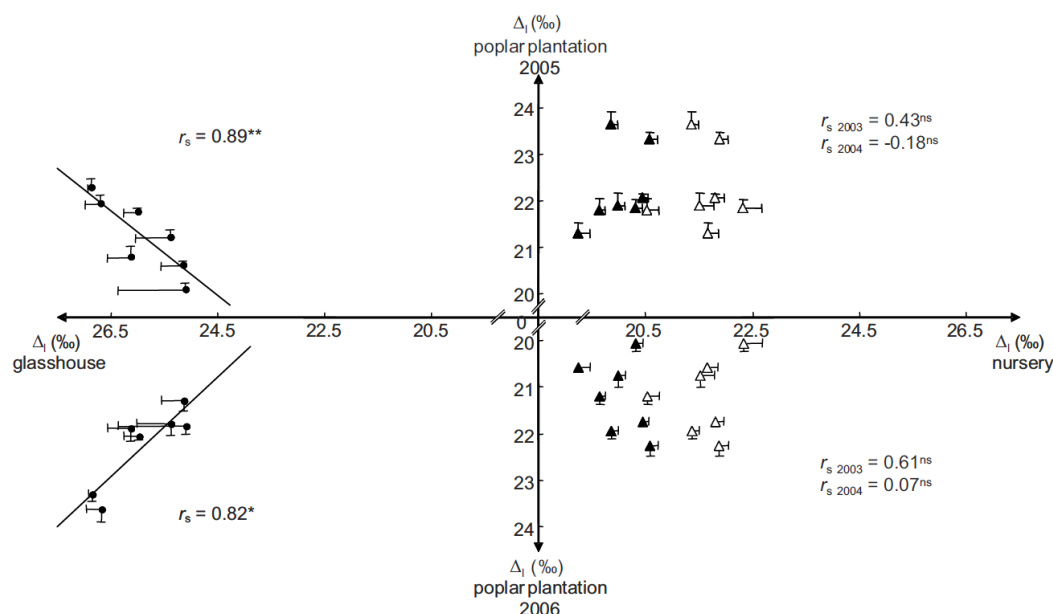


Figure 3. Relationship between leaf carbon isotope discrimination (Δ_1 , ‰) measured in the alluvial site in 2005 and 2006, and leaf carbon isotope discrimination measured for the same genotypes in glasshouse in 2001 (black circles) (Marron et al., 2005) and in nursery in 2003 (black triangles) (Monclus et al., 2005) and 2004 (white triangles) (Monclus et al., 2006). Glasshouse and nursery measurements had been recorded from plants grown under well-watered condition. Genotypic means $\pm$ standard error are indicated ($n = 7$). Rank correlations (Spearman coefficients, r_s) are indicated with level of significance (ns = non significant; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$).

Gessler et al., 2001; Keitel et al., 2003; Pate and Arthur, 1998). This similarity is remarkable with respect to the potential causes for differences in measurements at such different time and spatial scales. Nevertheless, as previously shown for mature leaves, Δ_1 could be an accurate predictor of the carbon isotope signature of the whole canopy (Cernusak et al., 2003; Gessler et al., 2001; Pate and Arthur, 1998).

No relationship has been observed between productivity and variables related to water-use efficiency (Δ), as previously described for *Populus fremontii* (Leffler and Evans, 1999), for TD hybrids (Rae et al., 2004) and for DN hybrids (Marron et al., 2005; Monclus et al., 2005; 2006; Voltas et al., 2006). The lack of correlation between productivity and water-use efficiency observed earlier on young individuals was thus confirmed at larger ages and sizes, and under very different growth conditions. From a practical point of view, these results support the idea that there is a potential for improving intrinsic water-use efficiency in poplar without necessarily reducing overall productivity. In 2005, RI scaled positively with N_M in the non alluvial site only; this result suggests that N_M would be a limiting factor for productivity in the non alluvial site. A negative correlation was observed between Δ and N_M in the non alluvial site suggesting that genetic variability of photosynthetic capacity could also contribute to WUE variability (Monclus et al., 2005; 2006). As already shown in the nursery studies, Δ did not correlate with SLA, suggesting that the variability of Δ cannot be explained by genotype variations in internal conductance to CO_2 transfer into the leaves, which may be greater in thicker leaves.

5. CONCLUSIONS

Experiments were conducted with DN and TD hybrids older than five years and grown in alluvial and non alluvial sites in a commercial poplar plantation. A large genetic variability in productivity, leaf traits and variables related to WUE was observed from mature trees, similar to that previously observed from young cuttings cultivated in glasshouse or in nursery. The genotypic ranking for WUE was maintained between young cuttings grown in glasshouse and trees grown in the alluvial site, while it was broadly disrupted for trees of similar age when grown on contrasting sites. No correlation was detected between productivity and Δ , as previously observed in a glasshouse or in a nursery, supporting the conclusion that there is a potential for improving WUE in poplar without necessarily reducing overall productivity. Interestingly for European poplar growers, we were able to detect one genotype, Soligo, combining a satisfactory productivity and a large WUE whatever the site. Moreover, we were also able to put forward one genotype, Dorskamp, combining a satisfactory productivity and low WUE in the alluvial site only; this latter genotype could be used as a medium for phytoremediation of polluted soils.

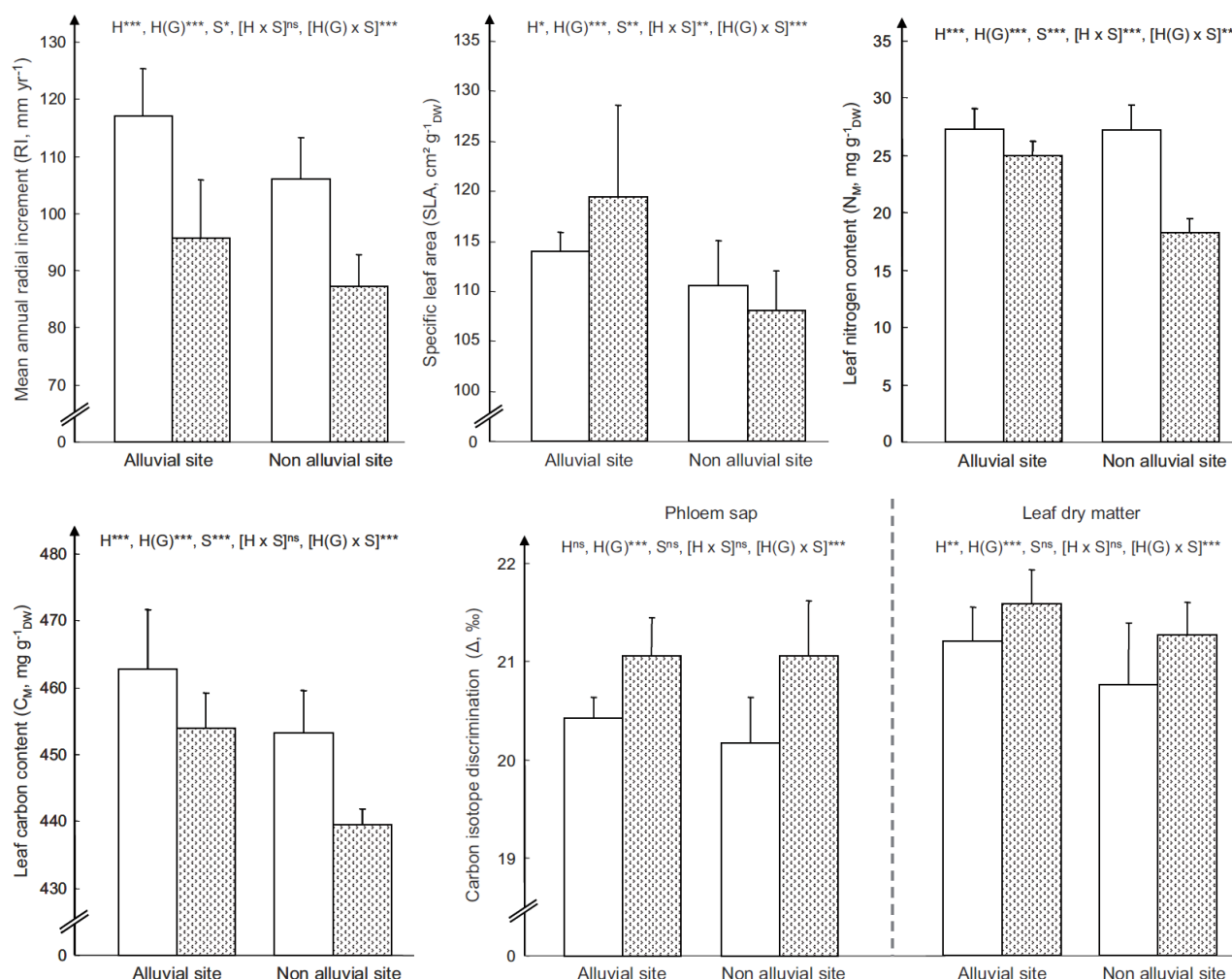
Acknowledgements: Ludovic Bonhomme was supported by a Ph.D. grant from the *Conseil Régional, Région Centre, France*. This research was funded by the Biotechnocentre association supported by the *Conseil Régional, Région Centre*. The poplar plantation was kindly provided by D. Meese. The authors gratefully acknowledge the

excellent technical assistance of Alain Guichard, Isabelle Lejan and Gilles Moreau (*Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures*). We also acknowledge Claude Bréchet from UMR EEF at INRA of Nancy and Annie-Claude Roche from CBM at CNRS of Orléans, who graciously made their respective laboratories available.

REFERENCES

- Abrams M.D., Kubiske M.E., and Steiner K.C., 1990. Drought adaptations and responses in five genotypes of *Fraxinus pennsylvanica* Marsh: photosynthesis, water relations and leaf morphology. *Tree Physiol.* 6: 305–315.
- Al afas N., Marron N., and Ceulemans R., 2007. Variability in *Populus* leaf anatomy and morphology in relation to canopy position, biomass production, and varietal taxon. *Ann. For. Sci.* 64: 521–532.
- Barigah T.S., Saugier B., Mousseau M., Guittet J., and Ceulemans R., 1994. Photosynthesis, leaf area and productivity of five poplar clones during their establishment year. *Ann. For. Sci.* 51: 613–625.
- Braatne J.H., Hinckley T.M., and Stettler R.F., 1992. Influence of soil water on the physiological and morphological components of plant water balance in *Populus trichocarpa*, *Populus deltoides* and their F1 hybrids. *Tree Physiol.* 11: 325–339.
- Cernusak L.A., Arthur D.J., Pate J.S., and Farquhar G.D., 2003. Water relations link carbon and oxygen isotope discrimination to phloem sap sugar concentration in *Eucalyptus globulus*. *Plant Physiol.* 131: 1544–1554.
- Ceulemans R. and Deraedt W., 1999. Production physiology and growth potential of poplars under short-rotation forestry culture. *For. Ecol. Manage.* 121: 9–23.
- Ceulemans R., Impens I., and Steenackers V., 1988. Genetic variation in aspects of leaf growth of *Populus* clones, using the leaf plastochron index. *Can. J. For. Res.* 18: 1069–1077.
- Condon A.G., Richards R.A., Rebetzke G.J., and Farquhar G.D., 2002. Improving intrinsic water-use efficiency and crop yield. *Crop Sci.* 42: 122–131.
- Craig H., 1957. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochim. Cosmochim. Ac.* 12: 133–149.
- Cunningham S.A., Summerhayes B., and Westoby M., 1999. Evolutionary divergences in leaf structure and chemistry, comparing rainfall and soil nutrient gradients. *Ecol. Monogr.* 69: 569–588.
- Farquhar G.D. and Richards R.A., 1984. Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Aust. J. Plant Physiol.* 11: 539–552.
- Farquhar G.D., Ehleringer J.R., and Hubick K.T., 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 503–537.
- Gessler A., Schrempf S., Matzarakis A., Mayer H., Rennenberg H., and Adams M.A., 2001. Radiation modifies the effect of water availability on the carbon isotope composition of beech (*Fagus sylvatica*). *New Phytol.* 150: 653–664.
- Gessler A., Rennenberg H., and Keitel C., 2004. Stable isotope of organic compounds transported in the phloem of European beech-evaluation of different methods of phloem sap collection and assessment of gradients in carbon isotope composition during leaf-to-stem transport. *Plant Biol.* 6: 1–9.
- Jamagne M., Bétrémieux R., Bégon J.C., and Mori A., 1977. Quelques données sur la variabilité dans le milieu naturel de la réserve en eau des sols. *Bulletin Technique d'Information* 324–325: 627–641.
- Keitel C., Adams M.A., Holst T., Matzarakis A., Mayer H., Rennenberg H., and Gessler A., 2003. Carbon and oxygen isotope composition of organic compounds in the phloem sap provides a short-term measure for stomatal conductance of European beech (*Fagus sylvatica* L.). *Plant Cell Environ.* 26: 1157–1168.
- Leffler A.J. and Evans A.S., 1999. Variation in carbon isotope composition among years in the riparian tree *Populus fremontii*. *Oecologia* 119: 311–319.
- Li Y., Johnson D.A., Su Y., Cui J., and Zhang T., 2005. Specific leaf area and leaf dry matter content of plants growing in sand dunes. *Bot. Bull. Acad. Sinica* 46: 127–134.
- Marron N., Delay D., Petit J.M., Dreyer E., Kahlem G., Delmotte F.M., and Brignolas F., 2002. Physiological traits of two *Populus* × *eu-ramericana* clones, Luisa Avanzo and Dorskamp, during a water stress and re-watering cycle. *Tree Physiol.* 22: 849–858.
- Marron N., Villar M., Dreyer E., Delay D., Boudouresque E., Petit J.M., Delmotte F.M., Guehl J.M., and Brignolas F., 2005. Diversity of leaf traits related to productivity in 31 *Populus deltoides* × *Populus nigra* clones. *Tree Physiol.* 25: 425–435.
- Monclus R., Dreyer E., Delmotte F.M., Villar M., Delay D., Boudouresque E., Petit J.-M., Marron N., Bréchet C., and Brignolas F., 2005. Productivity, leaf traits and carbon isotope discrimination in 29 *Populus deltoides* × *P. nigra* clones. *New Phytol.* 167: 53–62.
- Monclus R., Dreyer E., Villar M., Delmotte F.M., Delay D., Petit J.-M., Barbaroux C., Le Thiec D., Bréchet C., and Brignolas F., 2006. Impact of drought on productivity and water use efficiency in 29 genotypes of *Populus deltoides* × *Populus nigra*. *New Phytol.* 169: 765–777.
- Niinemetts Ü., Kull O., and Tenhunen J.D., 1998. An analysis of light effects on foliar morphology, physiology, and light interception in temperate deciduous woody species of contrasting shade tolerance. *Tree Physiol.* 18: 681–696.
- Pate J. and Arthur D., 1998. $\delta^{13}\text{C}$ analysis of phloem sap carbon: novel means of evaluating seasonal water stress and interpreting carbon isotope signatures of foliage and trunk wood of *Eucalyptus globulus*. *Oecologia* 117: 301–311.
- Ponton S., Dupouey J.L., Bréda N., Feuillat F., Bodenes C., and Dreyer E., 2001. Carbon isotope discrimination and wood anatomy variations in mixed stands of *Quercus robur* and *Quercus petraea*. *Plant Cell Environ.* 24: 861–868.
- Poorter H. and de Jong R., 1999. A comparison of specific leaf area, chemical composition and leaf construction costs of field plants from 15 habitats differing in productivity. *New Phytol.* 143: 163–176.
- Rae A.M., Robinson K.M., Street N.R., and Taylor G., 2004. Morphological and physiological traits influencing biomass productivity in short-rotation coppice poplar. *Can. J. For. Res.* 34: 1488–1498.
- Scartazza A., Mata C., Matteucci G., Yakir D., Moscatello S., and Brugnoli E., 2004. Comparisons of $\delta^{13}\text{C}$ of photosynthetic products and ecosystem respiratory CO_2 and their responses to seasonal climate variability. *Oecologia* 140: 340–351.
- Tschaplinski T.J. and Blake T.J., 1989. Water relations, photosynthetic capacity, and root/shoot partitioning of photosynthetic as determinants of productivity in hybrid poplar. *Can. J. Bot.* 67: 1689–1697.
- Tschaplinski T.J., Tuskan G.A., and Gunderson C.A., 1994. Water-stress tolerance of black cottonwood and eastern cottonwood clones and four of their hybrid progeny. I. Growth, water relations and gas exchange. *Can. J. For. Res.* 24: 364–371.
- Voltas J., Serrano L., Hernandez M., and Peman J., 2006. Carbon isotope discrimination, gas exchange and stem growth of four Euramerican hybrid poplars under different watering regimes. *New For.* 31: 435–451.
- Zhang X., Zang R., and Li C., 2004. Population differences in physiological and morphological adaptations of *Populus davidiana* seedlings in response to progressive drought stress. *Plant Sci.* 166: 791–797.
- Zsuffa L., Giordano E., Pryor L.D., and Stettler R.F., 1996. Trends in poplar culture: some global and regional perspectives. In: Stettler R.F., Bradshaw H.D. Jr., Heilman P.E., and Hinckley T.M. (Eds.), *Biology of Populus and its Implications for Management and Conservation*, NRC-CNRC, Ottawa, pp. 515–539.

APPENDIX



Appendix A1. Comparison between alluvial and non alluvial sites for mean annual radial increment (RI, mm y⁻¹) specific leaf area (SLA, cm² g⁻¹ DW), leaf nitrogen and carbon contents (N_M and C_M, mg g⁻¹ DW), and leaf dry matter and phloem sap carbon isotope discrimination (Δ, ‰). Comparison was performed from 9 hybrid poplars (5 DN hybrids (white bars) and 4 TD hybrids (hyphenated bars)) common to the two sites. Means ± standard errors were presented for each site. Levels of significance are indicated for the hybrid cross effect (H), for the genotype in hybrid cross effect [H(G)], for the site effect (S), for the hybrid cross by site interaction (H × S) effect and for the genotype in hybrid cross by site interaction [H(G) × S] effect (ns = non significant; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$).

CHAPITRE II

Approche protéomique des variations génétiques de l'efficience d'utilisation de l'eau chez *P.* *×euramericana*

- Impact d'une sécheresse modérée -



Dispositif expérimental réalisé en pépinière à l'INRA d'Orléans et constitué de deux parcelles jumelles, l'une irriguée l'autre soumise à un arrêt d'arrosage pendant 86 jours. Photo R. Monclus.

CHAPITRE II

Approche protéomique des variations génétiques de l'efficacité d'utilisation de l'eau chez *P. xeuramericana*

- Impact d'une sécheresse modérée -

1. État des connaissances

Le terme **protéome** correspond à l'ensemble des **protéines** exprimées par un **génom**e dans des conditions données et à un moment donné ([Wasinger et al., 1995](#)). Alors que les approches génomiques n'offrent qu'une indication du potentiel des cellules, le protéome est une entité dynamique offrant des informations complémentaires permettant une meilleure compréhension de la complexité du fonctionnement cellulaire. En effet, le vieux paradigme : *1 gène = 1 protéine* est révolu et l'étude des quantités d'ARNm ne fournit seulement qu'une vue partielle de l'expression du gène. En effet, (i) le turnover diffère entre ARNm et protéines, (*i.e.*, une protéine peut être encore abondante dans une cellule alors que son ARNm n'est plus synthétisé), (ii) les protéines peuvent subir des modifications post-traductionnelles telles que les phosphorylations et les glycosylations, qui conditionnent leur activité et leur localisation sub-cellulaire, et (iii) des interactions complexes peuvent se produire entre protéines ([Plomion et al., 2009](#)). Aucune relation simple ne peut donc être établie entre le niveau d'ARNm et leurs produits finaux (quantité/activité) ([Gigy et al., 1999](#) ; [Uesono et Toh, 2002](#)).

La protéomique est donc un outil privilégié pour mettre en relation l'expression des protéines avec des variations développementales, physiologiques ou génétiques ([Zivy et de Vienne, 2000](#)). Dans ce champ d'investigation, l'électrophorèse bidimensionnelle représente actuellement la technique la plus utilisée pour l'analyse du

Table 1. Analyses protéomiques menées par électrophorèse bidimensionnelle chez le peuplier. Modifié d’après Plomion et al. (2009)

Auteur	Bogeat-Triboulot	Bohler	Du	He	Kieffer	Kieffer	Plomion	Renaut	van der Mijnsbrugge	Yuan
Année	2007	2007	2006	2008	2008	2009	2006	2004	2000	2008
Contexte	Déficit hydrique	Ozone	Régénération du système vasculaire secondaire	Déficit hydrique, hautes températures	cadmium	cadmium	Déficit hydrique	Froid	Formation du bois	Agent pathogène
Organes étudiés	Feuilles	Feuilles	Cambium	Feuilles	Feuilles	Feuilles	Feuilles, Racines, xylème, cambium, bourgeon, inflorescence,	Feuilles	xylème	Feuilles
Génotype	Populus euphratica Oliv.	Populus ×canescens (Aiton) Smith - clone INRA ‘717-1-B4’	P. tomentosa	P. ×euramericana cv. ‘74/76’	Populus tremula L.	Populus tremula L.	Populus trichocarpa clone ‘101-74’ et ‘Fritzi Pauley’ P. trichocarpa × P. deltoides clone ‘Beaupré’	Populus tremula L. × P. tremuloides Michaux cv. ‘Muls 1’	Populus trichocarpa Hook. cv. ‘Trichobel’	P. ×euramericana cv. ‘NL895’
Extraction	TCA/acétone	TCA/acétone	TCA/acétone	TCA/acétone	TCA/acétone	TCA/acétone	TCA/acétone	TCA/acétone	Phénol	TCA/acétone
Séparation	2-DE DIGE	2-DE DIGE	2-DE	2-DE	2-DE DIGE	2-DE DIGE	2-DE	2-DE	2-DE	2-DE
1 ^{ère} dimension	IPG-IEF	IPG-IEF	IPG-IEF	IPG-IEF	IPG-IEF	IPG-IEF	IPG-IEF	IPG-IEF	CA-IEF	IPG-IEF
Gradient de pH	4-7	4-7	4-7	4-7	4-7	4-7	4-7	4-5, 4,5-5,5, 5-6	3-10	4-7
2 ^{nde} dimension	SDS-PAGE	SDS-PAGE	SDS-PAGE	SDS-PAGE	SDS-PAGE	SDS-PAGE	SDS-PAGE	SDS-PAGE	SDS-PAGE	SDS-PAGE
% acrylamide	12,5 %	8-14 %	15 %	15 %	8-14 %	12,5 %	12 %	12,5 %	12 %	12 %
Coloration	no	no	CBB R-250	CBB R-250	Sypro Ruby	Sypro Ruby	CBB G-250	AgNO3	CBB	CBB G-250
Analyse d'image	Decyder	Decyder	Image Master 2D Elite	Image Master 2D Platinum	Decyder	Decyder	Image Master 2D Elite	Image Master 2D Elite	N.R.	PDQuest
Nb de spots détectés	N.R.	1900		> 1000	~ 1200	~ 1200	Dépendent du tissu	> 1500	N.R.	550
Nb de spots reproductibles	N.R.	529		N.R.	717	~ 1000	Dépendent du tissu	800	N.R.	500
Nb de variations significatives	375	147	550	26	194	185		60		40
Identification	MALDI-TOF-MS + MALDI-TOF/TOF-MS/MS	MALDI-TOF-MS + MALDI-TOF/TOF-MS/MS	MALDI-TOF-MS	MALDI-TOF/TOF-MS	MALDI-TOF/TOF-MS	MALDI-TOF-MS	nLC-ESI-MS/MS + MALDI-TOF-MS	MALDI-TOF-MS	Edman micro-sequencing	MALDI-TOF-MS
Bases de données	SP + TrEMBL + nr viridiplantae	SP + TrEMBL + nr viridiplantae	nr + SP	nr viridiplantae	NCBI populus ESTs	NCBI nr viridiplantae + populus ESTs	dbEST Populus ESTs + first draft of the JGI Populus genome assembly	SP + TrEMBL viridiplantae	Populus trichocarpa ESTs	nr viridiplantae
Nb de protéines analysées	100	144	550	26	194	185	398 + 320	60	15+25	40
Nb de protéins identifiées	39	71	199	24	118	125	363 + 83	26	14+5	37
Taux d'identification	39,0 %	49,3 %	39,8 %	92,3 %	60,8 %	67,6 %	91,2 % + 43 %	43,3 %	93,3 % + 20 %	92,5 %

N.R. Non renseigné

protéome. Son principe, établi depuis plus de 30 ans (O'Farrell, 1975 ; Klose, 1975), permet aujourd'hui de séparer et de visualiser sous forme de « spots », des milliers de protéines en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques.

Cette méthode consiste à extraire les protéines d'une culture cellulaire, d'un tissu ou d'un organe. Pendant cette étape, les protéines sont précipitées pour enlever les contaminants non protéiques puis resolubilisées dans une solution compatible avec les techniques de séparation. Les protéines sont ensuite séparées dans un premier temps en fonction de leur charge (isoélectrofocalisation, IEF), puis dans un second temps en fonction de leur masse moléculaire au travers d'un gel de poly-acrylamide (SDS-PAGE). Les gels obtenus sont colorés, puis numérisés, et l'abondance relative des protéines est comparée par analyse informatique d'image. Les spots protéiques d'intérêt sont excisés puis identifiés par spectrométrie de masse.

Chez le peuplier, les approches protéomiques demeurent encore peu nombreuses, bien que d'importantes collections d'EST soient disponibles (Sterky *et al.*, 2004 ; Ralph *et al.*, 2006) et que le séquençage de *Populus trichocarpa* (Tuskan *et al.*, 2006) ait considérablement optimisé l'identification des protéines par spectrométrie de masse. La première étude protéomique par électrophorèse bidimensionnelle a été publiée en 2000 (Vander Mijnsbrugge *et al.*, 2000), mais la plupart des analyses sont rapportées depuis 2004 (Renaut *et al.*, 2004 ; Du *et al.*, 2006 ; Plomion *et al.*, 2006 ; Bogeat-Triboulot *et al.*, 2007 ; Bohler *et al.*, 2007 ; He *et al.*, 2008 ; Kieffer *et al.*, 2008 ; Yuan *et al.*, 2008 ; Kieffer *et al.*, 2009) (Table 1). Chez les plantes tels que *A. thaliana* et les plantes de grande culture (riz, orge, maïs, blé), les approches protéomiques sont plus répandues (Cánovas *et al.*, 2004 ; Agrawal *et al.*, 2005a et 2005b ; Rossignol *et al.*, 2006 ; Jorrín *et al.*, 2007). Leurs champs d'expertise sont variés mais la plupart des analyses concernent les aspects développementaux ou les réponses aux stress biotiques et abiotiques à l'échelle de l'organe, du tissu ou de suspensions cellulaires.

Si les études protéomiques ont déjà montré leur intérêt dans la détection de variations génétiques (Zivy *et al.*, 1983 et 1984 ; Zivy, 1987 ; Morabito *et al.*, 1996 ; de Vienne *et al.*, 1999 ; Thiellement *et al.*, 1999 et 2002 ; Zivy et de Vienne, 2000 ; Valcu *et al.*, 2008), à notre connaissance aucune ne s'est intéressée à la caractérisation de génotypes contrastés pour leur efficacité d'utilisation de l'eau. Dans cette section, nous présenterons dans un premier temps, les travaux protéomiques qui ont visé à caractériser

les réponses des plantes aux déficits hydriques par électrophorèse bidimensionnelle. Dans un second temps, nous exposerons l'état actuel des connaissances génomiques des bases moléculaires de l'efficacité d'utilisation de l'eau.

1.1. Effet du déficit hydrique sur les protéomes des plantes

L'une des premières études portant sur la réponse des plantes au déficit hydrique concernait les variations induites par une sécheresse sur les profils protéiques de feuilles et de racines, de deux mutants d'*A. thaliana* insensibles à l'auxine (Leymarie *et al.*, 1996). Les auteurs ont séparés près de 600 spots protéiques reproductibles dans les feuilles ou dans les racines. Les variations induites par la sécheresse et/ou les mutations concernaient 30 spots exclusivement détectés dans les feuilles, 15 dans les racines et 8 observés dans les deux organes. Bien que les protéines correspondantes n'aient pas été identifiées, les auteurs suggéraient que les variations observées pouvaient contribuer à la réponse à la sécheresse et aux mécanismes affectant la sensibilité à l'auxine. Le développement des techniques de micro-séquençage d'Edman puis de spectrométrie de masse a ensuite permis d'établir les premières listes de protéines (Costa *et al.*, 1998 ; Riccardi *et al.*, 1998) offrant ainsi de nouvelles perspectives pour la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse des plantes aux déficits hydriques.

Dans une revue récente, Vincent et Zivy (2007) ont présenté une synthèse de différentes études protéomiques menées sur la réponse des plantes aux stress abiotiques. Ces auteurs montrent que les résultats décrits ces dix dernières années sont difficiles à synthétiser, du fait de l'hétérogénéité des espèces, des organes ou des tissus étudiés, des méthodologies et des conditions dans lesquelles les expériences ont été réalisées. Ainsi, dans les paragraphes suivants nous décrirons les différentes espèces étudiées à ce jour, indépendamment les unes des autres. Nous distinguerons tout d'abord, les études protéomiques concernant la réponse à la sécheresse des plantes de grande culture annuelles ou bisannuelles (*e.g.*, maïs, riz, betterave à sucre, blé). Ce sont, chez ces espèces, que la réponse du protéome au déficit hydrique est actuellement la plus documentée. Outre l'analyse des réponses générales induites par la contrainte, plusieurs de ces travaux se sont également intéressés aux variations génétiques de la réponse au déficit hydrique. Nous terminerons par les études traitant des réponses aux déficits hydriques des espèces ligneuses, principalement des essences forestières, se distinguant

probablement par des mécanismes adaptatifs spécifiques leur permettant de faire face aux variations annuelles de la disponibilité en eau du sol.

1.1.1. Protéomes des plantes de grande culture

Chez le maïs, [Riccardi et al. \(1998\)](#) ont publié une des premières listes de protéines induites par un stress hydrique. Ces travaux furent entrepris à partir de deux lignées contrastées pour leurs capacités à maintenir leur rendement en condition de stress hydrique, et leurs hybrides F1. Après dix jours d'arrêt d'arrosage, lorsque la différence de potentiel hydrique foliaire entre plants irrigués et non irrigués était de 1,2 MPa, les profils protéiques ont été réalisés à partir des zones d'élongation foliaire. Parmi 78 spots protéiques présentant des variations significatives en réponse à la sécheresse, 23 présentaient une diminution d'abondance, 40 présentaient une augmentation d'abondance, 10 n'étaient détectables qu'en condition de stress et 5 présentaient des variations dépendantes du génotype. Seize spots dont l'abondance augmentait ont été identifiés. Outre des protéines connues pour être modulées par le stress hydrique (*ABA-induced OSR40 protein*, *dehydrin*, *ferritin*, *ABA/stress/ripening responsive ASR protein*), les auteurs ont identifié des protéines impliquées dans le métabolisme des carbohydrates (*triose phosphate isomerase*, *enolase*, *putative cytoplasmic malate dehydrogenase*, *fructose biphosphate aldolase*, *phosphoribulokinase*), dans l'assimilation des éléments minéraux (*soluble inorganic pyrophosphatase*) et dans les voies de biosynthèse de la lignine (*glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminotransferase*, *cysteine synthase*, trois isoformes d'une β -glucosidase et *caffeate-O-methyltransferase* ; COMT). Dans la continuité de ce travail, la cinétique de régulation de ces protéines a été étudiée pendant 14 jours de déficit hydrique ([Riccardi et al., 2004](#)). Au cours de cette expérience, la teneur en eau (variant de 95% à <60%), le potentiel hydrique (variant de -0,3 MPa à -3 MPa) et les concentrations en ABA des feuilles (variant de 200 ng.g⁻¹ à 4000 ng.g⁻¹) ont été mesurés, permettant ainsi d'évaluer les relations entre les niveaux d'abondance des protéines et les caractéristiques physiologiques et biochimiques des plantes. Les auteurs ont ainsi démontré que les variations de certaines protéines, telle qu'une protéine similaire à *OSR40* observée lors de la précédente expérience, étaient fortement corrélées avec l'évolution des concentrations en ABA des plantes, alors qu'un plateau de régulation était observé pour les autres protéines. Cette analyse a également confirmé que les

différences de réponses entre les lignées, n'étaient pas nécessairement liées à un retard de la réponse mais plutôt à une expression spécifique d'une des deux lignées (*i.e.* de la lignée tolérante dans le cas de la protéine ZmASR1). Toutefois, les auteurs ont également suggéré que malgré l'existence de telles variations dépendantes du génotype, toutes n'étaient probablement pas liées à des variations génétiques de la régulation de la protéine mais pouvaient être reliées à une accumulation différentielle d'ABA. [Vincent et al. \(2005\)](#) ont poursuivi l'analyse du stress hydrique chez le maïs en fonction de la différenciation et du développement cellulaire de la feuille ; le méristème se trouvant à la base de la feuille, un gradient d'âge des tissus s'installe le long de la feuille. Ainsi, à partir de prélèvement de fragments de feuilles, des profils protéiques de tissus d'âges différents ont été réalisés. En comparant ces différents profils protéiques obtenus à partir de plants soumis à différents niveaux de contrainte hydrique, les auteurs ont observé une zone de lignification située au dessus de la zone d'élongation et que le déficit hydrique induisait (i) le déplacement de cette zone vers la région basale de la feuille et (ii) une régulation négative de la voie de biosynthèse des lignines. Une analyse métabolomique des composés de lignine sur le gradient d'âge foliaire a confirmé que la région où la lignine était synthétisée correspondait à la région où les enzymes impliquées dans la biosynthèse de lignine montraient la plus forte abondance. Ainsi, l'augmentation de l'abondance de COMT observée à la base des feuilles de maïs par [Riccardi et al. \(1998\)](#) n'était probablement pas due à une surexpression de COMT, mais liée au décalage de la zone de lignification vers la base de la feuille.

Concernant ZmASR1, le locus déterminant son expression ou non expression a été détecté sur le chromosome 10, au même endroit que le gène codant cette protéine, ce qui suggère que le polymorphisme responsable de la variation de l'expression de ZmASR1 dérive du gène lui-même. Des QTLs ont également été localisés dans cette même région chromosomique, tel que le QTL lié à la sénescence. Une telle co-localisation de QTLs de traits phénotypiques avec le QTL de l'expression de la protéine ZmASR1 (PQL, Protein Quantity Locus) suggère que la variation de traits phénotypiques puisse être dépendante des variations d'expression de cette protéine ([de Vienne et al., 1999](#)). En effet, [Jeanneau et al. \(2002a\)](#) ont confirmé par transformation génétique, l'effet de l'expression de ZmASR1 sur la sénescence des feuilles.

Chez le riz, [Salekdeh et al. \(2002\)](#) ont effectué une comparaison du protéome foliaire de deux génotypes contrastés pour leurs capacités d'ajustement osmotique et leurs caractéristiques racinaires. Les plants, cultivés en pots de grande capacité (20 × 55 cm), ont tout d'abord été soumis à un arrêt d'arrosage pendant 23 jours induisant une différence de potentiel hydrique foliaire de 1,4 MPa entre plants stressés et irrigués, puis à un réarrosage pendant dix jours. Des feuilles ont été collectées après 18 et 23 jours de déficit hydrique puis après 5 et 10 jours de réarrosage. Quarante deux spots protéiques présentaient des variations en réponse à la sécheresse, parmi lesquels 27 présentaient des variations dépendantes du génotype. La majorité des différences génotypiques dans la réponse à la contrainte correspondait à des protéines dont l'abondance augmentait uniquement chez le génotype tolérant ou diminuait uniquement chez le génotype sensible. Quinze protéines ont été identifiées ; l'arrêt d'arrosage induisait une augmentation de l'abondance de protéines impliquées dans la fixation du carbone et le métabolisme des carbohydrates (deux isoformes d'une *RuBisCO activase*, une *fructose 1,6-bisphosphate aldolase* et une *cytosolic triosephosphate isomerase*), dans la réponse au stress oxydatif (*GSH-dependent dehydroascorbate reductase* et deux isoformes d'une *Cu/Zn superoxide dismutase*), dans le métabolisme des protéines et des nucléotides (*translation elongation factor EF-Tu* et *nucleoside diphosphate kinase*), dans la dépolymérisation de l'actine (*actin depolymerizing factor*) et de deux isoformes d'une *S-like RNase*. Une diminution d'abondance a été constatée pour une *isoflavone reductase-like* (métabolisme secondaire), deux isoformes d'une protéine chloroplastique *Rieske Fe-S* (photosynthèse) et une protéine de fonction inconnue. Lors du réarrosage, ces variations se sont avérées complètement ou partiellement réversibles.

[Ali et Komatsu \(2006\)](#) ont également réalisé une analyse chez le riz. Des plants ont été soumis à un déficit hydrique pendant 6 jours jusqu'à atteindre une teneur en eau du sol de 10%. Du 2^{ème} au 6^{ème} jour, des gaines de feuilles ont été collectées quotidiennement sur des plants témoins et des plants soumis à la contrainte. Après six jours de contrainte, l'abondance de 35 spots distinguait quantitativement les plants témoins des plants stressés. Parmi ces spots, 12 qui variaient dès le deuxième jour de contrainte ont été identifiées par spectrométrie de masse. Le déficit hydrique induisait une augmentation de l'abondance de dix protéines impliquées dans les processus liés à la photosynthèse (*Photosystem II oxygen evolving complex protein*, *oxygen evolving enhancer protein 2*, *chloroplast ATPase*, *light harvesting complex chain II*), dans la

réponse aux stress oxydatif ou salin (*serine hydroxymethyltransferase 1*, *2-Cys peroxiredoxin BAS1*, *superoxide dismutase* et *salt induced protein*), dans le métabolisme des carbohydrates (*Phosphoglucomutase cytoplasmic 2*) et dans la dépolymérisation de l'actine (*actin depolymerizing factor*). Une diminution d'abondance a été constatée pour une *RuBisCO small chain* et *large chain*. L'effet d'autres stress sur les variations d'abondance de ces protéines a également été analysé. Dans ce cadre, seul le stress osmotique augmentait l'accumulation de la *superoxide dismutase*, de la *light harvesting complex chain II*, de l'*actin depolymerizing factor* et de la *salt induced protein* mais aucun effet n'était observé sous l'action du froid, du stress salin ou d'un traitement à l'ABA. Les auteurs ont complété cette étude en jugeant l'effet du déficit hydrique sur le protéome des gaines foliaires d'un génotype tolérant à la sécheresse. Les protéines *light harvesting complex chain II* et *actin depolymerizing factor* étaient présentes en quantités plus importantes chez le génotype tolérant en condition de contrainte comme en condition témoin. Enfin, l'analyse de l'effet de la contrainte a été étendue aux protéomes racinaires et des lames foliaires. Seule l'abondance de l'*actin depolymerizing factor* augmentait dans tous les organes du riz sous l'action du déficit hydrique. Ces résultats soulignent l'importance de l'*actin depolymerizing factor* dans la réponse à la sécheresse chez le riz et corroborent les observations réalisées par [Salekdeh et al. \(2002\)](#). La régulation de cette protéine a, par ailleurs, été corrélée avec l'activité des canaux K^+ des cellules de garde ([Luan, 2002](#)).

Chez la betterave à sucre, [Hajheidari et al. \(2005\)](#) ont soumis deux génotypes à une sécheresse modérée et progressive en champs, en réduisant l'arrosage pendant la saison de croissance. Cent cinquante sept jours après l'ensemencement, lorsque les teneurs en eau relative des parties aériennes avaient chuté à 65% chez les plants stressés, des feuilles ont été collectées et leurs protéomes ont été comparés. Parmi plus de 500 spots reproductibles, l'abondance de 79 présentait des variations significatives en réponse à la contrainte chez au moins un des génotypes. L'abondance de 45 spots diminuaient en réponse à la contrainte, l'abondance de 27 autres augmentaient et 8 spots n'étaient détectés que chez les plants soumis au déficit hydrique. Parmi les protéines identifiées, les auteurs ont observé que le déficit hydrique augmentait l'abondance de quatre produits de dégradation de la RuBisCO, d'une osmotine (*osmotin-like protein*),

de deux *small HSPs*, de protéines impliquées dans la réponse au stress oxydatif (*Cu/Zn superoxide dismutase*, *2-Cys peroxiredoxin*, *putative oxidoreductase*) et dans le métabolisme des protéines et des nucléotides (*nucleoside diphosphate kinase* et deux isoformes d'une *cyclophilin*). L'abondance d'une putative *nascent polypeptide-associated complex alpha-chain* (métabolisme des protéines) diminuait.

Chez le blé, Hajheidari et al. (2007) ont soumis trois génotypes à une sécheresse modérée et progressive en champs, en réduisant l'arrosage pendant la saison de croissance. Des épis ont été collectés à partir des plants témoins et stressés à la fin de la saison de croissance et leurs protéomes ont été comparés. Parmi près de 650 spots reproductibles, 121 présentaient des variations d'abondance significatives en réponse à la contrainte chez au moins un des génotypes et 57 protéines ont été identifiées. Les deux tiers correspondaient à des protéines pouvant être régulées par la thioredoxine (e.g., *α-amylase inhibitor*, *dehydroascorbate reductase*, *1-Cys-peroxiredoxin*), illustrant un lien entre stress hydrique et stress oxydatif. De façon intéressante, des variations génétiques s'observaient ; le génotype tolérant se distinguait dans sa réponse au déficit hydrique par une accumulation de protéines telles que *thioredoxin h*, *glutathione S-transferase*, *cold-regulated protein*, *dehydroascorbate reductase*, *elongation factor-1 α* et *HSP17*) et une diminution d'abondance de *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, *protein disulfide isomerase 3 precursor* et *globulin storage protein*.

1.1.2. Protéomes des plantes ligneuses

Chez le pin maritime, Costa et al. (1998) ont suivi, pendant une saison de végétation, l'impact de déficits hydriques sur le protéome des aiguilles. Ces expériences, menées en serre, ont porté sur des plants de deux ans soumis à différentes intensités d'arrêts d'arrosage : (i) provoquant le dépérissement complet des individus et (ii) induisant des potentiels hydriques foliaires de base de -2 MPa. Trente huit spots montraient des variations liées aux changements du potentiel hydrique de base et dix protéines ont été identifiées. Pendant la contrainte, l'abondance de trois produits de dégradation de la RuBisCO augmentait, cinq autres protéines s'accumulaient (deux isoformes de *glutathione peroxidase*, une *caffeoyl CoA-O-methyltransferase*, une *low molecular weight heat shock protein* et une *Cu/Zn superoxide dismutase*) et deux présentaient des abondances réduites (*actin* et *RuBisCO activase*).

Chez le chêne vert, [Jorge et al. \(2006\)](#) ont évalué l'impact de la sécheresse sur le protéome foliaire de plants âgés de deux ans. Après sept jours d'arrêt d'arrosage en chambre de culture, la différence de potentiel hydrique foliaire de base était de 0,3 MPa entre plants témoins et stressés. L'analyse des protéomes a montré 14 spots distinguant qualitativement les plants témoins des plants soumis à la contrainte ; huit étaient détectables uniquement pendant le stress (deux protéines ont été identifiées : RubisCO small subunit et fructose-bisphosphate aldolase) alors que 6 autres n'étaient détectés qu'en condition témoin (deux protéines ont été identifiées : *RubisCO large subunit* et *RubisCO activase*).

[Echevarría-Zomeño et al. \(2008\)](#) ont réalisé une seconde étude chez le chêne vert. Un lot de plants a été continuellement arrosé (potentiel hydrique de base de l'ordre de -0,7 MPa), un second lot a été soumis à un arrêt d'arrosage de 14 jours ($\approx -1,5$ MPa) et un troisième lot a été réarrosé après 7 jours d'arrêt d'arrosage (≈ -1 MPa au 7^{ème} jour puis comparable aux plants témoins au 14^{ème} jour). Au 14^{ème} jour, des feuilles de plants témoins, stressés et ré-arrosés ont été collectées et les protéomes ont été comparés. Les plants soumis à la contrainte de 14 jours différaient des plants témoins par une diminution de l'abondance de protéines impliquées dans la photosynthèse (*oxygen evolving enhancer protein 1*, *oxygen-evolving enhancer protein 2*), dans la glycolyse (deux isoformes de *triosephosphate isomerase*) et dans le métabolisme secondaire (*isoflavone reductase*). Les plants réarrosés présentaient des quantités plus faibles de *glutamine synthetase cytosolic* et des deux isoformes de *triosephosphate isomerase*.

Chez la vigne, [Vincent et al. \(2007\)](#) ont analysé l'impact d'un déficit hydrique et d'un stress salin chez deux cultivars contrastés pour leur tolérance à ces contraintes : Chardonnay et Cabernet Sauvignon. Les plants ont été soumis à un stress progressif sur une période de 16 jours jusqu'à atteindre une différence du potentiel hydrique de -1 MPa entre plants témoins et stressés. Parmi les protéines dont l'abondance était affectée par la contrainte (hydrique ou saline), la majorité correspondait à des enzymes impliquées dans la photosynthèse et dans le métabolisme des protéines. La plus forte accumulation a été enregistrée pour une *nuclear matrix constituent protein 1* impliquée dans la reconstitution de l'enveloppe nucléaire pendant la mitose, et pour une *ribosomal protein*

L39 dont la fonction est inconnue chez les plantes. Le cultivar sensible se distinguait par de plus importantes accumulations de *pathogenesis-related (PR) proteins* et d'une *mitochondrial peroxiredoxin*.

Chez le peuplier, la première analyse de l'effet d'un déficit hydrique sur le contenu en protéine a été réalisée chez *Populus tremula* par électrophorèse monodimensionnelle (Pelah *et al.* 1995). L'augmentation d'une *boiling stable protein* a été observée chez de jeunes plantules déshydratées de 20% de leur masse fraîche. Les auteurs ont ensuite suggéré que l'accumulation de cette protéine pouvait contribuer au maintien de la stabilité des membranes cellulaires lors de la contrainte (Pelah *et al.*, 1997). Plus récemment, les analyses du contenu en protéines ont utilisé l'électrophorèse bidimensionnelle. Ces études ont toutes porté sur un génotype particulier, soit *Populus euphratica* Oliv. (Bogeat-Triboulot *et al.*, 2007), *P. trichocarpa* × *P. deltoides* cv. 'Beaupré' (Plomion *et al.*, 2006) ou *P. deltoides* × *P. nigra* cv. '74/76' (He *et al.*, 2008). Chez *Populus euphratica* Oliv., une comparaison du protéome foliaire a été réalisée entre plants maintenus à la capacité au champ et plants soumis à un déficit hydrique modéré et progressif, mené en serre pendant quatre semaines. L'effet de la contrainte a été évaluée pour des valeurs de teneurs en eau du sol de 10%, 7,5%, 5% et 4% et un point de comparaison a été effectué après réarrosage. Parmi 39 protéines identifiées, la contrainte augmentait l'abondance d'enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique et la fixation du carbone (e.g., *ATP synthase β -subunit*, *ATPase α -subunit*, *carbonic anhydrase*, *Rubisco activase*, *oxygen-evolving complex 33-kD PSII*) et dans la glycolyse (e.g., *glyceraldehyde-3-P dehydrogenase* et *phosphoglycerate kinase*) ; ces variations étaient plus marquées en début de contrainte et après le réarrosage. De façon inattendue, la plupart des protéines dont l'abondance diminuait en réponse au déficit hydrique correspondaient à des *HSPs* et des chaperonnes. Chez *P. trichocarpa* × *P. deltoides* cv. 'Beaupré', une comparaison du protéome foliaire et racinaire a été réalisée en serre, entre plants maintenus à la capacité au champ et plants arrosés pendant 6 jours à 50% de la consommation des plants témoins (Plomion *et al.*, 2006). Au niveau foliaire, le déficit hydrique induisait une diminution d'abondance de nombreuses protéines ribosomales, de chaperonnes, de protéines impliquées dans le métabolisme des carbohydrates (*malate dehydrogenase*, *glucan endo-1,3-beta-glucosidase*, *enolase*, *2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase*, *alpha-1,4-glucan-protein synthase* et *triosephosphate isomerase*), d'*AdoMet synthetase*, d'*ATP-synthase* et

tubulin ; illustrant une déplétion des mécanismes biochimiques associés à la croissance des plantes. La contrainte menait toutefois, à l'accumulation d'une *bark storage protein* (impliquée dans la remobilisation de l'énergie) et de protéines impliquées dans la détoxification, dans la photosynthèse et dans la photorespiration (*[Cu-Zn] Superoxide dismutase*, *polyphenol oxidase*, *ferredoxin-NADP reductase*, deux *plastocyanins A* et *glutamine synthase*). Dans les racines, une augmentation d'abondance a été constatée pour une *leucoanthocyanidin reductase* (voie de biosynthèse des flavonoïdes) et pour des enzymes impliquées dans le métabolisme des protéines (*26S protease regulatory subunit 6A* et *aminopeptidase 2*). Chez *P. deltoïdes* × *P. nigra* cv. '74/76', une comparaison du protéome foliaire a été réalisée entre plants maintenus à la capacité au champ et plants soumis à un arrêt d'arrosage pendant 4 à 7 jours en serre, jusqu'à atteindre une très faible valeur de potentiel hydrique du sol de l'ordre de -5 MPa (He *et al.*, 2008). Le stress induisait une augmentation d'abondance de deux enzymes impliquées dans le stress oxydatif (*methionine sulfoxide reductase A* et *mitochondrial manganese superoxide dismutase*) et une protéine impliquée dans la photosynthèse (*Photosystem I reaction center subunit II precursor*). Les auteurs ont également observé l'accumulation de nombreuses formes dégradées de la RuBisCO.

Chez *P. euphratica* et cv. 'Beaupré', l'analyse des protéines régulées par la contrainte hydrique a été complétée par une étude du transcriptome. La plupart des transcrits ne présentait pas de corrélation évidente avec le niveau d'abondance des protéines (Plomion *et al.*, 2006 ; Bogeat-Triboulot *et al.*, 2007) ce qui confirme la complémentarité des approches transcriptomiques et protéomiques.

1.2. État des connaissances des bases moléculaires de l'efficacité d'utilisation de l'eau

L'existence d'importantes variations génétiques de l'efficacité d'utilisation de l'eau est à présent bien établie chez les peupliers mais également chez de nombreuses autres espèces, *e.g.* chez l'arabette (Nienhuis *et al.*, 1994), l'arachide (Hubick *et al.*, 1988 ; Wright *et al.*, 1994), l'orge (Hubick et Farquhar, 1989), la betterave (Monti *et al.*, 2006), le coton (Quisenberry et McMichael, 1991), le blé (Condon *et al.* 1990 ; Ehdaie et Waines, 1993 ; Van den Boogaard *et al.*, 1997 ; Fischer *et al.* 1998), la dolique de Chine (Ismail et Hall, 1993 ; Ashok *et al.*, 1999), le soja (Mian *et al.*, 1996, 1998), la tomate (Xu *et al.*, 2008), le pin (Guelh *et al.*, 1995 ; Brendel *et al.*, 2002), le chêne (Ponton *et al.* 2001) et le châtaignier (Lauteri *et al.*, 1997). En dépit de ces nombreuses descriptions, les bases moléculaires de l'efficacité d'utilisation de l'eau demeurent encore aujourd'hui très peu documentées.

1.2.1. Recherche de « gènes candidats » de l'efficacité d'utilisation de l'eau

Avec le développement de la génomique, de nombreux auteurs se sont interrogés sur la nature, le nombre et la localisation de gènes impliqués dans les variations génétiques de l'efficacité d'utilisation de l'eau ou de tout autre caractère associé (Bacon, 2004). La recherche de gènes a été essentiellement abordée par la cartographie de loci à effet quantitatif (QTLs), basée sur des associations statistiques significatives entre marqueurs moléculaires et variations de caractères quantitatifs.

En 1988, Martin et Thorstenson ont mené une des premières approches des bases génétiques de l'efficacité d'utilisation de l'eau. Cette expérience, menée chez la tomate, a consisté à croiser une variété présentant une faible efficacité d'utilisation de l'eau (*Lycopersicon esculentum* L.) avec un parent sauvage présentant une forte efficacité (*Lycopersicon pennellii* L.), estimée par des mesures instantanées (WUE_{inst}) et indirectement *via* Δ . Les hybrides ainsi obtenus disposaient d'une efficacité d'utilisation de l'eau intermédiaire. Les différences de Δ des lignées parentales et des hybrides F1 ont ensuite été associées à trois marqueurs RFLPs (Martin *et al.*, 1989). Alors qu'initialement, l'efficacité d'utilisation de l'eau était supposée être influencée par tous les gènes capables de moduler les caractéristiques biochimiques et morpho-physiologiques de la balance carbone / eau, cette première observation suggérait que le

contrôle des variations génétiques de Δ pouvait être limité à quelques régions génomiques.

Dans la continuité de ces résultats prometteurs, de nombreux QTLs associés à l'efficacité d'utilisation de l'eau (évaluée à l'échelle de la plante entière, par des mesures instantanées ou estimée *via* Δ), ont été identifiés chez différentes espèces ; *e.g.*, chez *Arabidopsis thaliana* (Masle *et al.*, 2005 ; Juenger *et al.*, 2005), *Brassica oleracea* (Hall *et al.*, 2005), *Glycine max* (Mian *et al.*, 1996 et 1998), *Hordeum vulgare* (Handley *et al.*, 1994 ; Teulat *et al.*, 2002), *Oryza sativa* (Price *et al.*, 2002), *Solanum pennellii* (Xu *et al.*, 2008), *Stylosanthes scabra* (Thumma *et al.*, 2001), *Triticum aestivum* (Mohammady *et al.*, 2005 ; Rebetzke *et al.*, 2008), *Castanea sativa* (Casasoli *et al.*, 2004), *Quercus petraea* et *Q. robur* (Casasoli *et al.*, 2006 ; Brendel *et al.*, 2008) et *Pinus pinaster* (Brendel *et al.*, 2002). Certaines régions génomiques étaient liées à la fois à Δ et aux mesures d'efficacité d'utilisation de l'eau évaluées à l'échelle de la plante entière (Thumma *et al.*, 2001 ; Hall *et al.*, 2005), suggérant alors que ces deux caractères pouvaient dépendre d'un contrôle génétique similaire. Hervé *et al.* (2001) ont également rapporté une co-localisation des QTLs associés à la photosynthèse et à la transpiration. Par ailleurs, compte tenu du rôle central de la conductance stomatique dans le contrôle de W_i , l'identification de QTLs associés à ce trait (Lebreton *et al.*, 1995 ; Price *et al.*, 1997, 2002 ; Ulloa *et al.*, 2000) constitue également une cible intéressante pour la compréhension des mécanismes moléculaires influençant l'efficacité d'utilisation de l'eau. De nombreux QTLs ont également été associés aux variations des concentrations en ABA des feuilles (Tuberosa *et al.*, 1998) connues pour moduler le degré d'ouverture des stomates (Tardieu *et al.*, 1992, 1993). Toutefois, ces approches demeurent limitées par les grands intervalles de confiance autour de la localisation du QTL, pouvant inclure des dizaines voire plusieurs centaines de gènes candidats différents (Flint et Mott, 2001, Christians et Keightley, 2002, Masle *et al.*, 2005).

Récemment, le développement d'études d'association a ouvert de nouvelles perspectives pour la compréhension des relations entre polymorphismes identifiés au sein de gènes candidats et variation phénotypique dans des populations naturelles (Gupta *et al.*, 2005; Hirschhorn et Daly, 2005; Laird et Lange, 2006, Neale et Savolainen, 2004). Bien que les applications demeurent encore marginales chez les plantes, une

étude récente a été menée chez *Pinus taeda* afin de juger du degré d'association génétique de 46 SNPs (single nucleotide polymorphism) avec Δ (González-Martínez et al., 2008). Ces 46 SNPs ont été sélectionnés à partir de 41 gènes de réponse aux stress abiotiques et aux agents pathogènes (Brown et al., 2004 ; González-Martínez et al., 2006). En analysant 961 génotypes appartenant à 61 familles, les auteurs ont montré 2 gènes candidats associés à Δ . Le premier correspondait à une déhydrine, *dhn1*, impliquée potentiellement dans la stabilisation des structures cellulaires et le second correspondait à *lp5-like*, une protéine pariétale présentant une forte homologie avec une *glycine-rich protein* chez *A. thaliana* (Chang et al., 1996).

D'autres approches moléculaires ont été menées afin de déterminer les différences entre génotypes présentant des WUE contrastées. En utilisant des techniques de criblage différentiel et de criblage de banque d'ADNc, Zhu et al. (1998) ont isolé chez la tomate, 4 ADNc spécifiques d'un génotype présentant une forte WUE. Un de ces ADNc présentait une forte homologie avec un gène codant une *RuBisCO activase* chez le tabac. Bien que ces résultats n'aient jamais été confirmés, cette enzyme constituait une cible intéressante pour l'optimisation de WUE. En favorisant la carboxylation du ribulose-1,5- biphosphate par la RuBisCO et en réduisant la résistance mésophyllienne, l'augmentation de son activité pourrait donc suggérer une amélioration potentielle de W_i (Eichelmann et Laisk, 1999).

Une analyse microarray chez le blé, menée à partir de 16 000 EST, a révélé 93 gènes différenciellement exprimés entre des lignées se distinguant par leur WUE, estimée via Δ (Xue et al., 2006). Ces gènes étaient essentiellement impliqués dans les processus de régulation et de signalisation (*e.g.*, facteur de transcription AP2, protéines kinase, régulateurs du cycle cellulaire), dans le transport (*e.g.*, cytochromes), dans le métabolisme des carbohydrates et des protéines, ou dans les réponses aux stress biotiques et abiotiques (*e.g.*, *PR proteins*, protéines de réponse au déficit hydrique). Cette étude a été complétée par une analyse utilisant la technique RT-PCR quantitative à partir de 18 gènes sélectionnés pour leur haut niveau d'expression différentielle, pour leur rôle potentiel dans la régulation de gènes ou dans les processus liés à la respiration ou à la croissance. L'analyse des corrélations entre l'abondance des ARNm et les valeurs de Δ de 12 individus a permis de montrer dix corrélations négatives, suggérant

une relation positive avec W_i pour des gènes impliqués dans la croissance, dans les réponses aux stress biotiques/abiotiques (modulants la conductance stomatique) et dans les chaînes de transport d'électrons (*e.g.*, *receptor-like kinase*, *chromosome condensation factor*, *anaphase promoting complex subunit 10*, *ubiquinol cytochrome c reductase iron-sulfur subunit 10*, *chitinase* et *pathogenesis-related proteins*). Un seul gène (*caffeoyl-CoA O-methyltransferase 1*) s'est avéré corrélé positivement avec Δ . Une étude antérieure a par ailleurs, démontré que le niveau d'expression de cette enzyme impliquée dans la biosynthèse des lignines, était corrélé négativement avec la croissance (Kirst *et al.*, 2004).

1.2.2. Validation de « gènes candidats »

Peu de gènes ont actuellement été étudiés pour leur relation avec l'efficacité d'utilisation de l'eau. Toutefois, de nombreuses transformations génétiques conduites initialement pour évaluer le rôle de gènes dans la tolérance à la sécheresse, ont permis de moduler soit WUE (à l'échelle de la plante entière), WUE_{inst} , W_i ou Δ . Dans les paragraphes suivants, nous distinguerons les gènes dits « fonctionnels » responsables de modifications phénotypiques au niveau biochimique, physiologique et/ou morphologique, des gènes dits « de régulation » qui contrôlent d'autres gènes (*e.g.* protéines impliquées dans la transduction du signal, facteurs de transcription) (Umezawa *et al.*, 2006).

1.2.2.1. Gènes fonctionnels

Puisque les plantes de type C_4 présentent de plus fortes WUE que les plantes de type C_3 , de nombreux travaux ont consisté à sur-exprimer des enzymes spécifiques de la voie des C_4 dans les feuilles de plantes de type C_3 (Miyao *et al.*, 2003 ; Hausler *et al.*, 2002 ; Ku *et al.*, 1996, 1999 ; Matsuoka *et al.*, 2001 ; Jeanneau *et al.*, 2002b). Toutefois, la transformation génétique d'une seule enzyme, bien que pouvant moduler le métabolisme du carbone, n'apparaît pas suffisante pour des résultats significatifs sur la photosynthèse ; il est probablement nécessaire de transférer de nombreux gènes pour améliorer les rendements photosynthétiques.

Les transformations génétiques influençant la conductance stomatique ont montré des modifications significatives de W_i . Klein *et al.* (2003) ont constaté une diminution de la transpiration chez des mutants du transporteur AtMRP5 (*mrp5-1*) d'*A. thaliana*. Bien que rendues insensibles à l'ABA et au calcium, les feuilles des plants *mrp5-1* présentaient des pertes en eau réduites, une plus forte W_i , et une résistance accrue aux expériences d'arrêt d'arrosage. Deux lignées de tomate (*Solanum lycopersicum*) ont également été transformées pour induire une sur-expression de 9-cis-epoxycarotenoid dioxygénase, une enzyme clé de la biosynthèse d'ABA (Thompson *et al.*, 2007). Présentant des concentrations en ABA plus élevées, les deux mutants montraient une W_i plus importante et de plus faibles conductances stomatiques comparées aux plants sauvages. Les mutants présentaient de meilleures capacités à préserver l'eau disponible dans le sol et développaient un feuillage mieux adapté à l'interception de la lumière, probablement dû à une turgescence plus importante ou à une régulation de l'épinastie. À l'échelle de la plante entière, une augmentation de près de 20% de WUE, a été constaté chez *Triticum aestivum* en sur-exprimant HVA1, un gène de réponse à l'ABA, membre du groupe 3 des LEA (Late Embryogenesis Abundant) (Sivamani *et al.*, 2000). Lal *et al.* (2008), en réitérant cette transformation chez le mûrier (*Morus indica*), ont corroboré ces résultats en montrant une diminution significative de Δ .

Une autre approche, initialement dirigée pour améliorer la tolérance à la sécheresse, s'est focalisée sur la concentration en malate des cellules de garde, en modulant une enzyme malique (*NADP-malic enzyme*, ME ; Laporte *et al.*, 2002). L'accumulation de potassium, de chlore et/ou de malate pendant l'ouverture des stomates augmente la pression de turgescence des cellules de garde, optimisant ainsi la conductance stomatique. Chez *Nicotiana tabacum*, la sur-expression de ME, qui transforme le malate et le NADP en pyruvate, NADPH et CO₂, altérerait les fonctions stomatiques. Les plants transformés, bien que ne différant pas par leur croissance, présentaient de plus faibles conductances stomatiques et des WUE améliorées.

Une catégorie importante de gènes fonctionnels, pouvant affecter le statut hydrique de la plante, est représentée par les aquaporines qui régulent les flux d'eau au travers des membranes plasmiques (Maurel et Chrispeels, 2001 ; Tyerman *et al.*, 2002 ; Luu et Maurel, 2005). Toutefois, peu d'informations sont disponibles sur leur rôle

éventuel dans la régulation de l'efficacité d'utilisation de l'eau. [Siefritz et al. \(2002\)](#) ont démontré que la conductivité hydraulique des racines diminuait lorsque l'expression de l'aquaporine NtAQP1 était réduite. En conséquence, une chute de la transpiration était observée sans pour autant améliorer le rapport biomasse produite / eau consommée. Au niveau des feuilles, la sur-expression d'une aquaporine d'orge (HvPIP2;1) chez le riz a montré une augmentation de 40% de la conductance interne au CO₂ et une amélioration de 14% de son assimilation ([Hanba et al., 2004](#)). [Miyazawa et al. \(2008\)](#), ont décrit une observation contradictoire où la conductance au CO₂ du mésophylle chutait avec l'augmentation des abondances en PIP2. L'impact de la régulation de ces protéines sur WUE reste donc à déterminer.

Des études récentes ont également démontré l'importance de la cutine et de la cire cuticulaire sur les modulations de WUE ([Karaba, 2007](#)). Chez *A. thaliana*, les gènes CER1, CER6 et WAX2 sont impliqués dans les voies de biosynthèse de la cire. CER1 encode l'enzyme aldéhyde decarboxylase ([Aarts et al., 1995](#)) qui catalyse la conversion des aldéhydes en alcanes, CER6 encode une élongase ([Millar et al., 1999](#)) impliquée dans l'élongation des chaînes *acyl* de plus de 24 carbones ([Millar et al., 1999](#) ; [Fiebig et al., 2000](#)) et WAX2 joue un rôle dans le dépôt de la cutine et de la cire cuticulaire. Une sur-expression des gènes CER1 et CER6 chez la tomate a permis d'améliorer WUE à l'échelle de la plante entière en condition hydrique limitante ou non ([Karaba, 2007](#)). En condition hydrique non limitante, les lignées transformées présentaient également une meilleure WUE_{inst} par rapport aux plants sauvages ; une amélioration essentiellement liée à une forte diminution de la transpiration. Chez le riz, la surexpression de CER6 a également contribué à améliorer WUE chez des lignées transformées, de l'ordre de 20 à 30% en condition hydrique limitante et d'environ 14% en condition hydrique non limitante. Ces résultats étaient également corroborés par une augmentation de WUE_{inst}, liée dans ce cas à une assimilation nette de carbone plus importante ([Karaba, 2007](#)). La sur-expression du gène WAX2 a également contribué à l'augmentation de WUE chez la tomate. Dans ce cas, les feuilles des lignées transformées présentaient une augmentation de nombreux monomères constituant la cutine. Cette observation confirme le rôle de WAX2 dans la biosynthèse de la cutine et suggère que l'augmentation de WUE observée

pourrait résulter d'une diminution de la perméabilité à l'eau de la cuticule et ainsi diminuer les pertes en eau non stomatiques (Karaba, 2007).

1.2.2.2. Gènes de régulation

Un des résultats majeurs dans l'amélioration de l'efficacité d'utilisation de l'eau est la transformation du gène *ERECTA* chez *A. thaliana*. Ce gène encode une putative *leucine-rich repeat receptor-like kinase* (LRR-RLK) (Masle *et al.*, 2005). *ERECTA* s'est avéré être impliqué dans les mécanismes affectant la densité de stomates, l'expansion des cellules épidermiques, la prolifération des cellules mésophylliennes et les contacts cellulaires. Le gène *ERECTA* permettait d'améliorer significativement WUE_{inst} et de réduire Δ des plants transformés.

Le gène *HARDY*, un facteur de transcription *AP2/ERF-like* identifié chez *A. thaliana*, a également montré un rôle dans la modulation de l'efficacité d'utilisation de l'eau (Karaba *et al.*, 2007). Sa sur-expression chez *A. thaliana*, a induit des feuilles plus épaisses avec des cellules mésophylliennes plus riches en chloroplastes. Chez le riz, sa sur-expression améliore la biomasse produite, augmente l'assimilation des plants et réduit leur transpiration (Karaba *et al.*, 2007). D'autres facteurs de transcription *AP2/ERF-like* appartenant au clade SHINE (*i.e.*, SHN1 et SHN2) ont également montré des résultats prometteurs dans la modulation de WUE . SHN1 participe à la régulation de la biosynthèse de la cire cuticulaire (Aharoni *et al.*, 2004) en contrôlant l'expression du gène *KCS1* (élongase) et *CER1* (Broun *et al.*, 2004). Chez la tomate, la surexpression de SHN1 améliorait WUE à l'échelle de la plante entière en condition hydrique limitante ou non (Karaba, 2007). Des mesures instantanées ont également démontré une diminution de la transpiration et une augmentation de la photosynthèse nette. Les auteurs ont suggéré que les lignées transformées présentaient une plus grande capacité à fixer le CO_2 par unité de lumière absorbée en comparaison avec les plants sauvages. Chez le riz, la surexpression de SHN2 contribuait également à améliorer WUE chez des lignées transformées, de l'ordre de 29 à 49% en condition hydrique limitante et de 26 à 39% en condition hydrique non limitante en comparaison avec les plants sauvages (Karaba, 2007). Cette amélioration était attribuée à une réduction de l'eau consommée (8 à 19% en condition hydrique non limitante et 12 à 18% en condition hydrique limitante) et à une augmentation de la production de biomasse (13 à 25% en condition

hydrique non limitante et 10 à 25% en condition hydrique limitante). Similairement, une augmentation de WUE_{inst} était constatée.

Une étude a également été menée sur le rôle du facteur de transcription DREB1A (Bhatnagar-Mathur *et al.*, 2007). Ce facteur de transcription induit l'expression de gènes de réponse au déficit hydrique tel que rd29A (Stockinger *et al.*, 1997; Shen *et al.*, 1997). Les résultats ont montré que son expression dans des plants transformés d'arachide n'induisait aucune altération phénotypique visible mais qu'il permettait d'augmenter WUE en condition hydrique non limitante et de diminuer la conductance stomatique. En condition hydrique limitante, le gain de WUE atteignait jusqu'à 40% en comparaison avec les plants non transformés.

Une étude récente a porté sur le gène ESKIMO1 (Bouchabke-Coussa *et al.*, 2008) impliqué dans la tolérance au gel (Xin et Browse, 1998). En sur-exprimant ce gène chez *A. thaliana*, les plants transformés bénéficiaient d'une augmentation de près de 40% de W_i , liée à une augmentation de l'assimilation nette de CO_2 et à une diminution de la conductance stomatique. Les auteurs ont également observé une diminution significative de Δ en condition témoin comme lors d'un déficit hydrique. Une analyse transcriptomique a montré que ESKIMO1, modulait jusqu'à 985 gènes en condition témoin ; il est alors difficile de déterminer son rôle exact.

2. Stratégie

L'efficacité d'utilisation de l'eau est un caractère complexe gouverné par de nombreux gènes. Actuellement, notre connaissance des mécanismes qui contribuent à ce caractère est incomplète. Le développement de travaux sur la compréhension des mécanismes moléculaires et physiologiques sous-jacents est essentiel pour développer des technologies d'amélioration de l'efficacité d'utilisation de l'eau. L'analyse des quantités de protéines et de leur activité devraient permettre à terme, de mieux comprendre les processus biologiques impliqués dans l'efficacité d'utilisation de l'eau et fournir des candidats intéressants pour la sélection assistée par marqueurs. Compte tenu qu'à notre connaissance, aucune étude protéomique n'a traité des variations génétiques de ce caractère, il est intéressant d'initier un travail visant à juger des liens entre profils protéiques et variations génotypiques de l'efficacité d'utilisation de l'eau. Toutefois, si à terme nous voulons déterminer des marqueurs protéiques distinguant des génotypes efficaces de génotypes non efficaces pour l'utilisation de l'eau, nous devons nous assurer tout d'abord que ces variations constituent des marqueurs constants permettant de caractériser et de cataloguer les différents génotypes.

En outre, la capacité d'un génotype à modifier son protéome en réponse à une variation de disponibilité en eau du sol est à présent bien établie chez les plantes de grande culture comme chez les essences forestières. Par analogie à la plasticité phénotypique, cette capacité est définie comme la plasticité moléculaire en réponse à une variation de l'environnement. Comme en témoigne le degré non négligeable de variations génétiques dans la réponse aux déficits hydriques observés chez les plantes de grande culture, une part de cette plasticité moléculaire est contrôlée génétiquement. Compte tenu que peu d'informations sont disponibles à ce sujet chez les essences forestières, il apparaît donc intéressant de juger du contrôle génétique de cette plasticité moléculaire chez des génotypes d'une même espèce, contrastés pour leur efficacité d'utilisation de l'eau. C'est dans ce cadre que nous pensons avoir le plus d'opportunités d'identifier des protéines contribuant aux différentes stratégies de réponses moléculaires qui pourraient être conférées par les variations génétiques d'efficacité d'utilisation de l'eau.



Figure Prot1. Dispositif expérimental comprenant les huit génotypes *P. ×euramericana* contrastés pour Δ , étudiés dans cette thèse. Dispositif réalisé à la pépinière de l'INRA d'Orléans, comprenant deux parcelles jumelles, l'une irriguée tous les deux jours (A) et la seconde soumise à un arrêt d'arrosage lors de la saison de végétation (B) (Monclus *et al.*, 2006). Photos R. Monclus.



Figure Prot2. Dispositif expérimental comprenant les deux génotypes *P. ×euramericana* cv. 'Agathe_F' et 'Cima'. Dispositif réalisé en serre à l'INRA d'Orléans, comprenant deux lots randomisés, l'un irrigué tous les deux jours à la capacité au champ et le second soumis à un arrosage différentiel par un apport de 25% de la consommation en eau des plants tous les 2 jours (A). (B) : mesure d'échange de gaz. Photo L. Bonhomme.

De façon à apporter des éléments de réponse à notre objectif, il convenait :

1. de valider l'existence de variations génétiques des protéomes foliaires chez deux génotypes de peupliers contrastés pour leur efficacité d'utilisation de l'eau et de s'assurer de la stabilité de ces variations génétiques dans le temps et dans différents environnements.
2. d'évaluer le contrôle génétique de la plasticité moléculaire en réponse à la sécheresse.
3. de juger des liens entre les variations génétiques d'abondance des protéines foliaires et les variations génétiques de la discrimination isotopique vis-à-vis du ^{13}C chez plusieurs génotypes de peuplier.

Afin de répondre à ces trois points, nous avons sélectionné huit génotypes contrastés pour leur discrimination isotopique vis-à-vis du ^{13}C (Δ) sur la base des travaux de [Monclus *et al.* \(2005\)](#). Ces huit génotypes ont été cultivés dans une première expérience menée en pépinière. Le dispositif expérimental comprenait deux parcelles jumelles espacées de 15 mètres (Figure Prot1 ; [Monclus *et al.*, 2006](#)). Les deux parcelles ont été installées en 2001, et régulièrement irriguées les deux premières années de croissance (2001 et 2002), puis une des deux parcelles a cessé d'être irriguée les deux années suivantes (2003 et 2004). En 2004, nous avons prélevé des feuilles de plants irrigués en milieu et en fin de saison de végétation, et des feuilles de plants non irrigués en fin de saison de végétation uniquement. En 2006, une seconde expérience a été établie en serre à partir de deux génotypes contrastés pour leur Δ , choisis parmi les huit précédents pour leur niveau de productivité équivalent (cv. 'Agathe_F' et 'Cima' ; Figure Prot2). Le dispositif expérimental comprenait des plants maintenus à la capacité au champ et des plants recevant tous les deux jours, 25% de leur consommation en eau. Après 18 jours d'arrosage différentiel, les plants ont été réarrosés pendant 10 jours. Des feuilles ont été collectées en fin de période de déficit hydrique puis après réarrosage. L'analyse protéomique par électrophorèse bidimensionnelle de tissus foliaires de peuplier a été développée pour la première fois au sein de notre équipe, dans le cadre de

cette thèse. Notre travail a donc consisté dans un premier temps à standardiser une méthode résolutive et reproductible de séparation des protéines foliaires de peuplier. Cette procédure fut établie sur la base du protocole de l'INRA de Pierroton, décrit par [Pionneau *et al.* \(1998\)](#).

Nous avons tout d'abord évalué le degré de variation génétique des protéomes foliaires de deux génotypes de peupliers cultivés dans des conditions très contrastées (serre / pépinière, irrigués / non irrigués / réarrosés). Ainsi, nous avons jugé de la stabilité des différences génotypiques de l'abondance des protéines foliaires au travers de quatre comparaisons, réalisée à partir de deux dates de prélèvement en serre et deux autres en pépinière. Nous avons également évalué comment la plasticité des protéomes foliaires de ces deux génotypes se distinguait dans la réponse à des contraintes de mêmes intensités mais de durées différentes.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux protéomes foliaires de l'ensemble des huit génotypes contrastés pour Δ . D'une part, nous avons focalisé notre analyse sur le contrôle génétique de leur plasticité moléculaire dans la réponse à la sécheresse, *i.e.* comment ces génotypes se distinguent dans la régulation de leur contenu en protéines en réponse à une variation de l'environnement. Cet aspect a été abordé à partir de l'effet de l'interaction entre les facteurs 'génotypes' et 'traitements', d'un modèle d'ANOVA à deux facteurs croisés. D'autre part, nous avons également jugé des corrélations entre abondance des protéines et variation génétique de Δ en condition témoin et lorsque les plants ont été soumis à une sécheresse modérée.

Publication II

Variation génétique et réponse à la sécheresse du protéome foliaire de deux génotypes *Populus ×euramericana* cultivés dans des conditions expérimentales contrastées

Variation génétique et réponse à la sécheresse du protéome foliaire de deux génotypes *Populus ×euramericana* cultivés en pépinière et en serre

Auteurs

Ludovic Bonhomme, Romain Monclus, Delphine Vincent, Sabine Carpin, Stéphane Claverol, Anne-Marie Lomenech, Valérie Labas, Christophe Plomion, Franck Brignolas et Domenico Morabito

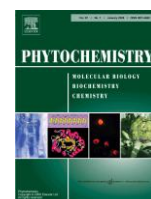
Manuscrit soumis à *Phytochemistry*

Résumé

Les différences génotypiques et les effets de déficits hydriques sur l'abondance des protéines foliaires de deux hybrides *Populus deltoides* × *P. nigra*, cv. 'Agathe_F' et 'Cima', ont été analysés en serre à partir de boutures de quatre mois et en pépinière à partir de plançons de quatre ans. En serre, un déficit hydrique a été simulé sur une période de 18 jours alors qu'en pépinière, un arrêt d'arrosage a été mené sur une période de 86 jours. Les protéomes foliaires ont été réalisés par électrophorèse bidimensionnelle et les protéines d'intérêts ont été identifiées par spectrométrie de masse.

Des variations génétiques du protéome foliaire ont été observées indépendamment du lieu d'expérimentation, du régime hydrique et de la date de collecte des feuilles. Ces différences systématiques reposaient principalement sur des variations d'abondance d'isoformes. 'Cima' se distinguait néanmoins, par de plus fortes abondances d'enzymes impliquées dans la protection contre le stress oxydatif.

Environ 10 % des spots reproductibles variaient en réponse aux déficits hydriques menés en serre et en pépinière, parmi lesquels près du quart présentait des variations dépendantes du génotype. Alors que 'Cima' se distinguait principalement de 'Agathe_F' par une augmentation d'abondance de protéines impliquées dans la photorespiration et dans le stress oxydatif, 'Agathe_F' contrastait par de plus importantes augmentations d'abondance d'enzymes participant à la photosynthèse.



Elsevier Editorial System(tm) for Phytochemistry

Manuscript Number: PHYTOCHEM-S-09-00056

Title: Genetic variation and drought response in two *Populus × euramericana* genotypes through 2-DE proteomic analysis of leaves from field and glasshouse cultivated plants

Article Type: Full Length Article

Section/Category: Molecular Genetics and Genomics

Keywords: Poplar; Proteomics; Two-dimensional electrophoresis; Genetic variation; Drought stress; Glasshouse; Open field.

Corresponding Author: Dr Domenico Morabito,

Corresponding Author's Institution:

First Author: Ludovic Bonhomme

Order of Authors: Ludovic Bonhomme; Romain Monclus; Delphine Vincent; Sabine Carpin; Stéphane Claverol; Anne-Marie Lomenech; Valérie Labas; Christophe Plomion; Franck Brignolas; Domenico Morabito

Manuscrit accepté le 21 mai 2009

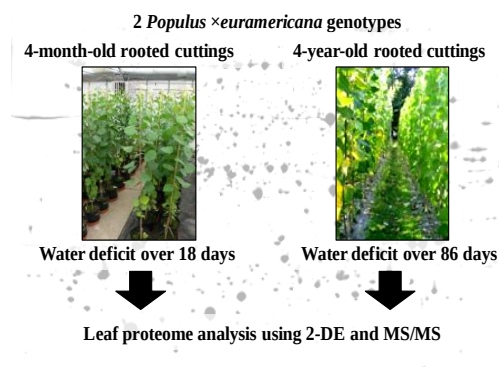
1 **Graphical abstract**

2

Genetic variation and drought response in two *Populus × euramericana* genotypes through 2-DE proteomic analysis of leaves from field and glasshouse cultivated plants

Ludovic Bonhomme, Romain Monclus, Delphine Vincent, Sabine Carpin, Stéphane Claverol, Anne-Marie Lomenech, Valérie Labas, Christophe Plomion, Franck Brignolas, Domenico Morabito

Genetic and water deficit effects were analysed from the leaf proteome of two *Populus deltoides* × *P. nigra*, grown in glasshouse and in open field.



Genetic variation and drought response in two *Populus × euramericana* genotypes through 2-DE proteomic analysis of leaves from field and glasshouse cultivated plants

Ludovic Bonhomme^{a,b}, Romain Monclus^{a,b,c1}, Delphine Vincent^d, Sabine Carpin^{a,b}, Stéphane Claverol^e, Anne-Marie Lomenech^e, Valérie Labas^f, Christophe Plomion^d, Franck Brignolas^{a,b}, Domenico Morabito^{a,b,*}

^a Université d'Orléans, UFR-Faculté des Sciences, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207, rue de Chartres, BP 6759, 45067 Orléans Cedex 02, France

^b INRA, USC2030 'Arbres et Réponses aux Contraintes Hydrique et Environnementales' (ARCHE), F-45067 Orléans Cedex 02, France

^c INRA, Nancy Université, UMR1137 INRA-UHP 'Ecologie et Ecophysiologie Forestières', IFR 110 'Génomique, Ecophysiologie et Ecologie Fonctionnelle', INRA Nancy, F-54280 Champenoux, France

^d INRA, UMR1202 BIOGECO, Equipe de Génétique, 69 route d'Arcachon, F-33612 Cestas, France

^e Pôle Protéomique de la Plateforme Génomique Fonctionnelle Bordeaux, Université de Bordeaux 2, F-33076 Bordeaux, France

^f INRA, Plate-forme de Protéomique Analytique et Fonctionnelle, Laboratoire de Spectrométrie de Masse, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France; CNRS, UMR6175, F-37380 Nouzilly, France; Université de Tours, F-37041 Tours, France; Haras Nationaux, F-37380 Nouzilly, France

¹ *in memoriam* (September 2006)

* *Corresponding author:*

28 Tel.: +33 (0) 2 38 41 72 35; fax: +33 (0) 2 38 49 40 89.

29 *E-mail address: domenico.morabito@univ-orleans.fr*

30

Abstract

Genotype and water deficit effects on leaf 2-DE protein profiles of two *Populus deltoides* × *P. nigra*, cv. ‘Agathe_F’ and ‘Cima’, were analysed over a short-term period of 18 days in glasshouse using 4-month-old rooted cuttings and over a long-lasting period of 86 days in open field using 4-year-old rooted cuttings. Leaf proteomes were analyzed using two-dimensional gel electrophoresis, and proteins were identified after database searching from MS peptide spectra.

A reliable genotype effect was observed in the leaf proteome over experiment locations, water regimes and sampling dates. Quantitative differences between genotypes were found. Most of them corresponded to proteins matching isoforms or post-translational modification variants. However, ‘Cima’ displayed the highest abundance of antioxidant enzymes.

In response to water deficit, about 10% of the reproducible spots significantly varied regardless of the experiment location, among which about 25% also displayed genotype-dependent variations. As a whole, while ‘Cima’ differed from ‘Agathe_F’ by increased abundance of enzymes involved in photorespiration and in oxidative stress, ‘Agathe_F’ was mainly differentiated by increased abundance of enzymes involved in photosynthesis.

Keywords:

Poplar; Proteomics; Two-dimensional electrophoresis; Genetic variation; Drought stress; Glasshouse; Open field

54 **Abbreviations**

55 2-DE, two-dimensionnal electrophoresis; Δ , leaf carbon isotope discrimination; Ψ_{wp} , predawn
56 leaf water potential; aBiom, fresh aboveground biomass; C_M , carbon content per mass unit;
57 D18, 18th day since the beginning of the glasshouse experiment; D28, 28th day since the
58 beginning of the glasshouse experiment; D50, 50th day since the beginning of the open field
59 experiment; D86, 86th day since the beginning of the open field experiment; LLMD, long-
60 lasting moderate drought; N_M , nitrogen content per mass unit; SLA, specific leaf area; STMD,
61 short-term moderate drought; TLA, total leaf area; W_i , intrinsic water-use efficiency; WUE,
62 water-use efficiency.

Table 1. Leaf predawn water potential (Ψ_{wp} , MPa) measured in glasshouse and in open field. In glasshouse, Ψ_{wp} was measured from ‘Agathe_F’ and ‘Cima’ from well-watered (WW; $n = 3$), water deficit (WD; $n = 3$) and re-watered (RW; $n = 3$) plants at day 18 (D18) and day 28 (D28). In the open field, Ψ_{wp} was estimated, at day 50 (D50) and day 86 (D86) from the whole well-watered plot (WW; $n = 20$) and the whole water deficit plot (WD; $n = 20$) as described by Monclus et al. (2006). Means $\pm$ standard errors are presented and significance of the treatment effect is indicated (ns = non significant; *** = $P \leq 0.001$).

	Glasshouse				Open field (Monclus et al. 2006)		
	D18		D28		D50	D86	
	WW	WD	WW	RW	WW	WW	WD
‘Agathe_F’	0 (± 0)	-0.44 (± 0.04)***	0 (± 0)	0 (± 0)ns	-0.11 (± 0.01)	-0.17 (± 0.02)	-0.48 (± 0.01)***
‘Cima’	-0.07 (± 0.04)	-0.48 (± 0.04)***	0 (± 0)	0 (± 0)ns			

1. Introduction

Significant genetic variation in productivity and in leaf-ecophysiological variables has been reported for *Populus deltoides* Bartr. ex Marsh. $\times$ *Populus nigra* L. (*P. × euramericana*) hybrids (Marron et al., 2005, 2007; Monclus et al., 2005; Al Afas et al., 2006, 2007; Voltas et al., 2006; Bonhomme et al., 2008). Leaf-ecophysiological variables encompassed: (i) structural variables such as specific leaf area (SLA), stomatal density, leaf nitrogen and carbon contents, and (ii) functional variables such as water-use efficiency (WUE) directly estimated from gas exchange (intrinsic water-use efficiency, W_i) or indirectly from leaf carbon isotope discrimination (Δ). In addition, although poplars are among the woody species the most susceptible to drought stress (Tschaplinski et al., 1994; Dreyer et al., 2004), *P. × euramericana* genotypes also displayed significant genetic variations in their drought tolerance level and in their pattern of responses to water deficit (Brignolas et al., 2000; Marron et al., 2002, 2003; Monclus et al., 2006).

Proteomic studies have already proven their value to assess genetic variation in various plant species (Thiellement et al., 1999, 2002; Cánovas et al., 2004; Agrawal et al., 2005; Vincent et al., 2007). However, although the sequenced genome of *Populus trichocarpa* had provided considerable key genomic resources for protein identification (Tuskan et al., 2006), little information was reported in poplars. Poplar proteomics have been carried out to study the molecular plasticity of a particular genotype in response to drought (Pelah et al., 1995; Plomion et al., 2006; Bogeat-Triboulot et al., 2007; He et al., 2008) or to other abiotic stresses such as heat, cold or heavy metals (Renaut et al., 2004; Ferreira et al., 2006; Bohler et al., 2007; He et al., 2008; Kieffer et al., 2008). To our knowledge, no study has dealt neither with the genotypic variations of poplar leaf proteomes, nor with the genotypic variations of their plasticity in response to drought. The occurrence of genetic variations in expressed protein content could be of considerable advantage for marker-assisted selection. Indeed, the

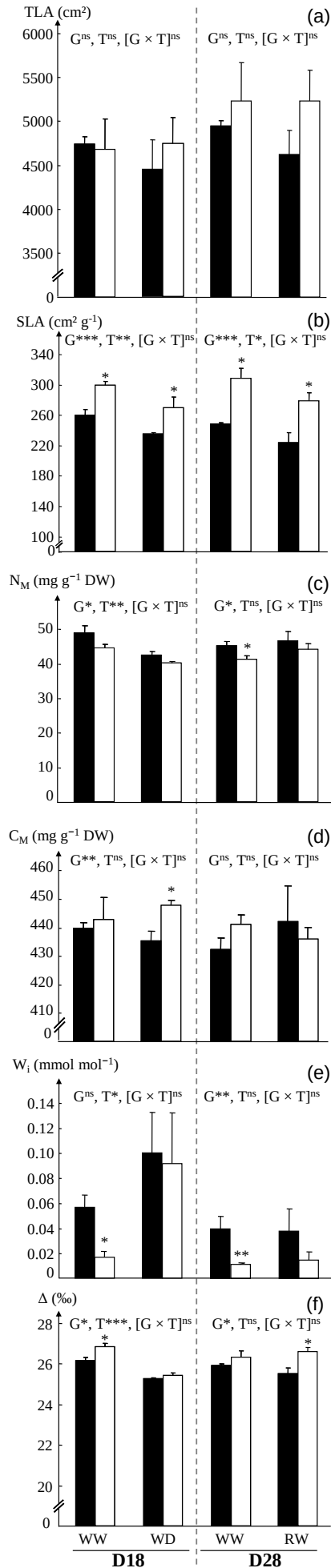


Figure 1. Productivity and leaf traits of 2 *Populus deltoides* × *P. nigra* hybrids cultivated in glasshouse. Total leaf area (a; TLA, cm²), specific leaf area (b; SLA, cm² g⁻¹), nitrogen and carbon content (c and d; N_M and C_M, mg g⁻¹ DW), intrinsic water-use efficiency (e; W_i, mmol mol⁻¹) and carbon isotope discrimination (f; Δ, ‰) were presented for 'Agathe_F' (black bars) and 'Cima' (white bars). Means ± standard errors were presented for well watered plants (WW; n = 3), for water deficit plants (WD; n = 3) and for re-watered plants (RW; n = 3) from values measured after 18 days of water deficit (D18) and after a 10-day re-watering period (D28). Levels of significance are indicated for the genotype effect (G), for the treatment effect (T) and for the genotype by treatment interaction (G × T). One-way ANOVA for genotype comparison is indicated on the top of the bars when significant (ns = non significant; * = P ≤ 0.05; ** = P ≤ 0.01; *** = P ≤ 0.001).

identification of molecular markers related to important traits such as WUE or drought tolerance could be useful for the selection of poplar genotypes in breeding programs.

In this study, a proteomic approach was conducted using two hybrid poplar genotypes (*P. ×euramericana* cv. ‘Agathe_F’ and cv. ‘Cima’) contrasted for some leaf-ecophysiological variables such as Δ or specific leaf area (Monclus et al., 2005, 2006). The main objectives were (i) to evaluate the extent of genetic variation in leaf proteome regardless of environmental factors such as growth condition, water regime or sampling date, and (ii) to evaluate the leaf proteome changes induced by a moderate drought in open field and a simulated moderate water deficit in glasshouse. Therefore, genotype differences and drought responses were evaluated in an open field and in a glasshouse experiments where 4-year-old or 4-month-old rooted cuttings were held irrigated or submitted to a moderate water deficit during 86 days or 18 days, respectively.

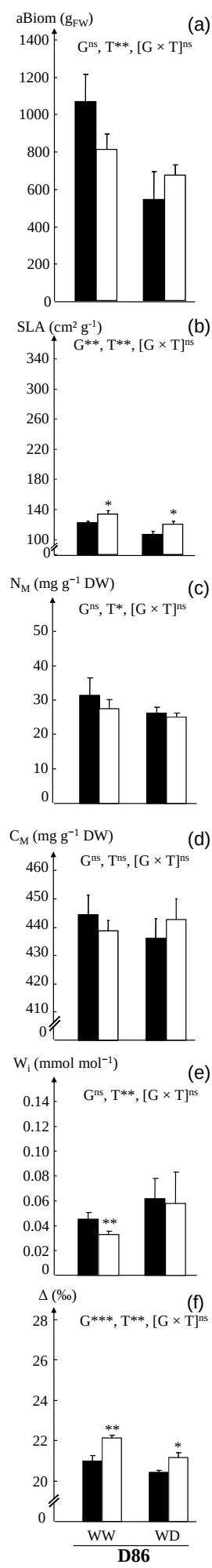


Figure 2. Productivity and leaf traits of 2 *Populus deltoides* × *P. nigra* hybrids cultivated in open field. Aboveground biomass (a; aBiom, g_{FW}), specific leaf area (b; SLA, cm² g⁻¹), nitrogen and carbon content (c and d; N_M and C_M, mg g⁻¹ DW), intrinsic water-use efficiency (e; W_i, mmol mol⁻¹) and carbon isotope discrimination (f; Δ, ‰) were presented for ‘Agathe_F’ (black bars) and ‘Cima’ (white bars). Means ± standard errors were presented for well watered plants (WW; n = 5) and for water deficit plants (WD; n = 5) from values measured after 86 days of withholding irrigation (D86). Levels of significance are indicated for the genotype effect (G), for the treatment effect (T) and for the genotype by treatment interaction (G × T). One-way ANOVA for genotype comparison is indicated on the top of the bars when significant (ns = non significant; * = P ≤ 0.05; ** = P ≤ 0.01; *** = P ≤ 0.001).

2. Results

2.1. Variations in productivity and leaf-ecophysiological variables

Water deficit regimes induced a significant and similar decrease (0.3 to 0.4 MPa) in leaf predawn water potential (Ψ_{wp}), 18 and 86 days after withholding water in glasshouse and in open field, respectively (Table 1). In the glasshouse experiment, the re-watering period yielded values of Ψ_{wp} similar to those of the controls. Regardless of the treatment, total leaf area (TLA, Fig. 1A) as well as aboveground biomass (aBiom, Fig. 2A) did not differ between ‘Agathe_F’ and ‘Cima’. ‘Agathe_F’ always displayed the lowest specific leaf area (SLA, Figs. 1B and 2B) and Δ (Figs. 1F and 2F) values, whereas it showed the highest values of W_i under control condition (Figs. 1E and 2E). This genotype also displayed the highest value of N_M in glasshouse only (Figs. 1C and 2C). It is noteworthy that recorded values of SLA, N_M and Δ were significantly higher in glasshouse (Fig. 1B, C, F) than in open field (Fig. 2B, C, F) for both genotypes.

No genotype by treatment interaction was evidenced for productivity and leaf-ecophysiological variables, both in the glasshouse and open field experiments. Water deficit decreased aBiom for both genotypes in the open field (Fig. 2A), while no significant effect was observed in TLA (Fig. 1A). A decrease of SLA, Δ and N_M , as well as an increase of W_i , was evidenced for both genotypes regardless of the experiment location (Figs. 1B, C, E, F and 2B, C, E, F). In the glasshouse experiment, as a result of 10 days of re-watering period, only a decrease of SLA was still observed.

2.2. Variations in leaf proteome

Regarding protein contents, we were unable to detect any significant effect (genotype, treatment or genotype by treatment interaction) whatever the growth condition and the sampling date (data not shown). Genotype and water deficit effects in the leaf proteome were

Figure 3. Reference 2-D map obtained from ‘Cima’ under control conditions and collected at D86 in open field. Proteins that were identified are marked with arrows and numbers. The isoelectric point (pI) extends from pH 4 to 7 (linear gradient) and the molecular mass (M_r), from 14 000 to 90 000 Da.

Table 2. Experimental design and number of significant spots for each specified effect. It should be noted that a protein could display more than one effect. Number of spots submitted to MS/MS analyses is underlined and the number of reliably identified proteins is indicated between brackets.

	Glasshouse		Open field	
	D18 G + T + G x T 'Agathe_F' vs. 'Cima' Well-watered vs. Water deficit	D28 G + T + G x T 'Agathe_F' vs. 'Cima' Well-watered vs. Re-watered	D50 G 'Agathe_F' vs. 'Cima' Well-watered	D86 G + T + G x T 'Agathe_F' vs. 'Cima' Well-watered vs. Water deficit
G effect	149	147	128	230
	70 common spots		76 common spots	
	<u>44</u> common spots (36)			
T effect	<u>22</u> (16)	2 still significant after re-watering (2)	<i>nd</i>	<u>31</u> (22)
G x T interaction	<u>9</u> (5)	1 still significant after re-watering (0)	<i>nd</i>	<u>22</u> (12)

Des diagrammes de Venn représentant le nombre de spots significatifs pour chaque effet de l'ANOVA à deux facteurs croisés, à D18 et à D86 sont présentés en annexe 1.

assessed from 730 reproducible spots resolved on CCB-stained 2-D gels and separated across a 4-7 pH range (Fig. 3).

2.2.1. Genetic variations

In the glasshouse experiment, 149 and 147 spots displayed quantitative variations between ‘Agathe_F’ and ‘Cima’ at D18 and D28, respectively (Table 2). Among these spots, 70 were common to both dates. In the open field experiment, such variations concerned 128 and 230 spots at D50 and D86, respectively; 76 spots were common to both dates. Among the spots that distinguished ‘Agathe_F’ from ‘Cima’ on both dates in glasshouse (70 spots) or in open field (76 spots), 44 common spots still discriminated the two genotypes regardless of the experiment location or the sampling date. The average ratio of their protein abundance (‘Agathe_F’ / ‘Cima’) ranged from 0.2 to 6.1. For most of these 44 spots, the magnitude of the average ratio was similar over each comparison (D18, D28, D50 and D86). These 44 spots were submitted to MS/MS analyses and 36 were reliably identified (Table 3). The eight remaining spots yielded multiple protein identifications (i.e. cross-contamination of neighbouring spots, ‘contamination’ from protein degradation products or the result of protein mixture; indicated as cross-contamination in Supplementary Table S1); the relative protein variation of these spots was considered inaccurate. Among the 36 reliably identified proteins, 18 were of higher abundance in ‘Agathe_F’ compared to ‘Cima’. Proteins were classified into groups based on their functional categories using the DBGET system (<http://www.genome.ad.jp/dbget/>). More than 80% of the proteins fell into four major groups: “carbohydrate metabolism” (11 proteins), “genes and proteins expression” (7), “amino acid metabolism” (6) and “energy metabolism” (6). The other proteins belonged to “defense” (3), “lipid metabolism” (1), “secondary metabolism” (1) and “unclassified” (1) groups. Overall, about 60% of these proteins appeared as multiple spots and accounted for nine protein

Glasshouse

Open field

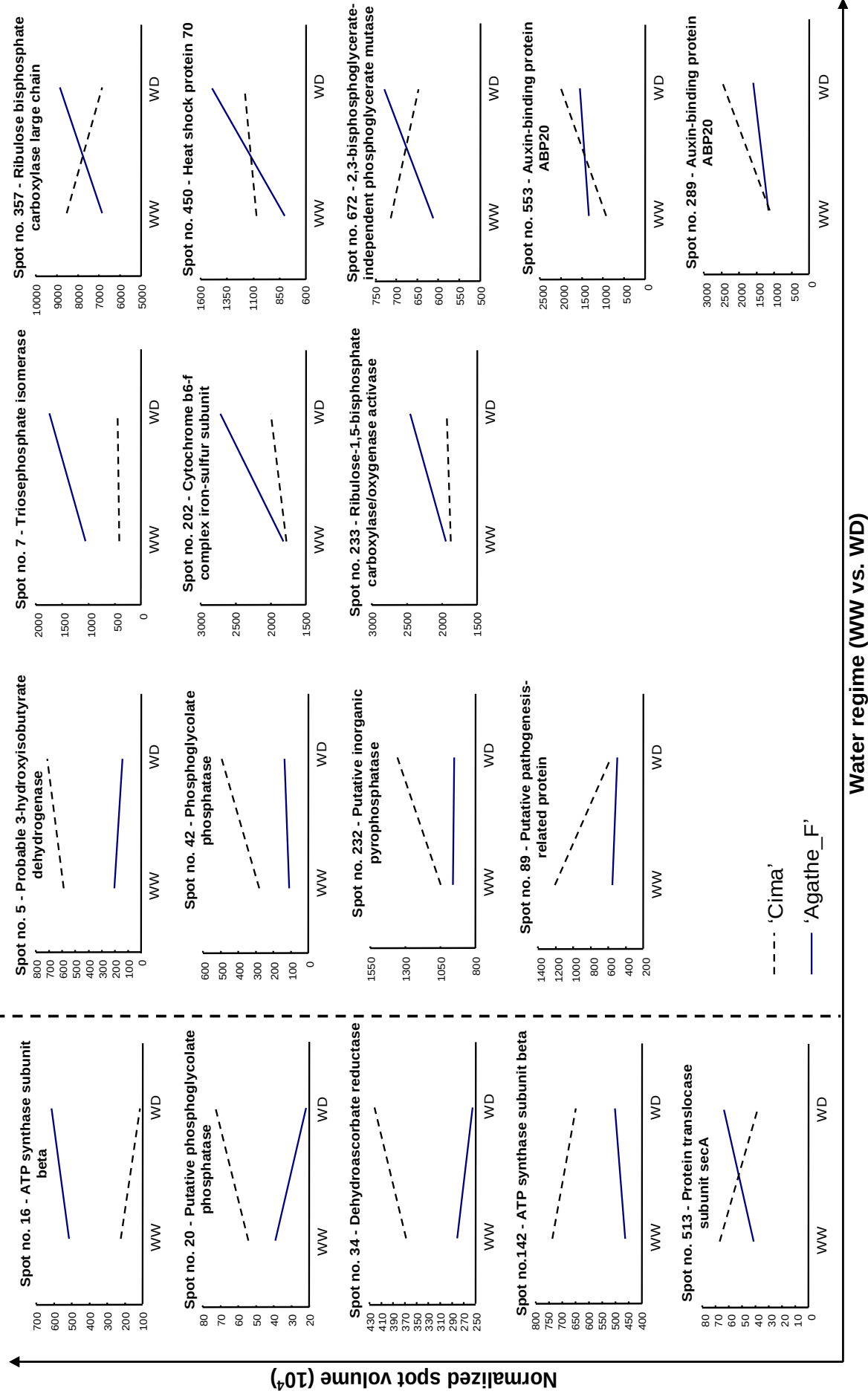


Figure 4. Reaction norm diagrams showing the molecular plasticity of leaf proteins with significant treatment interaction during D86 in the open field. Diagrams show leaf protein abundance (y axis; normalized spot volume) for ‘Agathe_F’ and ‘Cima’ according to the water regime (x axis; water regime, WW: well-watered condition and WD: water deficit condition), spot numbers refers to Table 4.

functions. Interestingly, most of these proteins that were resolved into multiple spots showed opposite variations between the two genotypes.

2.2.2. Drought-induced variations

As a whole, water deficit treatments induced significant variations (T and G $\times$ T interaction effect) in the abundance of 31 and 53 spots in the glasshouse and in the open field experiments, respectively (Table 2); all were submitted to MS/MS analyses. Significant G $\times$ T interactions concerned 9 and 22 spots in glasshouse and in open field, respectively. Five proteins were reliably identified in the glasshouse and 12 in the open field experiment (Fig. 4); their function is given in Table 4. As for the remaining spots, they led to multiple protein identifications (indicated as “cross-contamination”) or they did not fulfill the MS/MS criteria (indicated as “no hit”; Supplementary Table S3). In the glasshouse experiment, proteins were classified into “amino acid, carbohydrate and energy metabolism” (4) and “genes and proteins expression” (1). In the open field experiment, proteins belonged to “amino acid, carbohydrate and energy metabolism” (8), “defense” (2) and “transport and signal transduction” (2). Interestingly, none of these reliably identified proteins was shared between experiment locations. As a result of the 10-day re-watering period (D28) conducted in glasshouse, none G $\times$ T interaction was still observed. A significant T effect (without any significant G $\times$ T interaction) was evidenced for 22 spots in the glasshouse experiment at D18 (Table 2); 16 proteins were reliably identified (Table 5). About 70% displayed a significant decrease in abundance under water deficit conditions; this concerned proteins belonging to “amino acid metabolism” (5 proteins), “carbohydrate metabolism” (4), “energy metabolism” (1), and “genes and proteins expression” (1). Significant increase was observed for 5 proteins involved in “amino acid metabolism” (1), “defense” (2) and “genes and proteins expression” (2). The six remaining spots bore multiple protein identifications (Supplementary Table S2). As a

175 result of the 10-day re-watering period (D28), two reliably identified proteins (1-
176 aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase and malate dehydrogenase) were still down-
177 accumulated under re-watered condition. In the open field experiment, significant water
178 deficit effect (without any significant $G \times T$ interaction) concerned 31 spots at D86 (Table 2);
179 22 proteins were reliably identified (Table 5). A significant decrease in abundance was
180 observed for 13 proteins involved in “carbohydrate metabolism” (5), “defense” (3), “energy
181 metabolism” (1) and “genes and proteins expression” (4). A significant increase was observed
182 for 9 proteins involved in “carbohydrate metabolism” (1), “defense” (3), “genes and proteins
183 expression” (5). The 9 remaining spots are given in Supplementary Table S2; eight spots led
184 to multiple protein identifications and one spot did not fulfill the MS/MS criteria. It is
185 noteworthy that both water deficit experiments shared three proteins. Two displayed similar
186 variation regardless of the experiment location; a phosphoglycerate kinase (spot no. 145)
187 decreased in both water deficit experiments while a chaperonin CPN60 (spot no. 438)
188 increased. The last one (eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B, spot no. 542)
189 showed opposite variation between experiment locations, i.e. its abundance increased in the
190 glasshouse experiment while it decreased in the open field experiment.

191

3. Discussion

This study was conducted from two *P. × euramericana* genotypes ('Agathe_F' and 'Cima') grown in two contrasting environments: glasshouse and open field. In glasshouse, 4-month-old rooted cuttings were submitted to an 18-day withholding water period, whereas in open field, 4-year-old rooted cuttings were submitted to an 86-day withholding water period. In open field and compared to glasshouse, plants always displayed lower values of Δ and SLA, probably due to higher irradiance (Niinemets et al., 1998; Barbour et al., 2002; Monclus et al., 2005, 2006, Bonhomme et al., 2008) whereas in glasshouse, plants always displayed higher values of N_M , probably due to higher soil nitrogen availability (Field and Mooney 1986; Herppich et al., 2002).

3.1. Genetic variation involves oxidative protection enzymes

Whether the experiment was conducted in glasshouse or in open field, 'Agathe_F' differed from 'Cima' by thickest/densest leaves (lower SLA) and by higher water-use efficiency estimated either directly from W_i or indirectly from Δ . At the protein level, genetic variations were also observed: within each comparison (D18, D28, D50 or D86), 'Agathe_F' differed from 'Cima' by a range of 20% to 30% of the 730 reproducible spots, while less than half of these significant differences were common between sampling dates of a given experiment location. To our knowledge, no previous proteomic study has dealt with genetic variation in poplars; however a wide range of genetic variation has already been reported among other woody species. For instance, 4% of the leaf proteins were found to be differentially expressed between three holm oak provenances (Jorge et al., 2006), and 40% of shoot proteins displayed contrasted abundances between two grapevine varieties (Vincent et al., 2007). Whether the comparison was conducted in glasshouse or in open field, under well-watered or water deficit

conditions, 44 spots (i.e. 6% of the reproducible spots) systematically discriminated ‘Agathe_F’ from ‘Cima’. Other differences observed in a given comparison could be related to the sampling dates, the environmental growth conditions and/or to the age of the rooted cuttings. Among the 44 MS-analysed spots, eight resulted in multiple proteins per spot; such observations have already been reported and discussed (e.g. Jorge et al., 2005, 2006; Plomion et al., 2006; Vincent et al., 2007). Among the 36 remaining reliably identified proteins, approximately 60% corresponded to proteins that were resolved into multiple spots. This is a common observation in plant proteomics, whether resulting from post-translational modifications, from gene products encoded by different paralogs of a multigene family or from tissue specificities (Thiellement et al., 1999; Kim et al., 2003; Méchin et al., 2004; Ostergaard et al., 2004; Sappl et al., 2004; Valot et al., 2004; Watson et al., 2004; Plomion et al., 2006; Vincent et al., 2007). Since 2-DE cannot provide sufficient information about proteins that were resolved into multiple spots, further investigations using antibodies against phosphorylated amino acids or using additional MS/MS analysis (Claverol et al., 2003), could be interesting to check whether some of such proteins discriminating the two genotypes are also differently phosphorylated.

We observed that proteins taking part in protection of oxidative damages were more abundant in ‘Cima’, suggesting higher amount of oxidant molecules in this genotype. A dehydroascorbate reductase was more abundant in ‘Cima’; this enzyme is involved in the control of ascorbate redox state by keeping ascorbate in its reduced active form and it has been also reported that increasing ascorbate pool may require and signal a corresponding increase in glutathione pool size (Chen et al., 2003; Chen and Gallie, 2004; Nagendra-Prasad et al., 2008). Similarly, a NADP-dependent malic enzyme, assumed by Léon et al. (2002) to provide NADPH for the ascorbate–glutathione cycle, was also more abundant in ‘Cima’. Two isoforms of a cell division protease ftsH were of higher abundance in ‘Cima’, as well. FtsH

proteases play a role in the repair of PSII after oxidative damage and they have been hypothesised to also decrease photosynthesis in order to prevent ROS formation (Bailey et al., 2002; Ingle et al., 2007).

In order to accurately associate ecophysiological and proteomic genetic variations, further experiments extended to more numerous poplar genotypes are needed. However, these results suggest that there is a potential for identifying protein markers that can be used for characterizing and furthermore, for cataloguing genotypes by means of 2-DE and LC-MS/MS.

3.2. Impact of water deficits on protein abundance

A similar decrease in predawn leaf water potential was observed in both water deficit experiments, although their duration greatly differed (18 days in glasshouse vs. 86 days in open field). Water deficit could be defined in the glasshouse as a short-term moderate drought (STMD) and in the open field, as a long-lasting moderate drought (LLMD). While STMD was not sufficient in term of intensity and/or duration to affect productivity, LLMD decreased productivity similarly in both genotypes, suggesting that ‘Agathe_F’ and ‘Cima’ did not differ in their drought tolerance level. As already reported in poplars, decrease of SLA, N_M and Δ , and an increase of W_i were observed for both genotypes during STMD and LLMD (Abrams et al., 1990; Niinemets et al., 1998; Barbour et al., 2002; Marron et al., 2002; Monclus et al., 2006). In response to STMD and LLMD, we also observed changes in terms of leaf protein amount; some were similar in both genotypes while others were specific to either ‘Agathe_F’ or ‘Cima’. It is noteworthy that among the 21 proteins that varied in response to STMD, only two still differed significantly between control and re-watered plants. This result indicates that the observed changes arose from withholding water and that a 10-day re-watering period was overall sufficient for protein amount recovery.

During STMD as during LLMD, most of the drought-responsive proteins were down-accumulated regardless of the genotype. They include several proteins from amino acid, carbohydrate, energy and protein metabolisms; similar observations have already been reported in poplar (Plomion et al. 2006). These results provide a strong case that the biochemical mechanisms associated with plant functioning were slow-downed by water shortage regardless of the experiment. However, some contrasted changes were observed between the two experiments such as in enzymes involved in oxidative stress. Indeed, while STMD induced a decrease in the abundance of four proteins involved in the GSH biosynthetic pathway (a glutathione S-transferase, two isoforms of a glutamine synthetase and a glycine dehydrogenase), LLMD induced an increase in the abundance of two isoforms of a 2-Cys peroxiredoxin and two isoforms of a cell division protease ftsH. Decreases in GSH-related enzymes are assumed to arise from early drought responses (Tausz et al., 2004) whereas the increased abundance of enzymes involved in oxidative stress response could suggest an acclimation to a changing redox environment (Bailey et al., 2002; König et al., 2003). The increase of two translation factors in STMD (an eukaryotic initiation factor 4A, eif4A and an eukaryotic translation initiation factor 3B) could also be related to early drought responses since eukaryotic translation initiation factors, at least eif4A, have been reported to be involved in response to various abiotic stresses (Vashisht et al., 2005; Vashisht and Tuteja, 2006). However, the increased abundance of molecular chaperones such as a HSP70 and/or a CPN60 suggests that processes involved in protein repair and/or protection against denaturation were triggered regardless of the experiment. Moreover, an increased abundance of a RuBisCO activase observed during LLMD only, could contribute to sustain an efficient photosynthesis through higher activation of RuBisCO.

In response to both STMD and LLMD, ‘Cima’ differed from ‘Agathe_F’ by an increased abundance of a phosphoglycolate phosphatase, an enzyme involved in hydrolysis of the

phosphoglycolate formed by the oxygenation of ribulose-1,5-bisphosphate. Such result could indicate an activation of the photorespiratory pathway in ‘Cima’ which is known to protect the photosynthetic apparatus against photoinhibition during water deficit (Osmond and Grace 1995; Park et al., 1996; Osmond et al., 1997). In STMD, ‘Cima’ also differed by an increased abundance of a dehydroascorbate reductase which keeps ascorbate in its reduced active form and which has been reported as a possible enhancer of glutathione pool size (Chen et al., 2003; Chen and Gallie, 2004; Nagendra-Prasad et al., 2008), suggesting that ‘Cima’ could be subjected to higher ROS generation. In the LLMD, ‘Cima’ displayed an increased abundance of an inorganic pyrophosphatase that provides inorganic phosphate (Pi), while no change was observed in ‘Agathe_F’. As reported by dos Santos et al. (2006), the foliar Pi supply, which is genotype-dependent in beans, participates in the recovery of photosynthesis during water deficit. Likewise, the abundance of two isoforms of an auxin-binding protein, a receptor for the plant growth-promoting hormone, strongly increased in ‘Cima’ only. These observations could indicate that ‘Cima’ promotes auxine transport to limit growth drop during drought. In contrast, the abundance of two isoforms of an ATP synthase subunit beta in STMD and a 2-3-bisphosphoglycerate mutase (involved in glycolysis) in LLMD strongly increased in ‘Agathe_F’, while it decreased in ‘Cima’. Such increased protein abundances in ‘Agathe_F’ could indicate higher availability of energy and reducing power for the detoxification and repair of damages caused by oxidative molecules. During STMD, a protein translocase subunit secA increased in ‘Agathe_F’ while it decreased in ‘Cima’. This enzyme carries proteins, such as the 33-kDa protein oxygen evolving complex, through the stroma to the thylakoids and could sustain photosynthesis (Nohara et al., 1995; Keegstra and Cline, 1999). Likewise during LLMD, the abundance of five proteins involved in photosynthesis (a triosephosphate isomerase, a ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, a ribulose bisphosphate carboxylase large chain and a cytochrome b6-f complex) strongly

increased in ‘Agathe_F’ only. All together, they could also support a sustainable photosynthesis during water deficit in ‘Agathe_F’; a reliable observation considering the higher WUE of this genotype. Moreover, the strong increase in the abundance of a HSP70 observed in ‘Agathe_F’ only, could contribute to avoid protein damages when leaf temperature rise with reduced water losses which could be lesser in plants with higher WUE (Thompson et al., 2007).

4. Conclusions

Genetic variation was assessed, for the first time, in poplar leaf proteome. A reliable genetic variation was evidenced over time and regardless of ontogenical development and growth conditions; however some genotype differences were specifically observed either in the glasshouse or in the open field experiments. Genetic variation was also recorded in response to the water deficit experiments, although genotypes did not differ by their drought tolerance level. Interestingly, some of the drought-responsive proteins also belonged to the protein set that displayed reliable differences between genotypes. However, changes induced by a water deficit simulated in glasshouse or by a drought of comparable intensity conducted in open field, overall differed. Such variations could be explained by the difference of water deficit duration and/or growth conditions. This study is a first step toward a more comprehensive analysis of the genetic control of the molecular plasticity of poplar genotypes facing drought.

5. Experimental

5.1. Plant material and growth conditions

Young fully expanded leaves were collected from two *Populus deltoides* Bartr. ex Marsh. × *Populus nigra* L. genotypes, ‘Agathe_F’ and ‘Cima’, grown in open field and in glasshouse. The open field experiment has been described in Monclus et al. (2006); it included 29 *P. deltoides* Bartr. ex Marsh. × *P. nigra* L. genotypes. Briefly, homogeneous 25 cm-long woody stem cuttings were planted in January 2001 in an open field located at the INRA station of Orléans (47°46′ N, 1°52′ E; 110 m above sea level). Two plots were established at 15 m spacing. Each plot was divided into five randomized complete blocks (one cutting of each genotype per block). Rooted cuttings were coppiced at the end of 2001, 2002 and 2003. From bud flush to June 15th, 2004, the two plots were irrigated every second day (20 mm of water) with overhead sprinklers. From this date to the end of the growing season, a water deficit was induced by irrigation cessation on one plot while the second one was kept irrigated and served as control. On August 4th, 2004, 50 days (D50) since the beginning of the experiment, the three youngest fully expanded leaves per plant were collected from three control plants. On September 9th, 86 days (D86) after the withholding irrigation, the three youngest fully expanded leaves per plant were collected from three control and three stressed plants. Sampled leaves were immediately frozen in liquid N₂ and stored at -80 °C until protein extraction. On September 10th, one young fully expanded leaf was collected from each control and each stressed plant, and kept for ecophysiological measurements.

The glasshouse experiment was monitored at the INRA station of Orléans, using ‘Agathe_F’ and ‘Cima’ genotypes. For each genotype, 18 homogeneous 25 cm-long woody stem cuttings were planted in 10 l pots containing a mixture of blond and brown peat, horse manure, heather and bromide-disinfected compost (25:25:20:20:10 (v/v), pH 5.8; Faliénor, Vivy, France). All rooted cuttings were watered to field capacity during three months. From August 8th, 2006,

nine rooted cuttings of each genotype were watered every second day to 25% of the water loss while the nine others were maintained to field capacity and served as control. On August 26th (18th day, D18), the three youngest fully expanded leaves per plant were collected from three stressed and three control plants per genotype. Three other stressed plants were re-watered to field capacity until September 5th. At this date (28th day, D28), the three youngest fully expanded leaves per plant were collected from the three control and the three re-watered plants per genotype. One half of each sampled leaves was kept for ecophysiological measurements while the other half was immediately frozen in liquid N₂ and stored at -80 °C until protein extraction.

5.2. Ecophysiological measurements

Soil water availability was monitored from predawn leaf water potential (Ψ_{wp} , MPa) with a Scholander-type pressure chamber (PMS-670; PMS Instrument, Albany, OR, USA). In the open field, Ψ_{wp} was measured from D1 to D86 as reported in Monclus et al. (2006); in glasshouse, Ψ_{wp} measurements were conducted from D1 to D28 from the 6 remaining rooted cuttings per genotype. Productivity was estimated from fresh aboveground biomass (aBiom, g_{FW}) measured on January 7th, 2005 in the open field experiment, and from total leaf area (TLA, cm²) in the glasshouse. Specific leaf area (SLA, cm² g⁻¹) was assessed from 6 calibrated discs (0.8 cm radius) cut from lamina of one fully expanded leaf and dried at 60 °C over 2 days. Intrinsic water-use efficiency (W_i , mmol mol⁻¹) was estimated from a young fully expanded leaf as the ratio between net CO₂ assimilation rate (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) and leaf stomatal conductance to water vapour pressure (g_s , mmol H₂O m⁻² s⁻¹) by using a portable open infrared gas analyser (CIRAS-2; PP System, Hitchin, UK). Leaf chamber operated at 200 ml min⁻¹ and the CO₂ concentration inside the chamber was kept at 400 ppm. Carbon isotope composition ($\delta^{13}\text{C}$) and, carbon (C_M ; mg g⁻¹_{DW}) and nitrogen contents (N_M ; mg g⁻¹_{DW})

of leaf material were assessed from 1 mg homogeneous dry powder obtained from the oven-dried calibrated discs used for SLA. These analyses were conducted from continuous flux isotope ratio mass spectrometers. In the open field experiment, leaf dry powders were analysed according to Monclus et al. (2006). In the glasshouse experiment, leaf dry powders were analysed using an ANCA-NT 20-20 Stable Isotope Analyser with ANCA-NT Solid/Liquid Preparation Module (Europa Scientific Ltd., Crewe, UK). $\delta^{13}\text{C}$ was calculated relative to Pee Dee Belemnite limestone standard as described in Craig (1957):

$$\delta^{13}\text{C} = \frac{(R_{\text{sample}} - R_{\text{standard}})}{(R_{\text{standard}})} \times 1000 \text{ [‰]},$$

where R_{sample} and R_{standard} are the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio in plant tissue and the standard, respectively. Carbon isotope discrimination (Δ , ‰) was calculated according to Farquhar and Richards (1984), as:

$$\Delta = \frac{(\delta_{\text{air}} - \delta_{\text{plant}})}{(1 + (\delta_{\text{plant}} / 1000))} \text{ [‰]},$$

where δ_{air} and δ_{plant} are $\delta^{13}\text{C}$ of the atmospheric CO_2 (assumed to be close to -8‰) and the leave sample, respectively.

5.3. Protein extraction and solubilisation

Proteins were extracted according to the procedure described by Damerval et al. (1986) and modified by Gion et al. (2005). Protein extracts were obtained from 500 mg of frozen lamina sampled from the grinding of the three youngest fully expanded leaves collected on one individual plant. Briefly, samples were ground in liquid N_2 and suspended in 10 ml 10% TCA (w/v) and 0.07% β -mercapto-ethanol (v/v) in cold acetone, and placed at -20 °C during 2 h to precipitate proteins. The suspension was centrifuged at 16 000 g (23 min, -10 °C), the pellet was washed three times with ice-cold acetone containing 0.07% β -mercapto-ethanol, dried

and ground finely in a ball crusher (MM 200; Retsch, Haan, Germany) for 5 min. Dried powder was resuspended with 30 μl mg^{-1} of TCT solution (urea 7 M, thiourea 2 M, Triton X-100 0.4% v/v, CHAPS 4% w/v, DTT 10 mM, IPG buffer 1% v/v) to resolubilize protein extract. Samples were then centrifuged at 11 000 g during 6 min to remove all cellular fragments. Protein content was quantified with BSA as standard, according to Ramagli and Rodriguez (1985).

5.4. Two-dimensional electrophoresis (2-DE) and gel staining

Isoelectric focusing (IEF) was conducted using the IPGphor II system (GE Healthcare; Little Chalfont, UK) and immobilized linear pH gradient (IPG) strips (Immobiline Drystrip pH 4-7, 24 cm, GE Healthcare). Strips were passively rehydrated for 10 h with TCT solution, and 300 μg of proteins were cup-loaded per strip. The IEF running conditions were: 500 V for 1 h, 500 - 1000 V linear gradient for 1 h, 1000 - 8000 V linear gradient for 3 h, and 8000 V to achieve a total of 78 000 Vh. The focused strips were equilibrated twice for 15 min each as described by Görg et al. (1987). Separation in the second dimension was performed by SDS-PAGE in vertical slabs of acrylamide (acrylamide / bis acrylamide 36.5/1 11%, Tris HCl 1.5 M pH 8.8 24.5% v/v, SDS 0.1% w/v, APS 0.042% w/v and TEMED 0.066% v/v). Migration was performed in the Ettan Dalt six (GE Healthcare). The lower chamber was filled with 1x running buffer (Tris HCl pH 8.8 25 mM, glycine 0.2 M and SDS 0.1% w/v) whereas the upper chamber contained 2x running buffer. Running program was performed as follows: 1 W per gel for 1 h followed by 3 W per gel overnight until the migration front reached 0.5 mm of the gel bottom. Gels were stained using Colloidal Coomassie Brilliant blue (CBB) G-250, according to Gion et al. (2005). Overall, 42 gels were analyzed; 24 for the glasshouse experiment (for each genotype: three controls + three water-stressed at D18 and three controls +

three re-watered at D28) and 18 for the open field experiment (for each genotype: three controls at D50 and three controls + three water-stressed at D86).

5.5. Image acquisition and spot detection

The 42 analytical gels were scanned with a flatbed ImageScanner II system and the LabScan V3.00 software (GE Healthcare). Image analysis was performed using the Progenesis SameSpots software (Nonlinear Dynamics, Durham, NC, USA). All gels were warped to a single reference gel. Matching was performed automatically and systematically confirmed after one-by-one visual checking: artefacts, or spots that could not be confidently verified as true matches were disregarded and misalignments were corrected by manual warping when appropriate. Spots were considered reproducible when present in at least two of the three biological replicates. Statistical analyses were performed on 730 spots deemed reproducible. Normalized volumes were finally obtained using the total spot volume normalization procedure of Progenesis SameSpots software.

5.6. Statistical analyses

Results were analysed with the R programming language v2.7.0 (R Development Core Team, 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing; Vienna, AU). For each variable, the normality of the distribution was tested with a Shapiro-Wilk test. Genotype comparisons were performed by date (D18, D28, D50 and D86) (Table 2). Data collected at D18 and D28 in the glasshouse experiment were evaluated using two-way ANOVA. The model used was: $Y_{ijk} = \mu + G_i + T_j + G_i \times T_j + \varepsilon_{ijk}$; where Y_{ijk} refers to individual values k , μ is the general mean, G_i is the effect of genotype i ('Agathe_F' vs. 'Cima'), T_j is the effect of treatment j (control vs. water-stress at D18 or control vs. re-watered at D28), $G_i \times T_j$ is the genotype by treatment interaction and ε_{ijk} is the residual. Data

collected at D86 in the open field were also evaluated using two-way ANOVA using a similar model. Data collected at D50 (controls only) were evaluated using a one-way ANOVA. The model was: $Y'_{ik} = \mu' + G_i + \varepsilon'_{ik}$; where Y'_{ik} refers to individual values k , μ' is the general mean, G_i is the effect of genotype i ('Agathe_F' vs. 'Cima') and ε'_{ik} is the residual. Levels of significance were * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ and ns = non significant. Means are expressed with their standard error.

5.7. MS analysis and protein identification

For the genotype effect, any spot whose p -value was systematically of <0.05 in the four comparisons, was excised. For the treatment effect as well as the genotype by treatment interaction effect, any spot with a p -value of <0.05 , at D18 or at D86, was excised. Overall, a total of 107 spots were excised; 28 were analysed by nanoHPLC - LTQ analyses and 79 by on-line capillary HPLC - LCQ analyses.

5.7.1. NanoHPLC - LTQ analysis

In-gel digests of the excised spots were obtained using trypsin (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) according to the procedure described by Shevchenko et al. (1996). Peptides were analyzed by a nanoHPLC Ettan MDLC system (GE Healthcare) controlled by UNICORN software coupled to a mass spectrometer LTQ Ion Trap Spectrometer (Thermo-Finnigan, San Jose, CA). The samples were de-salted and concentrated on line by a Zorbax 300-SB C18 trap (5 μ m, 5 $\times$ 0.3 mm) (Agilent Technologies, Germany), then separated on an analytical column reverse phase Zorbax 300-SB C18 trap (3.5 μ m, 150 $\times$ 0.075 mm) (Agilent Technologies) with a 15–50% linear gradient of solvent B in 30 min (solvent A was 0.1% formic acid and solvent B was 0.1% formic acid in 84% ACN). Each scan cycle consisted of one full scan mass spectrum (m/z 500-2000) collected in centroid mode followed by three

MS/MS events in centroid mode ($Q_z = 0.25$, Activation Time = 40 ms). For CID spectra (MS²), the isolation width was 2 m/z units and the normalized collision energy was 40%. Dynamic exclusion was activated during 30 s with a repeat count of 1. The separation flow rate was set at 400 nl min⁻¹.

5.7.2. On-line capillary HPLC - LCQ analysis

In-gel digests of the excised spots were obtained using trypsin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) according to the procedure described by Plomion et al. (2006). Peptides were analyzed by on-line capillary HPLC (LC Packings, Amsterdam, The Netherlands) coupled to a nanospray LCQ Deca XP Ion Trap mass spectrometer (Thermo-Finnigan, San Jose, CA). The peptides were eluted from the trap column onto an analytical 75 μm i.d. $\times$ 15 cm C18 PepMapTM column (LC Packings) with a 5–40% linear gradient of solvent B in 35 min (solvent A was 0.1% formic acid in 5% ACN, and solvent B was 0.1% formic acid in 80% ACN). The separation flow rate was set at 200 nl min⁻¹. The mass spectrometer operated in positive ion mode at a 2 kV needle voltage and a 3 V capillary voltage. Data were acquired in a data-dependent mode alternating a MS scan survey over the range m/z 150-2000, a zoom scan on the most intense ion and its MS/MS spectrum using a 2 m/z units ion isolation window and a 35% relative collision energy.

5.7.3. Data analysis

After mass spectrometric analyses, all data were searched using SEQUEST algorithm through Bioworks 3.3.1 interface (ThermoFinnigan) against the DFCI Poplar Gene Index release 3.0 (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=poplar>; September 2006) and the JGI *Populus* genome release 1.1 (http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html; December 2004); altogether data were searched against 314 640 entries. DTA files were

generated for MS/MS spectra that both reached a minimal intensity ($5 \cdot 10^4$) and a sufficient number of ions (15). The DTA generation allowed the averaging of several MS/MS spectra corresponding to the same precursor ion with a tolerance of 1.4 Da. Spectra from precursor ion higher than 3500 Da or lower than 600 Da were rejected. The search parameters were as follows: mass accuracy of the peptide precursor and peptide fragments was set to 2 Da and 1 Da, respectively. Only b- and y-ions were considered for mass calculation. Oxidation of methionines (+ 16 Da) and carbamidomethylation of cysteines (+ 57 Da) were considered as differential modifications. Two missed trypsin cleavages were allowed. Only peptides with Xcorr higher than 1.9 (single charge), 2.2 (double charge) and 3.75 (triple charge) were retained. In all cases, ΔC_n had to be greater than 0.1 and peptide p-value lower than 10^{-3} . Proteins identified by a unique peptide were rejected. Peptide redundancy was eliminated so as to list the minimum number of proteins covering all detected peptides.

Acknowledgements

LB was supported by a PhD grant from the Conseil Régional, Région Centre, France. The authors gratefully acknowledge the excellent technical assistance of Alain Guichard and Gilles Moreau (Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures). The authors are grateful to INRA of Orléans for giving access to the glasshouse and the open field. The authors thank the Scottish Crop Research Institute (Dundee, Scotland, UK) for the $\delta^{13}\text{C}$ analyses of bulk leaf material.

References

- Abrams, M.D., Kubiske, M.E., Steiner, K.C., 1990. Drought adaptations and responses in five genotypes of *Fraxinus pennsylvanica* Marsh: photosynthesis, water relations and leaf morphology. *Tree Physiol.* 6, 305-315.
- Agrawal, G.K., Yonekurab, M., Iwahashi, Y., Iwahashi, H., Rakwal, R., 2005. System, trends and perspectives of proteomics in dicot plants Part III: Unraveling the proteomes influenced by the environment, and at the levels of function and genetic relationships. *J. Chromatogr. B*, 815, 137-145.
- Al Afas, N., Marron, N., Ceulemans, R., 2006. Clonal variation in stomatal characteristics related to biomass production of 12 poplar (*Populus*) clones in a short rotation coppice culture. *Environ. Exp. Bot.* 58, 279-286.
- Al Afas, N., Marron, N., Ceulemans, R., 2007. Variability in *Populus* leaf anatomy and morphology in relation to canopy position, biomass production, and varietal taxon. *Ann. For. Sci.* 64, 521-532.
- Bailey, S., Thompson, E., Nixon, P.J., Horton, P., Mullineaux, C.W., Robinson, C., Mann, N.H., 2002. A critical role for the Var2 FtsH homologue of *Arabidopsis thaliana* in the photosystem II repair cycle *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 277, 2006-2011.
- Barbour, M.M., Walcroft, A.S., Farquhar, G.D., 2002. Seasonal variation in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$ of cellulose from growth rings of *Pinus radiata*. *Plant Cell Environ.* 25, 1483-1499.
- Bogeat-Triboulot, M.B., Brosche, M., Renaut, J., Jouve, L., Le Thiec, D., Fayyaz, P., Vinocur, B., Witters, E., Laukens, K., Teichmann, T., Altman, A., Hausman, J.F., Polle, A., Kangasjarvi, J., Dreyer, E., 2007. Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in arid regions. *Plant Physiol.* 143, 876-892.

- 554 Bohler, S., Bagard, M., Oufir, M., Planchon, S., Hoffmann, L., Jolivet, Y., Hausman, J.F.,
555 Dizengremel, P., Renaut, J., 2007. A DIGE analysis of developing poplar leaves subjected
556 to ozone reveals major changes in carbon metabolism. *Proteomics* 7, 1584-1599.
- 557 Bonhomme, L., Barbaroux, C., Monclus, R., Morabito, D., Berthelot, A., Villar, M., Dreyer,
558 E., Brignolas, F., 2008. Genetic variation in productivity, leaf traits and carbon isotope
559 discrimination in hybrid poplars cultivated on contrasting sites. *Ann. For. Sci.* 65, 1-9.
- 560 Brignolas, F., Thierry, C., Guerrier, G., Boudouresque, E., 2000. Compared water deficit
561 response of two *Populus ×euramericana* clones, Luisa Avanzo and Dorskamp. *Ann. For.*
562 *Sci.* 57, 261-266.
- 563 Cánovas, F.M., Dumas-Gaudot, E., Recorbet, G., Jorrín, J., Mock, H.-P., Rossignol, M., 2004.
564 Plant proteome analysis. *Proteomics* 4, 285-298.
- 565 Chen, Z., Gallie, D.R., 2004. The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and
566 stomatal movement. *Plant Cell* 16, 1143-1162.
- 567 Chen, Z., Young, T.E., Ling, J., Chang, S.C., Gallie, D.R., 2003. Increasing vitamin C content
568 of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 3525–
569 3530.
- 570 Claverol, S., Burlet-Schiltz, O., Gairin, J.E., Monsarrat, B., 2003. Characterization of protein
571 variants and post-translational modifications: ESI-MSⁿ analyses of intact proteins eluted
572 from polyacrylamide gels. *Mol. Cell. Proteomics* 2, 483-493.
- 573 Craig, H., 1957. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-
574 spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochim. Cosmochim. Acta* 12, 133-149.
- 575 Damerval, C., de Vienne, D., Zivy, M., Thiellement, H., 1986. Technical improvements in
576 two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-
577 seedling proteins. *Electrophoresis* 7, 52-54.

- 578 dos Santos, M.G., Ribeiro, R.V., de Oliveira, R.F., Machado, E.C., Pimentel, C., 2006. The
579 role of inorganic phosphate on photosynthesis recovery of common bean after a mild water
580 deficit. *Plant Sci.* 170, 659-664.
- 581 Dreyer, E., Bogeat-Triboulot, M.B., Le Thiec, D., Guehl, J.M., Brignolas, F., Villar, M.,
582 Bastien, C., Martin, F., Kohler, A., 2004. Drought tolerance of poplars: can we expect to
583 improve it? *Biofutur* 247, 54-58.
- 584 Farquhar, G.D., Richards, R.A., 1984. Isotopic composition of plant carbon correlates with
585 water-use efficiency of wheat genotypes. *Aust. J. Plant Physiol.* 11, 539-552.
- 586 Ferreira, S., Hjerno, K., Larsen, M., Wingsle, G., Larsen, P., Fey, S., Roepstorff, P., Pais,
587 M.S., 2006. Proteome profiling of *Populus euphratica* Oliv. upon heat stress. *Ann. Bot.* 98,
588 361-377.
- 589 Field, C., Mooney, H.A., 1986. The photosynthesis-nitrogen relationship in wild plants. In:
590 Givnish, T.J. (Ed.), *On the Economy of Plant Form and Function*. Cambridge University
591 Press, Cambridge, pp. 25-55.
- 592 Gion, J.M., Lalanne, C., Le Provost, G., Ferry-Dumazet, H., Paiva, J., Chaumeil, P., Frigerio,
593 J.M., Brach, J., Barre, A., de Daruvar, A., Claverol, S., Bonneu, M., Sommerer, N.,
594 Negroni, L., Plomion, C., 2005. The proteome of maritime pine wood forming tissue.
595 *Proteomics* 5, 3731-3751.
- 596 Görg, A., Postel, W., Weser, J., Gunther, S., Strahler, J.R., Hanash, S.M., Somerlot, L., 1987.
597 Elimination of point streaking on silver stained two-dimensional gels by addition of
598 iodoacetamide to the equilibration buffer. *Electrophoresis* 8, 122-124.
- 599 He, C., Zhang, J., Duan, A., Zheng, S., Sun, H., Fu, L., 2008. Proteins responding to drought
600 and high-temperature stress in *Populus × euramericana* cv. '74/76'. *Trees* 22, 803-813.

- 601 Herppich, M., Herppich, W.B., von Willert, D.J., 2002. Leaf nitrogen content and
602 photosynthetic activity in relation to soil nutrient availability in coastal and mountain
603 fynbos plants (South Africa). *Basic Appl. Ecol.* 3, 329-337.
- 604 Ingle, R.A., Schmidt, U.G., Farrant, J.M., Thomson, J.A., Mundree, S.G., 2007. Proteomic
605 analysis of leaf proteins during dehydration of the resurrection plant *Xerophyta viscosa*.
606 *Plant Cell Environ.* 30, 435-446.
- 607 Jorge, I., Navarro, R.M., Lenz, C., Ariza, D., Porras, C., Jorrín, J., 2005. The Holm Oak leaf
608 proteome: Analytical and biological variability in the protein expression level assessed by
609 2-DE and protein identification tandem mass spectrometry de novo sequencing and
610 sequence similarity searching. *Proteomics* 5, 222-234.
- 611 Jorge, I., Navarro, R.M., Lenz, C., Ariza, D., Jorrín, J., 2006. Variation in the holm oak leaf
612 proteome at different plant developmental stages, between provenances and in response to
613 drought stress. *Proteomics* 6, 207-214.
- 614 Keegstra, K., Cline, K., 1999. Protein import and routing systems of chloroplasts. *Plant Cell*
615 11, 557-570.
- 616 Kieffer, P., Dommes, J., Hoffmann, L., Hausman, J.F., Renaut, J., 2008. Quantitative changes
617 in protein expression of cadmium-exposed poplar plants. *Proteomics* 8, 2514-2530.
- 618 Kim, S.I., Kim, J.Y., Kim, E.A., Kwon, K.-H., Kim, K.-W., Cho, K., Lee, J.H., Nam, M.H.,
619 Yang, D.-C., Yoo, J.S., Park, Y.M., 2003. Proteome analysis of hairy root from *Panax*
620 *ginseng* C.A. Meyer using peptide fingerprinting, internal sequencing and expressed
621 sequence tag data. *Proteomics* 3, 2379-2392.
- 622 König, J., Lotte, K., Plessow, R., Brockhinke, A., Baier, M., Dietz, K.-J., 2003. Reaction
623 mechanism of plant 2-Cys peroxiredoxin. *J. Biol. Chem.* 278, 24409-24420.

- 624 León, A.M., Palma, J.M., Corpas, F.J., Gómez, M., Romero-Puertas, M.C., Chatterjee, D.,
 625 Mateos, R.M., del Río, L.A., Sandalio, L.M., 2002. Antioxidative enzymes in cultivars of
 626 pepper plants with different sensitivity to cadmium. *Plant Physiol. Biochem.* 40, 813-820.
- 627 Marron, N., Delay, D., Petit, J.M., Dreyer, E., Kahlem, G., Delmotte, F.M., Brignolas, F.,
 628 2002. Physiological traits of two *Populus × euramericana* clones, Luisa Avanzo and
 629 Dorskamp, during a water stress and re-watering cycle. *Tree Physiol.* 22, 849-858.
- 630 Marron, N., Dreyer, E., Boudouresque, E., Delay, D., Petit, J.M., Delmotte, F.M., Brignolas,
 631 F., 2003. Impact of successive drought and re-watering cycles on growth and specific leaf
 632 area of two *Populus × canadensis* (Moench) clones, 'Dorskamp' and 'Luisa_Avanzo'. *Tree*
 633 *Physiol.* 23, 1225–1235.
- 634 Marron, N., Villar, M., Dreyer, E., Delay, D., Boudouresque, E., Petit, J.M., Delmotte, F.M.,
 635 Guehl, J.M., Brignolas, F., 2005. Diversity of leaf traits related to productivity in 31
 636 *Populus deltoides × Populus nigra* clones. *Tree Physiol.* 25, 425-435.
- 637 Marron, N., Dillen, S.Y., Ceulemans, R., 2007. Evaluation of leaf traits for indirect selection
 638 of high yielding poplar hybrids. *Environ. Exp. Bot.* 61, 103-116.
- 639 Méchin, V., Balliau, T., Chateau-Joubert, S., Davanture, M., Langella, O., Negroni, L., Prioul,
 640 J.-L., Thevenot, C., Zivy, M., Damerval, C., 2004. A two-dimensional proteome map of
 641 maize endosperm. *Phytochemistry* 65, 1609-1618.
- 642 Monclus, R., Dreyer, E., Delmotte, F.M., Villar, M., Delay, D., Boudouresque, E., Petit, J.M.,
 643 Marron, N., Bréchet, C., Brignolas, F., 2005. Productivity, leaf traits and carbon isotope
 644 discrimination in 29 *Populus deltoides × P. nigra* clones. *New Phytol.* 167, 53-62.
- 645 Monclus, R., Dreyer, E., Villar, M., Delmotte, F.M., Delay, D., Petit, J.M., Barbaroux, C., Le
 646 Thiec, D., Bréchet, C., Brignolas, F., 2006. Impact of drought on productivity and water use
 647 efficiency in 29 genotypes of *Populus deltoides × Populus nigra*. *New Phytol.* 169,
 648 765-777.

- 649 Nagendra-Prasad, D., Sudhakar, N., Murugesan, K., Mohan, N., 2008. Pre-exposure of calli to
650 ozone promotes tolerance of regenerated *Lycopersicon esculentum* cv. PKM1 plantlets
651 against acute ozone stress. J. Plant Physiol. 165, 1288-1299.
- 652 Niinemets, Ü., Kull, O., Tenhunen, J.D., 1998. An analysis of light effects on foliar
653 morphology, physiology, and light interception in temperate deciduous woody species of
654 contrasting shade tolerance. Tree Physiol. 18, 681-696.
- 655 Nohara, T., Nakai, M., Goto, A., Endo, T., 1995. Isolation and characterization of the cDNA
656 of pea chloroplast SecA. Evolutionary conservation of the bacterial-type SecA-dependent
657 protein transport within chloroplasts. FEBS lett. 364, 305-308.
- 658 Osmond, C.B., Grace, S.C., 1995. Perspectives on photoinhibition and photorespiration in the
659 field: quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis? J. Exp.
660 Bot. 46, 1351-1362.
- 661 Osmond, B., Badger, M., Maxwell, K., Björkman, O., Leegood, R.C., 1997. Too many
662 photons: photorespiration, photoinhibition and photooxidation. Trends Plant Sci. 2, 119-121.
- 663 Ostergaard, O., Finnie, C., Laugesen, S., Roepstorff, P., Svennson, B., 2004. Proteome
664 analysis of barley seeds: identification of major proteins from two-dimensional gels (pI 4-7).
665 Proteomics 4, 2437-2447.
- 666 Park, Y.-I., Chow, W.S., Osmond, C.B., Anderson, J.M., 1996. Electron transport to oxygen
667 mitigates against photoinactivation of photosystem II *in vivo*. Photosynth. Res. 50, 23-32.
- 668 Pelah, D., Shoseyov, O., Altman, A., 1995. Characterization of BspA, a major boiling-stable,
669 water-stress-responsive protein in aspen (*Populus tremula*). Tree Physiol. 15, 673-678.
- 670 Plomion, C., Lalanne, C., Claverol, S., Meddour, H., Kohler, A., Bogeat-Triboulot, M.B.,
671 Barre, A., Le Provost, G., Dumazet, H., Jacob, D., Bastien, C., Dreyer, E., de Daruvar, A.,
672 Guehl, J.M., Schmitter, J.M., Martin, F., Bonneu, M., 2006. Mapping the proteome of

- 673 poplar and application to the discovery of drought-stress responsive proteins. *Proteomics* 6,
674 6509-6527.
- 675 Ramagli, L.S., Rodriguez, L.V., 1985. Quantitation of microgram amounts of protein in two-
676 dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. *Electrophoresis* 6, 559-563.
- 677 Renaut, J., Lutts, S., Hoffmann, L., Hausman, J.F., 2004. Responses of poplar to chilling
678 temperatures: proteomic and physiological aspects. *Plant Biol.* 6, 81-90.
- 679 Sappl, P.G., Heazlewood, J.L., Millar, A.H., 2004. Untangling multi-gene families in plants
680 by integrating proteomics into functional genomics. *Phytochemistry* 65, 1517-1530.
- 681 Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., 1996. Mass spectrometric sequencing of
682 proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850-858.
- 683 Tausz, M., Sircelj, H., Grill, D., 2004. The glutathione system as a stress marker in plant
684 ecophysiology: is a stress-response concept valid? *J. Exp. Bot.* 55, 1955-1962.
- 685 Thiellement, H., Bahrman, N., Damerval, C., Plomion, C., Rossignol, M., Santoni, V., de
686 Vienne, D., Zivy, M., 1999. Proteomics for genetic and physiological studies in plants.
687 *Electrophoresis* 20, 2013-2026.
- 688 Thiellement, H., Zivy, M., Plomion, C., 2002. Combining proteomic and genetic studies in
689 plants. *J. Chromatogr. B*, 782, 137-149.
- 690 Thompson, A.J., Andrews, J., Mulholland, B.J., McKee, J.M.T., Hilton, H.W., Horridge, J.S.,
691 Farquhar, G.D., Smeeton, R.C., Smillie, I.R.A., Black, C.R., Taylor, I.B., 2007.
692 Overproduction of abscisic acid in tomato increases transpiration efficiency and root
693 hydraulic conductivity and influences leaf expansion. *Plant Physiol.* 143, 1905-1917.
- 694 Tschaplinski, T.J., Tuskan, G.A., Gunderson, C.A., 1994. Water-stress tolerance of black
695 cottonwood and eastern cottonwood clones and four of their hybrid progeny. I. Growth,
696 water relations and gas exchange. *Can. J. Forest Res.* 24, 364-371.

- 697 Tuskan, G.A., DiFazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N.,
 698 Ralph, S., Rombauts, S., Salamov, A., Schein, J., Sterck, L., Aerts, A., Bhalerao, R.R.,
 699 Bhalerao, R.P., Blaudez, D., Boerjan, W., Brun, A., Brunner, A., Busov, V., Campbell,
 700 M., Carlson, J., Chalot, M., Chapman, J., Chen, G.L., Cooper, D., Coutinho, P.M.,
 701 Couturier, J., Covert, S., Cronk, Q., Cunningham, R., Davis, J., Degroeve, S.,
 702 Déjardin, A., de Pamphilis, C., Detter, J., Dirks, B., Dubchak, I., Duplessis, S.,
 703 Ehlting, J., Ellis, B., Gendler, K., Goodstein, D., Gribskov, M., Grimwood, J.,
 704 Groover, A., Gunter, L., Hamberger, B., Heinze, B., Helariutta, Y., Henrissat, B.,
 705 Holligan, D., Holt, R., Huang, W., Islam-Faridi, N., Jones, S., Jones-Rhoades, M.,
 706 Jorgensen, R., Joshi, C., Kangasjärvi, J., Karlsson, J., Kelleher, C., Kirkpatrick, R.,
 707 Kirst, M., Kohler, A., Kalluri, U., Larimer, F., Leebens-Mack, J., Leplé, J.C.,
 708 Locascio, P., Lou, Y., Lucas, S., Martin, F., Montanini, B., Napoli, C., Nelson, D.R.,
 709 Nelson, C., Nieminen, K., Nilsson, O., Pereda, V., Peter, G., Philippe, R., Pilate, G.,
 710 Poliakov, A., Razumovskaya, J., Richardson, P., Rinaldi, C., Ritland, K., Rouzé, P.,
 711 Ryaboy, D., Schmutz, J., Schrader, J., Segerman, B., Shin, H., Siddiqui, A., Sterky, F.,
 712 Terry, A., Tsai, C.J., Uberbacher, E., Unneberg, P., Vahala, J., Wall, K., Wessler, S.,
 713 Yang, G., Yin, T., Douglas, C., Marra, M., Sandberg, G., Van de Peer, Y., Rokhsar,
 714 D., 2006. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). Science
 715 313, 1596-1604.
- 716 Valot, B., Gianinazzi, S., Dumas-Gaudot, E., 2004. Sub-cellular proteomic analysis of a
 717 *Medicago truncatula* root microsomal fraction. Phytochemistry 65, 1721-1732.
- 718 Vashisht, A.A., Pradhan, A., Tuteja, R., Tuteja, N., 2005. Cold and salinity stress-induced pea
 719 bipolar pea DNA helicase 47 is involved in protein synthesis and stimulated by
 720 phosphorylation with protein kinase C. Plant J. 44, 76-87.

- 721 Vashisht, A.A., Tuteja, N., 2006. Stress responsive DEAD-box helicases: A new pathway to
722 engineer plant stress tolerance. *Photochem. Photobiol.* 84, 150-160.
- 723 Vincent, D., Ergül, A., Bohlman, M.C., Tattersall, E.A.R., Tillett, R.L., Wheatley, M.D.,
724 Woolsey, R., Quilici, D.R., Joets, J., Schlauch, K., Schooley, D.A., Cushman, J.C., Cramer,
725 G.R., 2007. Proteomic analysis reveals differences between *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay
726 and cv. Cabernet Sauvignon and their responses to water deficit and salinity. *J. Exp. Bot.* 58,
727 1873-1892.
- 728 Voltas, J., Serrano, L., Hernandez, M., Peman, J., 2006. Carbon isotope discrimination, gas
729 exchange and stem growth of four Euramerican hybrid poplars under different watering
730 regimes. *New Forests* 31, 435-451.
- 731 Watson, B.S., Lei, Z., Dixon, R.A., Sumner, L.W., 2004. Proteomics of *Medicago sativa* cell
732 walls. *Phytochemistry* 65, 1709–1720.

Table 3. Protein identities of the 36 reliably identified spots which displayed systematically a significant genotype effect in both sampling dates and in both experiment locations.

Spot no. ^a	Assignment	Database ^b	TC or Gene Model ^c	# pept. ^d	Cover. ^e	Accession no. ^f	Species	Theoretical ^g		Experimental		ANOVA [G]							
												Glasshouse				Open field			
												D18 ^h		D28 ^h		D50 ⁱ		D86 ^h	
												p-value	A/C	p-value	A/C	p-value	A/C	p-value	A/C
Amino acid metabolism																			
3	Glutamine synthetase (EC 6.3.1.2)	PplGI	TC61228	11	31.4	A8WCU8	<i>Gossypium hirsutum</i>	39.1	5.8	42.7	5.7	0.00001	0.2	0.00000	0.2	0.00004	0.2	0.00000	0.3
122	Glutamine synthetase (EC 6.3.1.2)	JGI	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_VII0739	6	17.3	P14656	<i>Oryza sativa</i>	39.2	5.5	42.7	5.6	0.00295	1.2	0.00943	1.3	0.00025	1.7	0.00176	1.3
			estExt_Genewise1_v1.C_LG_V3325	7	17.1														
			estExt_fgenesh4_pm.C_LG_IV0266	10	20.8														
2	Glutathione S-transferase (EC 2.5.1.18)	PplGI	TC50068	3	8.6	O49235	<i>Glycine max</i>	25.6	6.2	25.9	5.5	0.00036	2.2	0.00426	1.7	0.00004	2.7	0.00147	5.1
			TC46989	2	10.2														
128	Glutathione S-transferase (EC 2.5.1.18)	PplGI	TC50068	5	15.2	O49235	<i>Glycine max</i>	25.6	6.2	25.7	5.4	0.00015	0.7	0.00001	0.5	0.01524	0.7	0.00029	0.7
			TC46989	2	10.2														
34	Dehydroascorbate reductase	PplGI	TC45985	10	32.0	A0S5Z5	<i>Sesamum indicum</i>	23.6	6.2	26.6	6.0	0.00002	0.7	0.00024	0.6	0.03040	0.5	0.00215	0.4
5	Probable 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase (EC 1.1.1.31)	JGI	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XIV0502	7	30.1	Q9SUC0	<i>Arabidopsis thaliana</i>	37.4	7.0	29.6	6.6	0.00008	0.3	0.01688	0.3	0.00002	0.3	0.00000	0.3
Carbohydrate metabolism																			
77	Enolase (EC 4.2.1.11)	PplGI	TC51929	7	23.0	Q1X8N5	<i>Prunus armeniaca</i>	15.9	5.1	40.5	6.5	0.01413	1.5	0.00498	1.5	0.01121	2.0	0.00995	1.5
			TC44867	3	9.5														
14	Galactokinase (EC 2.7.1.6)	JGI	estExt_Genewise1_v1.C_LG_X0656	10	28.4	Q9SEE5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	54.3	5.7	60.7	6.3	0.00092	2.1	0.00363	2.0	0.03061	1.8	0.00641	3.4
			estExt_fgenesh4_pg.C_LG_VIII0903	6	15.5														
4	NADP-dependent malic enzyme (EC 1.1.1.40)	JGI	estExt_Genewise1_v1.C_LG_XVIII2568	19	31.4	P34105	<i>Populus trichocarpa</i>	65.2	6.5	69.5	6.6	0.01431	0.4	0.00135	0.4	0.00009	0.3	0.00015	0.3
9	Phosphoglycerate kinase (EC 2.7.2.3)	PplGI	TC52423	6	20.9	O82158	<i>Populus nigra</i>	42.5	5.8	44.6	6.0	0.00499	0.5	0.02106	0.5	0.00996	0.4	0.00003	0.3
20	AT5g36790/f5h8_20 Putative phosphoglycolate phosphatase	JGI	gw1.X.1500.1	7	35.3	Q8L3U4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	39.8	6.9	32.7	5.9	0.00118	0.5	0.01167	0.6	0.00048	0.4	0.00011	0.4
51	Phosphoribulokinase (EC 2.7.1.19)	JGI	estExt_Genewise1_v1.C_290458	11	32.8	P27774	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	44.1	6.0	43.6	5.5	0.00000	2.4	0.00004	2.8	0.00182	1.7	0.00184	2.0
			estExt_Genewise1_v1.C_LG_III2205	7	26.4														
184	Phosphoribulokinase (EC 2.7.1.19)	PplGI	TC49994	3	11.4	A5BE19	<i>Vitis vinifera</i>	45.2	5.8	43.5	5.7	0.00020	1.7	0.01577	1.3	0.00202	1.3	0.01165	1.3
			TC82128	2	3.8														
41	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta	JGI	estExt_Genewise1_v1.C_LG_XIV0188	15	38.0	O82662	<i>Arabidopsis thaliana</i>	45.3	6.3	43.3	5.5	0.00040	2.2	0.00021	2.1	0.00713	2.0	0.00007	2.1
7	Triosephosphate isomerase (EC 5.3.1.1)	PplGI	TC65877	8	18.5	P48496	<i>Spinacia oleracea</i>	34.4	6.5	27.0	5.2	0.00171	1.9	0.00002	2.2	0.00943	3.7	0.00008	3.3
48	Beta-glucosidase (EC 3.2.1.21)	PplGI	TC58881	7	20.1	Q43014	<i>Prunus avium</i>	60.4	5.7	71.6	6.5	0.00017	0.6	0.00347	0.6	0.01949	0.5	0.00363	0.6
		JGI	gw1.70.26.1	7	13.7	P26205	<i>Trifolium repens</i>	48.3	8.4										
6	Beta-glucosidase (EC 3.2.1.21)	JGI	gw1.70.26.1	6	21.8	P26205	<i>Trifolium repens</i>	48.3	8.4	70.9	6.6	0.00295	0.5	0.00001	0.4	0.03827	0.3	0.00047	0.3
		PplGI	TC58881	6	26.1	Q43014	<i>Prunus avium</i>	60.4	5.7										
Defense																			
32	Heat shock 70 kDa protein	JGI	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_IX0400	18	28.4	Q01899	<i>Phaseolus vulgaris</i>	72.5	6.0	69.3	5.6	0.00045	2.8	0.00344	2.2	0.02337	1.8	0.00000	2.6
33	Heat shock 70 kDa protein	JGI	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_IX0400	11	21.7	Q01899	<i>Phaseolus vulgaris</i>	72.5	6.0	68.8	5.5	0.00196	0.4	0.00043	0.5	0.09760	0.6	0.00007	0.4
21	Putative chaperonin	PplGI	TC52796	5	22.8	Q9M888	<i>Arabidopsis thaliana</i>	58.9	5.8	68.4	6.4	0.00120	1.8	0.00000	2.4	0.00017	2.9	0.00002	2.3
			TC44218	4	19.3														
Energy metabolism																			
35	ATP synthase gamma chain (EC 3.6.3.14)	JGI	eugene3.00040033	6	20.8	P29790	<i>Nicotiana tabacum</i>	35.7	6.9	33.0	5.6	0.00010	3.2	0.00606	2.5	0.02746	1.8	0.00571	2.3
16	ATP synthase subunit beta (EC 3.6.3.14)	JGI	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_X1053	20	43.3	P29685	<i>Hevea brasiliensis</i>	60.3	6.0	55.3	5.6	0.00001	3.3	0.00000	4.4	0.00854	2.5	0.00075	2.7
142	ATP synthase subunit beta (EC 3.6.3.14)	PplGI	TC45873	7	31.2	P29685	<i>Hevea brasiliensis</i>	60.3	6.0	55.9	5.5	0.00000	0.7	0.00383	0.6	0.04031	0.7	0.00021	0.7
			TC46755	5	26.4														
			TC76839	4	9.0	Q9MU41	<i>Magnolia tripetala</i>	53.6	5.4										
			TC76077	3	5.0														
12	Oxygen-evolving enhancer protein 2	PplGI	TC43819	2	8.0	Q9SLQ8	<i>Cucumis sativus</i>	28.1	8.6	25.1	6.3	0.00000	5.6	0.00000	5.3	0.03809	2.4	0.00009	3.3

Table 3. (continued)

Spot no. ^a	Assignment	Database ^b	TC or Gene Model ^c	# pept. ^d	Cover. ^e	Accession no. ^f	Species	Theoretical ^g		Experimental		ANOVA [G]							
												Glasshouse				Open field			
												D18 ^h		D28 ^h		D50 ⁱ		D86 ^h	
								M _r (kDa)	pI	M _r (kDa)	pI	p-value	A/C	p-value	A/C	p-value	A/C	p-value	A/C
1	Oxygen-evolving enhancer protein 2	JGI	estExt_fgenes4_pg.C_LG_V1224	7	34.4	Q9SLQ8	<i>Cucumis sativus</i>	28.1	8.6	42.7	5.7	0.00001	0.2	0.00005	0.2	0.00182	0.2	0.00002	0.2
13	Oxygen-evolving enhancer protein 2	JGI	estExt_fgenes4_pg.C_LG_V1224	6	22.9	Q9SLQ8	<i>Cucumis sativus</i>	28.1	8.6	24.8	5.8	0.00059	0.5	0.00011	0.4	0.00240	0.4	0.00000	0.3
Genes and proteins expression																			
44	30S ribosomal protein S1	PplGI	TC52918	3	30.2	P29344	<i>Spinacia oleracea</i>	44.8	5.4	47.2	5.2	0.00261	0.5	0.02075	0.6	0.00671	0.6	0.00001	0.5
			TC74449	2	20.2														
43	Acylamino acid-releasing enzyme	PplGI	TC44261	5	25.6	Q84LM4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	83.9	5.6	77.0	5.7	0.02801	0.5	0.03024	0.4	0.00134	0.6	0.00000	0.5
24	Acylamino acid-releasing enzyme	PplGI	TC44261	9	28.6	Q84LM4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	83.9	5.6	77.8	5.9	0.00002	2.3	0.00340	1.9	0.04135	2.3	0.00956	2.4
30	Acylamino acid-releasing enzyme	PplGI	TC44261	7	22.0	Q84LM4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	83.9	5.6	77.6	5.8	0.00098	3.5	0.00006	2.6	0.01424	1.7	0.00001	2.7
8	Cell division protease ftsH homolog (EC 3.4.24.-)	JGI	gw1.XIV.2894.1	16	32.7	O78516	<i>Guillardia theta</i>	69.0	7.7	27.0	5.5	0.00530	0.4	0.00025	0.3	0.00330	0.4	0.00000	0.2
			estExt_fgenes4_pg.C_3210002	14	34.3														
			gw1.321.23.1	14	25.1														
245	Cell division protease ftsH homolog (EC 3.4.24.-)	JGI	estExt_fgenes4_pg.C_3210002	15	46.4	O78516	<i>Guillardia theta</i>	69.0	7.7	67.1	5.4	0.01566	0.9	0.01532	0.8	0.01230	0.9	0.03774	0.9
			gw1.XIV.2894.1	18	33.3														
163	MRNA-binding protein	PplGI	TC55023	17	42.2	Q7X998	<i>Nicotiana tabacum</i>	44.2	6.5	42.5	6.5	0.00802	0.8	0.00050	0.7	0.04537	0.7	0.01669	0.8
			TC45203	9	20.7														
Lipid metabolism																			
37	Putative GDSL-motif lipase/hydrolase	PplGI	TC51631	9	24.8	A9PGA4	<i>Populus trichocarpa</i>	42.4	4.9	46.2	5.0	0.00001	4.7	0.00000	6.1	0.01344	2.4	0.02276	1.9
			TC83493	4	12.0														
Secondary metabolism																			
10	Isoflavone reductase homolog (EC 1.3.1.-)	JGI	eugene3.00090496	11	32.4	P52578	<i>Solanum tuberosum</i>	33.9	6.2	37.1	5.5	0.00018	2.5	0.00006	3.0	0.00345	2.4	0.00082	3.3
Unclassified																			
29	T24D18.8 protein	JGI	eugene3.02080025	4	8.4	Q9S9N6	<i>Arabidopsis thaliana</i>	51.0	6.5	48.9	5.5	0.00008	2.0	0.00198	1.8	0.00035	2.3	0.00030	2.3
		PplGI	TC57543	2	17.7														

^a Excised spot number, refers to the spot number labelled in Fig. 3.

^b PplGI: hit on *Populus* Gene Index v3.0 database from the DFCI's Gene Indices, JGI: hit on the *Populus trichocarpa* v1.1 database from the Joint Genome Institute.

^c Tentative consensus (TC) identifier or gene model name given in the DFCI and the JGI databases, respectively.

^d Number of matching peptides (# pept.).

^e Ratio of the amino acids in detected peptides to total protein amino acids: coverage (Cover., %).

^f Accession number of the corresponding protein in the Uniprot database (Accession no.).

^g Theoretical molecular mass (M_r) and isoelectric point (pI) computed by the ExPASy website.

^h *p*-value given for the genotype effect [G] from the two-way ANOVA performed in glasshouse (D18 and D28) and in open field (D86). A/C represents the average ratio of the protein abundance (‘Agathe_F’ / ‘Cima’); any ratio >1 is indicated in bold.

ⁱ *p*-value given for the genotype effect [G] from the one-way ANOVA performed in open field at D50. A/C represents the average ratio of the protein abundance (‘Agathe_F’ / ‘Cima’; Supplementary Tables S4 and S5); any ratio >1, value is indicated in bold.

Table 4. Protein identities of the reliably identified spots which displayed a significant genotype by treatment interaction in glasshouse at D18 or in open field at D86.

Spot no. ^a	Assignment	Database ^b	TC or Gene Model ^c	# pept. ^d	Cover. ^e	Accession no. ^f	Species	Theoretical ^g		Experimental		ANOVA [G x T] ^h		
								M _r (kDa)	pI	M _r (kDa)	pI	Glasshouse		Open field
												D18	D28	D86
Amino acid metabolism														
5	Probable 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase (EC 1.1.1.31)	JGI	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_XIV0502	7	30.1	Q9SUC0	<i>Arabidopsis thaliana</i>	37.4	7.0	29.6	6.6	ns	ns	0.02646
34	Dehydroascorbate reductase	PplGI	TC45985	10	32.0	A0S5Z5	<i>Sesamum indicum</i>	23.6	6.2	26.6	6.0	0.02145	ns	ns
Carbohydrate metabolism														
20	AT5g36790/f5h8_20 Putative phosphoglycolate phosphatase	JGI	gw1.X.1500.1	7	35.3	Q8L3U4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	39.8	6.9	32.7	5.9	0.02833	ns	ns
7	Triosephosphate isomerase (EC 5.3.1.1)	PplGI	TC65877	8	18.5	P48496	<i>Spinacia oleracea</i>	34.4	6.5	27.0	5.2	ns	ns	0.03843
42	Phosphoglycolate phosphatase, putative	JGI	gw1.X.1500.1	13	54.5	Q8L3U4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	39.8	6.9	34.1	5.7	ns	ns	0.00749
233	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase	PplGI	TC50610	5	12.2	Q06B50	<i>Acer rubrum</i>	51.6	6.1	46.3	5.3	ns	ns	0.04408
			TC44916	5	17.0	Q19RP2	<i>Pachysandra terminalis</i>	34.5	5.6					
			TC87535	2	3.9	Q9AXG0	<i>Gossypium hirsutum</i>	48.4	5.1					
357	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain	PplGI	TC43608	7	18.6	A4GYR8	<i>Populus trichocarpa</i>	52.6	6.0	39.6	6.7	ns	ns	0.02464
672	2,3-Bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase (EC 5.4.2.1)	PplGI	TC73648	6	11.5	P35493	<i>Ricinus communis</i>	60.8	5.5	67.4	5.7	ns		0.01984
Defense														
89	Putative pathogenesis-related protein	PplGI	TC46197	2	11.2	Q6ZXH8	<i>Populus deltoides</i> × <i>P. maximowiczii</i>	13.3	5.1	13.9	5.5	ns	ns	0.00007
450	Heat shock protein 70	JGI	estExt_fgenesh4_pg.C_1500058	17	33.1	Q39641	<i>Cucumis sativus</i>	75.4	5.2	74.6	5.0	ns	ns	0.05050
			eugene3.00860035	13	25.0									
			TC75567	4	13.6									
Energy metabolism														
142	ATP synthase subunit beta (EC 3.6.3.14)	PplGI	TC45873	7	31.2	P29685	<i>Hevea brasiliensis</i>	60.3	6.0	55.9	5.5	0.00918	ns	ns
			TC46755	5	26.4									
			TC76839	4	9.0	Q9MU41	<i>Magnolia tripetala</i>	53.6	5.4					
			TC76077	3	5.0									
16	ATP synthase subunit beta (EC 3.6.3.14)	JGI	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_X1053	20	43.3	P29685	<i>Hevea brasiliensis</i>	60.3	6.0	55.3	5.6	0.02967	ns	ns
202	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit (EC 1.10.99.1)	JGI	grail3.0092006302	6	31.1	P26291	<i>Pisum sativum</i>	24.2	8.6	20.1	5.2	ns	ns	0.01812
232	Putative inorganic pyrophosphatase	PplGI	TC46600	2	9.4	Q75L10	<i>Oryza sativa</i>	24.2	5.7	27.5	5.6	ns	ns	0.02142
Genes and proteins expression														
513	Protein translocase subunit secA	JGI	gw1.XIV.2088.1	27	33.6	Q9SY10	<i>Arabidopsis thaliana</i>	115.1	6.1	93.2	5.8	0.02976	ns	ns
Transport and signal transduction														
289	Auxin-binding protein ABP20	PplGI	TC61184	4	20.1	O04011	<i>Prunus persica</i>	22.1	5.2	25.0	6.1	ns	ns	0.03655
			TC73247	4	16.0									
553	Auxin-binding protein ABP20	PplGI	TC61184	3	12.5	O04011	<i>Prunus persica</i>	22.1	5.2	25.2	6.1	ns	ns	0.01642

^a Excised spot number, refers to the spot number labelled in Fig. 3.

^b PplGI: hit on *Populus* Gene Index v3.0 database from the DFCI's Gene Indices, JGI: hit on the *Populus trichocarpa* v1.1 database from the Joint Genome Institute.

^c Tentative consensus (TC) identifier or gene model name given in the DFCI and the JGI databases, respectively.

^d Number of matching peptides (# pept.).

^e Ratio of the amino acids in detected peptides to total protein amino acids: coverage (Cover., %).

^f Accession number of the corresponding protein in the Uniprot database (Accession no.).

^g Theoretical molecular mass (M_r) and isoelectric point (pI) computed by the ExPASy website.

^h p-value given for the genotype by treatment interaction [G x T] from the two-way ANOVA performed in the glasshouse (D18 and D28) and in the open field (D86).

Table 5. Protein identities of the reliably identified spots which displayed a significant water deficit effect in glasshouse at D18 and/or in open field at D86.

Spot no. ^a	Assignment	Database ^b	TC or Gene Model ^c	# pept. ^d	Cover. ^e	Accession no. ^f	Species	Theoretical ^g		Experimental		ANOVA [T] ^h					
												Glasshouse				Open field	
								M _r (kDa)	pI	M _r (kDa)	pI	D18		D28		D86	
										p-value	WD/WW	p-value	RW/WW	p-value	WD/WW		
Amino acid metabolism																	
128	Glutathione S-transferase (EC 2.5.1.18)	PplGI	TC50068	5	15.2	O49235	<i>Glycine max</i>	25.6	6.2	25.7	5.4	0.02543	0.9	ns	-	ns	-
			TC46989	2	10.2												
138	1-Aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	JGI	eugene3.00141061	8	32.6	Q9MB74	<i>Populus canadensis</i>	36.2	5.6	41.3	5.7	0.03876	0.7	0.01796	0.8	ns	-
122	Glutamine synthetase (EC 6.3.1.2)	JGI	estExt_fgenesht4_pg.C_LG_VII0739	6	17.3	P14656	<i>Oryza sativa</i>	39.2	5.5	42.7	5.6	0.02160	0.9	ns	-	ns	-
			estExt_Genewise1_v1.C_LG_V3325	7	17.1												
			estExt_fgenesht4_pm.C_LG_IV0266	10	20.8												
551	Glutamine synthetase (EC 6.3.1.2)	JGI	estExt_Genewise1_v1.C_LG_X4165	10	31.3	Q9SPJ1	<i>Juglans nigra</i>	47.8	8.3	47.3	5.6	0.00900	0.9	ns	-	ns	-
			estExt_fgenesht4_pg.C_LG_VIII1790	8	24.1												
283	Glycine dehydrogenase (EC 1.4.4.2)	JGI	estExt_fgenesht4_pm.C_LG_VI0678	18	17.5	O49954	<i>Solanum tuberosum</i>	112.9	6.5	68.8	6.2	0.00280	0.8	ns	-	ns	-
598	2,4-D inducible glutathione S-transferase (EC 2.5.1.18)	PplGI	TC46989	4	13.8	O49235	<i>Glycine max</i>	25.6	6.2	24.8	5.5	0.01407	1.7	ns	-	ns	-
Carbohydrate metabolism																	
563	Fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13)	PplGI	TC46348	11	27.6	A7QE19	<i>Vitis vinifera</i>	42.8	7.6	39.4	5.7	0.01263	0.8	ns	-	ns	-
685	Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37)	JGI	eugene3.00081537	11	39.2	O48905	<i>Medicago sativa</i>	35.5	6.4	41.1	6.3	0.01017	0.9	0.03991	0.8	ns	-
702	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A (EC 1.2.1.13)	JGI	estExt_fgenesht4_pg.C_LG_XIV0805	6	18.6	P12858	<i>Pisum sativum</i>	43.3	8.8	41.5	5.8	0.04632	0.4	ns	-	ns	-
			gw1.II.3756.1	6	22.6												
145	Phosphoglycerate kinase (EC 2.7.2.3)	PplGI	TC52423	15	38.1	O82160	<i>Populus nigra</i>	50.3	8.5	45.0	6.2	0.02880	0.7	ns	-	0.00669	0.7
			TC47963	7	13.7												
548	6-Phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating (EC 1.1.1.44)	JGI	fgenesht4_pm.C_LG_III000453	8	24.0	Q9FFR3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	53.3	5.6	50.2	6.1	ns	-	ns	-	0.02795	0.8
636	GDP-D-mannose-3',5'-epimerase	PplGI	TC44723	5	20.8	A0EJL8	<i>Malpighia glabra</i>	42.6	5.8	48.5	6.4	ns	-	ns	-	0.02823	0.8
			TC44923	4	12.1												
728	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain precursor (EC 4.1.1.39)	PplGI	TC43608	9	20.5	A4GYR8	<i>Populus trichocarpa</i>	52.6	6.0	38.3	6.4	ns	-	ns	-	0.01131	0.8
541	Aldehyde dehydrogenase family 2 member B7 (EC 1.2.1.13)	JGI	estExt_fgenesht4_pm.C_LG_II0915	16	36.3	Q8S528	<i>Arabidopsis thaliana</i>	58.2	6.9	60.0	5.8	ns	-	ns	-	0.01038	0.8
		PplGI	TC62620	9	18.9												
716	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase	PplGI	TC44916	4	16.4	Q19RP2	<i>Pachysandra terminalis</i>	34.5	5.6	46.3	5.3	ns	-	ns	-	0.00788	1.3
			TC50610	3	8.1	Q06B50	<i>Acer rubrum</i>	51.6	6.1								
Defense																	
341	Heat shock protein 70	JGI	estExt_fgenesht4_pg.C_1500058	16	29.7	Q39641	<i>Cucumis sativus</i>	75.4	5.2	75.7	5.0	0.00151	1.6	ns	-	ns	-
438	Chaperonin CPN60-2	JGI	gw1.III.370.1	16	38.5	Q05046	<i>Cucurbita maxima</i>	61.1	6.3	62.3	5.5	0.03408	1.4	ns	-	0.00633	1.2
279	Peroxidase	PplGI	TC50817	6	17.6	Q94IQ1	<i>Nicotiana tabacum</i>	39.1	6.0	50.3	5.5	ns	-	ns	-	0.04022	0.7
			TC62621	4	23.1												
305	T-complex protein 1, alpha subunit	JGI	estExt_fgenesht4_pm.C_400011	15	29.9	Q8H9B2	<i>Bruguiera sexangula</i>	59.3	5.9	62.7	6.0	ns	-	ns	-	0.02387	0.7
225	20 kDa chaperonin	PplGI	TC49200	9	26.2	O65282	<i>Arabidopsis thaliana</i>	26.8	8.9	27.4	5.4	ns	-	ns	-	0.03275	0.9
		JGI	estExt_Genewise1_v1.C_LG_XVIII0619	10	46.9												
677	2-Cys peroxiredoxin	JGI	eugene3.00160660	5	26.8	Q93X25	<i>Pisum sativum</i>	28.9	6.0	25.1	5.1	ns	-	ns	-	0.01956	1.3
671	2-Cys peroxiredoxin	PplGI	TC52797	3	40.3	Q93X25	<i>Pisum sativum</i>	28.9	6.0	25.0	5.2	ns	-	ns	-	0.02985	1.2
Energy metabolism																	
399	Carbonic anhydrase (EC 4.2.1.1)	PplGI	TC45805	8	26.1	Q41088	<i>Populus tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>	35.0	7.0	27.2	6.5	0.01327	0.8	ns	-	ns	-
			TC75024	7	24.2												
			TC60284	7	24.9												
			TC84435	4	27.5												
25	Putative ATP synthase subunit beta	PplGI	TC55594	10	22.4					60.2	6.4	ns	-	0.00389	1.9	0.00935	0.5

Table 5. (continued)

Spot no. ^a	Assignment	Database ^b	TC or Gene Model ^c	# pept. ^d	Cover. ^e	Accession no. ^f	Species	Theoretical ^g		Experimental		ANOVA [T] ^h					
												Glasshouse				Open field	
												D18		D28		D86	
								M _r (kDa)	pI	M _r (kDa)	pI	p-value	WD/WW	p-value	RW/WW	p-value	WD/WW
Genes and proteins expression																	
482	Probable protein disulfide-isomerase A6 (EC 5.3.4.1)	JGI	estExt_fgenes4_pg.C_LG_XIV0627	6	26.3	P38661	<i>Medicago sativa</i>	37.3	5.3	39.3	5.8	0.01877	0.6	ns	-	ns	-
			estExt_fgenes4_pg.C_LG_III1784	5	15.9												
406	Eukaryotic initiation factor 4A-9 (EC 3.6.1.-)	PplGI	TC50353	9	17.0	Q40471	<i>Nicotiana tabacum</i>	46.8	5.5	49.3	5.6	0.01017	1.6	ns	-	ns	-
542	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	JGI	eugene3.00061983	7	13.4	P56821	<i>Nicotiana tabacum</i>	82.5	4.9	82.0	5.3	0.02358	1.6	ns	-	0.02960	0.5
		PplGI	TC72408	7	17.2	Q9C5Z1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	81.9	5.1								
		JGI	gw1.XVIII.2002.1	6	11.4												
513	Protein translocase subunit secA	JGI	gw1.XIV.2088.1	27	33.6	Q9SYI0	<i>Arabidopsis thaliana</i>	115.1	6.1	93.2	5.8	ns	-	ns	-	0.02534	0.8
723	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpC homolog	JGI	eugene3.00150843	22	31.0	P35100	<i>Pisum sativum</i>	102.7	6.6	82.7	5.7	ns	-	ns	-	0.02193	0.7
			eugene3.00120993	22	29.5												
704	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpC homolog	PplGI	TC55265	16	17.9	P35100	<i>Pisum sativum</i>	102.7	6.6	59.6	5.9	ns	-	ns	-	0.04197	0.6
		JGI	eugene3.00150843	16	17.9												
8	Cell division protease ftsH homolog (EC 3.4.24.-)	JGI	gw1.XIV.2894.1	16	32.7	O78516	<i>Guillardia theta</i>	69.0	7.7	27.0	5.5	ns	-	ns	-	0.01732	1.2
			estExt_fgenes4_pg.C_3210002	14	34.3												
			gw1.321.23.1	14	25.1												
245	Cell division protease ftsH homolog (EC 3.4.24.-)	JGI	estExt_fgenes4_pg.C_3210002	15	46.4	O78516	<i>Guillardia theta</i>	69.0	7.7	67.1	5.4	ns	-	ns	-	0.00299	1.2
			gw1.XIV.2894.1	18	33.3												
44	30S Ribosomal protein S1	PplGI	TC52918	3	30.2	P29344	<i>Spinacia oleracea</i>	44.8	5.4	47.2	5.2	ns	-	ns	-	0.01164	1.3
			TC74449	2	20.2												
472	Putative aminopeptidase (M1 aminopeptidase)	JGI	estExt_fgenes4_pm.C_LG_III0416	15	23.7	Q8H0S9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	99.2	5.4	83.6	5.6	ns	-	ns	-	0.02882	1.3
522	Elongation factor G	JGI	estExt_Genewise1_v1.C_LG_III0383	16	28.2	P34811	<i>Glycine max</i>	87.0	5.5	78.4	5.4	ns	-	ns	-	0.04684	1.1
		PplGI	TC55687	4	16.6												

^a Excised spot number, refers to the spot number labelled in Fig. 3.

^b PplGI: hit on *Populus* Gene Index v3.0 database from the DFCI's Gene Indices, JGI: hit on the *Populus trichocarpa* v1.1 database from the Joint Genome Institute.

^c Tentative consensus (TC) identifier or gene model name given in the DFCI and the JGI databases, respectively.

^d Number of matching peptides (# pept.).

^e Ratio of the amino acids in detected peptides to total protein amino acids: coverage (Cover., %).

^f Accession number of the corresponding protein in the Uniprot database (Accession no.).

^g Theoretical molecular mass (M_r) and isoelectric point (pI) computed by the ExPASy website.

^h *p*-value given for the treatment effect [T] from the two-way ANOVA performed in glasshouse (D18 and D28) and in open field (D86). WD/WW or RW/WW represents the average ratio of the protein abundance (Water deficit / Well-watered or Re-watered / Well-watered; Supplementary Tables S4 and S5).

Supplementary Material

Table S1. List of the eight spots resulted in multiple proteins per spot among the 44 distinguishing the two genotypes regardless of the sampling date and the experiment location.

Table S2. Disregarded spots which displayed significant water deficit effect in glasshouse at D18 and/or in open field at D86. Spots did not fulfill the MS/MS criteria (indicated as “no hit”) or resulted in multiple proteins per spot (indicated as “cross-contamination”).

Table S3. Disregarded spots which displayed significant genotype by treatment interaction in glasshouse at D18 and/or in open field at D86. Spots did not fulfill the MS/MS criteria (indicated as “no hit”) or resulted in multiple proteins per spot (indicated as “cross-contamination”).

Table S4. Mean normalized abundance of the 76 identified spots and their standard error (SE) assessed in the glasshouse experiment from well-watered (WW; $n = 3$), water deficit (WD; $n = 3$) and re-watered (RW; $n = 3$) plants at day 18 (D18) and day 28 (D28).

Table S5. Mean normalized abundance of the 76 identified spots and their standard error (SE) assessed in open field from well-watered (WW; $n = 3$), and water deficit (WD; $n = 3$) plants at day 50 (D50) and day 86 (D86).

Table S1. List of the eight spots resulted in multiple proteins per spot among the 44 distinguishing the two genotypes regardless of the sampling date and the experiment location.

Spot no. ^a	Assignment	Database ^b	TC or Gene Model ^c	# pept. ^d	Cover. ^e	Accession no. ^f	Species	Theoretical ^g		Experimental		ANOVA [G]							
												Glasshouse				Open field			
												D18 ^h		D28 ^h		D50 ⁱ		D86 ^h	
								M _r (kDa)	pI	M _r (kDa)	pI	p-value	A/C	p-value	A/C	p-value	A/C	p-value	A/C
49	Cysteine synthase (EC 2.5.1.47)	JGI	gw1.142.135.1	9	35.4	P47999	<i>Arabidopsis thaliana</i>	41.7	8.1	40.6	6.4	0.00001	0.5	0.00009	0.4	0.01058	0.6	0.00020	0.5
	Isoflavone reductase homolog P3	JGI	estExt_fgenes4_pm.C_LG_XIII0026	5	18.2	P52577	<i>Arabidopsis thaliana</i>	33.7	5.7										
	Hydrolase, carbon-nitrogen family protein	PplGI	TC43678	8	24.9	Q10R10	<i>Oryza sativa</i>	33.6	5.5										
	Flavonol 4'-sulfotransferase (EC 2.8.2.-)	PplGI	TC64850	8	20.2	P52837	<i>Flaveria chlorifolia</i>	37.3	6.2										
67	Xylulose kinase	PplGI	TC59573	10	19.4	Q9LT51	<i>Arabidopsis thaliana</i>	61.9	5.4	61.7	6.6	0.00184	0.6	0.00514	0.7	0.00012	0.6	0.02312	0.6
	Dihydrolipoyl dehydrogenase (EC 1.8.1.4)	PplGI	TC59738	10	23.6	A9PL03	<i>Populus tremuloides</i>	54.1	7.3										
46	Fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13)	PplGI	TC52996	4	14.1	Q6RUF6	<i>Glycine max</i>	38.4	6.8	43.1	6.5	0.00052	0.5	0.00057	0.6	0.01932	0.5	0.00167	0.5
			TC56059	4	11.2	A7QE19	<i>Vitis vinifera</i>	42.8	7.6										
	Patatin-like protein	PplGI	TC43835	7	19.6	O23784	<i>Cucumis sativus</i>	44.7	6.8										
	Pyruvate dehydrogenase	PplGI	TC51843	8	18.9	Q4JIY3	<i>Citrus paradisi</i>	43.8	8.1										
60	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit-related protein 4	PplGI	TC65088	5	15.3	Q8LB10	<i>Arabidopsis thaliana</i>	33.4	9.3	26.5	5.4	0.00310	1.8	0.00099	1.7	0.00194	1.7	0.00001	1.9
	Putative glutathione S-transferase	PplGI	TC46369	5	16.8	Q8H8E0	<i>Oryza sativa</i>	25.0	5.8										
18	Aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1)	JGI	gw1.IX.2730.1	9	35.5	O58489	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	44.6	5.9	45.5	5.9	0.00155	0.4	0.00179	0.5	0.00041	0.4	0.00018	0.4
							<i>Pisum sativum</i>	39.3	6.0										
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B (EC 1.2.1.13)	JGI	gw1.II.3569.1	6	21.8	P12859													
	Chloroplast phosphoglycerate kinase (EC 2.7.2.3)	JGI	estExt_fgenes4_pm.C_LG_VIII0335	7	19.3	Q42961	<i>Nicotiana tabacum</i>	42.6	5.6										
121	MRNA-binding protein	PplGI	TC45203	3	12.0	Q7X998	<i>Nicotiana tabacum</i>	44.2	6.5	42.3	6.4	0.00014	1.6	0.00027	1.3	0.01236	1.5	0.00070	1.4
	Chloroplast sedoheptulose-1,7-bisphosphatase	PplGI	TC64356	3	10.3	A8DUA7	<i>Morus alba</i>	42.5	6.1										
66	Putative uncharacterized protein	PplGI	TC44734	6	24.3	A5AUH5	<i>Vitis vinifera</i>	83.0	5.4	46.9	6.2	0.04733	1.4	0.01269	1.7	0.00641	1.7	0.00398	1.8
	Acetoacetyl-CoA thiolase	PplGI	TC51392	3	9.4	Q2L8A7	<i>Picrorhiza kurrooa</i>	41.4	6.3										
170	Ribulose-5-phosphate-3-epimerase	PplGI	TC78781	2	7.9	Q8S4X2	<i>Pisum sativum</i>	29.9	8.3	31.7	6.1	0.01244	0.8	0.00051	0.6	0.00227	0.7	0.00238	0.7
	Putative uncharacterized protein	PplGI	TC58936	3	8.3	A9P8P9	<i>Populus trichocarpa</i>	32.6	5.7										

^a Excised spot number, refers to the spot number labelled in Fig. 3.

^b PplGI: hit on *Populus* Gene Index v3.0 database from the DFCI's Gene Indices, JGI: hit on the *Populus trichocarpa* v1.1 database from the Joint Genome Institute.

^c Tentative consensus (TC) identifier or gene model name given in the DFCI and the JGI databases, respectively.

^d Number of matching peptides (# pept.).

^e Ratio of the amino acids in detected peptides to total protein amino acids: coverage (Cover., %).

^f Accession number of the corresponding protein in the Uniprot database (Accession no.).

^g Theoretical molecular mass (M_r) and isoelectric point (pI) computed by the ExPASy website.

^h *p*-value given for the genotype effect [G] from the two-way ANOVA performed in glasshouse (D18 and D28) and in open field (D86). A/C represents the average ratio of the protein abundance ('Agathe_F' / 'Cima'); any ratio >1 is indicated in bold.

ⁱ *p*-value given for the genotype effect [G] from the one-way ANOVA performed in open field at D50. A/C represents the average ratio of the protein abundance ('Agathe_F' / 'Cima'); any ratio >1, value is indicated in bold.

Table S2. Disregarded spots which displayed significant water deficit effect in glasshouse at D18 and/or in open field at D86. Spots did not fulfill the MS/MS criteria (indicated as “no hit”) or resulted in multiple proteins per spot (indicated as “cross-contamination”).

Spot no. ^a	Assignment	Database ^b	TC or Gene Model ^c	# pept. ^d	Cover. ^e	Accession no. ^f	Species	Theoretical ^g		Experimental		ANOVA [T] ^h					
								M _r (kDa)	pI	M _r (kDa)	pI	Glasshouse				Open field	
												D18		D28		D86	
												p-value	WW/WD	p-value	WW/RW	p-value	WW/WD
No hit																	
273	no hit	-	-	-	-	-	-	-	-	24.4	6.1	ns	-	ns	-	0.01253	1.6
Spots with cross contamination																	
347	Putative flavanone 3-beta-hydroxylase	PplGI	TC62889	5	11.7	Q9ZSA7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	39.3	5.5	43.1	6.1	0.02851	0.7	ns		ns	-
	Fructose-1,6-bisphosphatase, cytosolic (EC 3.1.3.11)	PplGI	TC77367	5	15.6	P46276	<i>Solanum tuberosum</i>	37.3	5.8								
	Mitochondrial glycine decarboxylase complex P-protein	PplGI	TC73412	5	4.9	A9PL02	<i>Populus tremuloides</i>	115.1	6.9								
637	Superoxide dismutase [Mn] (EC 1.15.1.1)	PplGI	TC83353	2	11.1	P35017	<i>Hevea brasiliensis</i>	25.8	7.1	25.9	6.2	0.01194	0.8	ns	-	ns	-
	Benzoquinone reductase (EC 1.6.5.7)	PplGI	TC44348	2	9.0	A3F7Q3	<i>Gossypium hirsutum</i>	21.7	6.1								
502	Ribulose-1,5 bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit N-methyltransferase (EC 2.1.1.127)	JGI	eugene3.01730002	6	17.3	P94026	<i>Nicotiana tabacum</i>	56.0	5.3	49.9	5.9	0.02293	1.4	ns	-	ns	-
	Peroxidase (EC 1.11.1.7)	PplGI	TC50817	4	12.7	Q94IP4	<i>Manihot esculenta</i>	26.2	8.4								
	Adenylosuccinate synthetase (EC 6.3.4.4)	JGI	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_XV10748	6	16.1	Q96529	<i>Arabidopsis thaliana</i>	53.0	6.7								
	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase (EC 2.7.7.27)	PplGI	TC44255	8	17.7	Q9AT06	<i>Cicer arietinum</i>	56.4	6.5								
699	Putative uncharacterized protein	PplGI	TC52321	8	31.7	A9PET2	<i>Populus trichocarpa</i>	42.4	5.0	44.8	5.9	0.00685	1.4	ns	-	ns	-
			TC44170	5	16.7												
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B (EC 1.2.1.13)	JGI	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_V0707	9	29.0	P12859	<i>Pisum sativum</i>	48.1	7.6								
613	Peroxidase 12 (EC 1.11.1.7)	JGI	estExt_Genewise1_v1.C_LG_V0405	3	24.4	Q96520	<i>Arabidopsis thaliana</i>	39.6	8.6	53.8	5.6	0.04797	1.6	ns	-	ns	-
	26S protease regulatory subunit 6B homolog	PplGI	TC43691	9	22.8	P54778	<i>Solanum tuberosum</i>	46.5	5.5								
	ATP synthase subunit beta (EC 3.6.3.14)	PplGI	TC76839	7	14.3	Q9MU41	<i>Magnolia tripetala</i>	53.6	5.4								
		JGI	eugene3.63990002	5	25.7	Q9BBS3	<i>Lotus japonicus</i>	55.8	5.2								
264	Ferredoxin-dependent glutamate synthase, chloroplastic (EC 1.4.7.1)	JGI	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_XV10276	13	11.1	Q43155	<i>Spinacia oleracea</i>	165.4	5.8	76.0	6.2	0.01084	1.4	ns	-	0.05048	0.7
			estExt_fgenesh4_pg.C_LG_V10304	15	11.9	Q9ZNZ7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	179.9	6.1								
	GTP-binding protein TypA	JGI	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_V10439	9	16.5	Q6SYB1	<i>Trifolium pratense</i>	74.9	6.8								
	Isoamylase-like protein	JGI	fgenesh4_pg.C_LG_I1000936	6	7.7	Q9M0S5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	79.6	5.4								
	Carbonic anhydrase (EC 4.2.1.1)	PplGI	TC45805	2	6.1	Q41089	<i>Populus tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>	35.0	7.0	29.1	6.6	ns	-	ns	-	0.00468	0.5
261	Thioredoxin H-type 4 (Trx-H-4)	JGI	gw1.V.1928.1	3	15.2	Q39239	<i>Arabidopsis thaliana</i>	13.1	5.3								
	Dihydroxy-acid dehydratase (AT3g23940/F14O13_13)	JGI	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_I110598	7	13.1	Q9LIR4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	64.9	5.9	63.0	5.8	ns	-	ns	-	0.02439	0.4
343	Polyphenol oxidase (EC 1.10.3.1) (EC 1.14.18.1)	PplGI	TC51509	5	10.5	Q66NX4	<i>Populus jackii</i>	64.9	6.1								
	26S protease regulatory subunit 7	PplGI	TC45085	4	10.0	O64982	<i>Prunus persica</i>	47.6	6.4	50.1	6.4	ns	-	ns	-	0.02955	0.6
	UDP-sulfoquinovose synthase, chloroplastic precursor (EC 3.13.1.1)	JGI	estExt_fgenesh4_pg.C_LG_V11540	8	22.2	Q84K16	<i>Spinacia oleracea</i>	53.8	8.2								
464	Putative uncharacterized protein	PplGI	TC44028	4	11.8	A9PI59	<i>Populus trichocarpa</i>	42.9	8.4	28.3	6.1	ns	-	ns	-	0.00062	0.5
	Carbonic anhydrase (EC 4.2.1.1)	PplGI	TC75024	3	11.1	Q41088	<i>Populus tremula</i> × <i>P. tremuloides</i>	35.0	7.0								
	Putative uncharacterized protein F9G14_100	PplGI	TC48451	3	14.8	Q9LZ06	<i>Arabidopsis thaliana</i>	27.1	5.1								

Table S2. (continued)

Spot no. ^a	Assignment	Database ^b	TC or Gene Model ^c	# pept. ^d	Cover. ^e	Accession no. ^f	Species	Theoretical ^g		Experimental		ANOVA [T] ^h					
												Glasshouse		Open field			
								M _r (kDa)	pI	M _r (kDa)	pI	D18		D28		D86	
												p-value	WW/WD	p-value	WW/RW	p-value	WW/WD
146	At1g14810/F10B6_6 (Aspartate-semialdehyde dehydrogenase, putative)	JGI	eugene3.00081272	7	26.4	Q8VY14	<i>Arabidopsis thaliana</i>	40.7	6.5	42.0	5.8	ns	-	ns	-	0.00249	0.7
			eugene3.00100987	5	17.3												
	GRP-like protein 2	JGI	TC44402	9	24.0	Q0PW29	<i>Gossypium hirsutum</i>	40.8	6.0								
	Alpha-1,4-glucan-protein synthase [UDP-forming] (EC 2.4.1.-)	JGI	grail3.0155001302	8	26.0	O04300	<i>Pisum sativum</i>	41.6	5.7								
66	Putative uncharacterized protein	PplGI	TC44734	6	24.3	A5AUH5	<i>Vitis vinifera</i>	83.0	5.4	46.9	6.2	ns	-	ns	-	0.04770	1.4
	Acetoacetyl-CoA thiolase	PplGI	TC51392	3	9.4	Q2L8A7	<i>Picrorhiza kurrooa</i>	41.4	6.3								
407	Phosphoribulokinase (EC 2.7.1.19)	PplGI	TC49994	7	19.4	A5BE19	<i>Vitis vinifera</i>	45.2	5.8	42.9	5.4	ns	-	ns	-	0.00523	1.1
			TC64219	3	13.9												
60	T6H22.14 protein	JGI	eugene3.00012981	4	17.3	Q9SGT3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	45.4	5.6								
	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit-related protein 4	PplGI	TC65088	5	15.3	Q8LB10	<i>Arabidopsis thaliana</i>	33.4	9.3	26.5	5.4	ns	-	ns	-	0.01957	1.2
	Putative glutathione S-transferase	PplGI	TC46369	5	16.8	Q8H8E0	<i>Oryza sativa</i>	25.0	5.8								

^a Excised spot number, refers to the spot number labelled in Fig. 3.

^b PplGI: hit on *Populus* Gene Index v3.0 database from the DFCI's Gene Indices, JGI: hit on the *Populus trichocarpa* v1.1 database from the Joint Genome Institute.

^c Tentative consensus (TC) identifier or gene model name given in the DFCI and the JGI databases, respectively.

^d Number of matching peptides (# pept.).

^e Ratio of the amino acids in detected peptides to total protein amino acids: coverage (Cover., %).

^f Accession number of the corresponding protein in the Uniprot database (Accession no.).

^g Theoretical molecular mass (M_r) and isoelectric point (pI) computed by the ExPASy website.

^h p-value given for the treatment effect [T] from the two-way ANOVA performed in glasshouse (D18 and D28) and in open field (D86). WD/WW or RW/WW represents the average ratio of the protein abundance (Water deficit / Well-watered or Re-watered / Well-watered).

Table S3. Disregarded spots which displayed significant genotype by treatment interaction in glasshouse at D18 and/or in open field at D86. Spots did not fulfill the MS/MS criteria (indicated as “no hit”) or resulted in multiple proteins per spot (indicated as “cross-contamination”).

Spot no. ^a	Assignment	Database ^b	TC or Gene Model ^c	# pept. ^d	Cover. ^e	Accession no. ^f	Species	Theoretical ^g		Experimental		ANOVA [G x T] ^h		
								M _r (kDa)	pI	M _r (kDa)	pI	Glasshouse		
												D18	D28	Open field
												p-value	p-value	p-value
No hit														
15	no hit									32.3	6.2	0.04124	ns	0.00340
384	no hit									21.6	5.2	ns	ns	0.02313
303	no hit									36.7	5.8	ns	ns	0.02799
154	no hit									25.8	6.6	ns	ns	0.00506
267	no hit									25.4	6.6	ns	ns	0.02860
Spots with cross contamination														
67	Xylulose kinase	PplGI	TC59573	10	19.4	Q9LT51	<i>Arabidopsis thaliana</i>	61.9	5.4	61.7	6.6	0.02038	0.00044	ns
	Dihydrolipoyl dehydrogenase (EC 1.8.1.4)	PplGI	TC59738	10	23.6	A9PL03	<i>Populus tremuloides</i>	54.1	7.3					
49	Cysteine synthase (EC 2.5.1.47)	JGI	gw1.142.135.1	9	35.4	P47999	<i>Arabidopsis thaliana</i>	41.7	8.1	40.6	6.4	0.02343	ns	ns
	Isoflavone reductase homolog P3	JGI	estExt_fgenes4_pg.C_LG_XIII0026	5	18.2	P52577	<i>Arabidopsis thaliana</i>	33.7	5.7					
	Hydrolase, carbon-nitrogen family protein	PplGI	TC43678	8	24.9	Q10R10	<i>Oryza sativa</i>	33.6	5.5					
	Flavonol 4'-sulfotransferase (EC 2.8.2.-)	PplGI	TC64850	8	20.2	P52837	<i>Flaveria chlorifolia</i>	37.3	6.2					
291	Putative uncharacterized protein	PplGI	TC43741	3	30.2	A9PBW3	<i>Populus trichocarpa</i>	28.2	5.7	28.5	5.4	ns	ns	0.04326
	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase (EC 2.1.1.104)	PplGI	TC84560	2	20.2	Q43095	<i>Populus tremuloides</i>	27.9	5.3					
264	Ferredoxin-dependent glutamate synthase (EC 1.4.7.1)	JGI	estExt_fgenes4_pg.C_LG_XVI0276	13	11.1	Q43155	<i>Spinacia oleracea</i>	165.4	5.8	76.0	6.2	ns	ns	0.03881
			estExt_fgenes4_pg.C_LG_VI0304	15	11.9	Q9ZNZ7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	179.9	6.1					
	GTP-binding protein TypA	JGI	estExt_fgenes4_pg.C_LG_VI0439	9	16.5	Q6SYB1	<i>Trifolium pratense</i>	74.9	6.8					
	Isoamylase-like protein	JGI	fgenes4_pg.C_LG_II000936	6	7.7	Q9M0S5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	79.6	5.4					
290	ATP synthase subunit gamma	PplGI	TC44930	5	15.4	P26360	<i>Ipomoea batatas</i>	35.6	9.1	29.2	5.4	ns	0.00513	0.00027
	Putative uncharacterized protein	PplGI	TC45274	9	41.7	Q8LAP2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	34.4	8.5					
	Putative uncharacterized protein	PplGI	TC60877	6	36.5	A5BY58	<i>Vitis vinifera</i>	31.2	5.0					
481	Major latex protein homologue	PplGI	TC50437	4	19.0	Q7Y082	<i>Datisca glomerata</i>	15.9	5.5	14.5	5.7	ns	ns	0.00857
	Putative uncharacterized protein	PplGI	TC51631	4	14.8	A9PGA4	<i>Populus trichocarpa</i>	42.4	4.9					
534	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B (EC 1.2.1.13)	JGI	estExt_fgenes4_pg.C_LG_V0707	13	41.4	P12858	<i>Pisum sativum</i>	43.3	8.8	47.2	6.5	0.00593	ns	ns
	Acetoacetyl-CoA thiolase	PplGI	TC51392	8	21.4	Q2L8A7	<i>Picrorhiza kurroo</i>	41.4	6.3					
		JGI	estExt_Genewise1_v1.C_LG_XIV3807	8	23.4	Q8S4Y1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	41.4	6.5					
653	Myo-inositol 1-phosphate synthase	PplGI	TC44050	2	11.1	Q1HG62	<i>Passiflora edulis f. flavicarpa</i>	56.3	5.4	58.7	5.5	ns	0.02795	0.00626
			TC45173	3	9.9									
	Uncharacterized protein At2g37660	JGI	estExt_Genewise1_v1.C_LG_IV2634	2	5.0	O80934	<i>Arabidopsis thaliana</i>	34.9	8.4					

^a Excised spot number, refers to the spot number labelled in Fig. 3.

^b PplGI: hit on *Populus* Gene Index v3.0 database from the DFCI's Gene Indices, JGI: hit on the *Populus trichocarpa* v1.1 database from the Joint Genome Institute.

^c Tentative consensus (TC) identifier or gene model name given in the DFCI and the JGI databases, respectively.

^d Number of matching peptides (# pept.).

^e Ratio of the amino acids in detected peptides to total protein amino acids: coverage (Cover., %).

^f Accession number of the corresponding protein in the Uniprot database (Accession no.).

^g Theoretical molecular mass (M_r) and isoelectric point (pI) computed by the ExPASy website.

^h p-value given for the genotype by treatment interaction [G x T] from the two-way ANOVA performed in the glasshouse (D18 and D28) and in the open field (D86).

Table S4. Mean normalized abundance of the 76 identified spots and their standard error (SE) assessed in the glasshouse experiment from well-watered (WW; $n = 3$), water deficit (WD; $n = 3$) and re-watered (RW; $n = 3$) plants at day 18 (D18) and day 28 (D28).

Spot number	D18								D28							
	'Agathe F'				'Cima'				'Agathe F'				'Cima'			
	WW	SE	WD	SE	WW	SE	WD	SE	WW	SE	RW	SE	WW	SE	RW	SE
1	1461129.6	615723.1	1623731.7	438665.9	7046760.1	516269.5	5796568.3	39025.6	1161460.0	197946.9	1580670.3	448051.0	6190622.6	887015.1	6265896.7	690702.6
2	9984564.3	1252582.2	10984688.7	315602.7	4998243.6	598392.9	4662407.5	1277636.0	7285552.3	637576.6	8653065.3	1084183.3	3701117.8	417843.7	5522034.5	1067621.7
3	1944670.8	301455.3	3529312.7	1716544.0	13885117.9	1135820.0	12364399.1	324986.4	1653908.0	178816.3	1887909.5	368739.9	14885057.6	598843.5	3754734.0	810332.4
4	733994.0	317780.7	810516.6	170496.1	2194466.2	414131.0	1625078.8	481056.1	878672.3	105277.8	1078116.1	82943.3	2648060.3	349901.3	1812993.6	362561.3
5	353361.9	99353.1	306544.9	41213.7	1063112.0	118018.4	940334.4	91096.3	321532.1	42816.4	249495.2	64772.8	1019176.0	399474.9	828309.4	120571.5
6	214692.4	70759.0	128888.3	43046.4	367028.3	41948.4	382426.8	25856.5	155468.7	20871.6	155272.2	9781.1	330530.9	16794.2	462713.5	36708.9
7	6381969.2	886462.0	7095480.9	702642.7	3015205.9	553799.0	4038616.5	588832.1	6566672.5	733990.0	6696323.8	333772.3	2756881.3	38622.5	3169420.8	163924.1
8	551669.5	223647.9	612997.8	96135.7	1292100.3	259069.3	1423919.0	202589.7	430817.2	89858.3	487825.3	57605.7	1350824.9	128517.6	1451762.2	251293.7
9	1220577.3	154591.2	1607510.8	120961.3	2528151.6	480133.3	2898190.5	435972.5	1338074.2	239424.9	1578485.0	804244.0	3742228.7	307533.3	2016536.8	432276.7
10	1750099.3	230896.4	1677263.5	157308.1	671444.0	147150.0	677969.6	38202.4	1423866.9	168317.5	1261580.8	155906.7	444333.8	1801.8	463804.0	38102.6
12	15987259.1	540728.6	15857191.8	185536.9	2608613.2	962196.1	3076768.0	808426.9	15373232.6	602076.0	12980161.1	1544065.7	2173380.9	374353.3	3207530.7	347032.8
13	6119652.4	1392581.6	6209519.9	813053.6	13378040.3	1864255.8	12544086.1	299526.7	4748175.0	421366.7	4753242.0	1472790.2	13882847.8	1076639.5	12268757.3	1438340.4
14	1470888.9	218881.0	1321845.0	170007.9	743626.8	70144.1	576739.5	37311.7	1381908.1	239664.2	1948479.4	153577.2	869012.3	280156.9	831799.9	39136.6
16	5133473.9	112694.8	6128523.3	285596.0	2223934.4	698443.3	1144934.1	186243.0	4883252.1	212682.7	5702842.6	189648.2	833301.0	78365.8	1549815.7	171503.4
20	390162.4	87302.0	215826.4	37802.4	541716.5	76068.2	728657.0	58823.0	263070.4	42945.0	260368.5	32866.4	454561.0	68925.0	496357.2	98009.4
21	2901446.1	316141.8	2949961.0	318430.1	1654540.0	137731.2	1683783.8	207910.8	3315013.1	206412.9	3900815.2	274750.7	1298273.2	95639.4	1749708.4	73705.1
24	2122713.6	196653.1	2355653.1	34252.7	1146982.3	159763.2	816019.5	124103.2	2372288.1	330736.8	1741518.5	37256.4	1074771.7	291860.6	1084704.6	174438.0
25	1047148.2	163266.8	863090.1	103925.6	503112.3	19083.1	662864.5	107550.8	548582.1	175883.3	1116591.8	50056.5	281201.5	17306.6	461589.4	32775.6
29	1995711.1	142393.6	2045392.2	187510.7	939213.3	66653.3	1082371.7	119548.2	1959364.2	170128.8	2013771.5	302789.2	1200343.6	83708.4	1045345.1	138594.5
30	769132.0	149312.0	843249.6	146760.3	228726.1	83044.0	226596.4	39553.8	926630.6	37133.5	585396.8	92246.5	333646.1	67766.7	248029.7	24808.3
32	1124006.4	132349.0	1471486.5	161671.7	435373.6	180423.9	485914.8	99428.7	1320129.3	171068.3	1196425.6	123598.0	564810.9	217636.1	572168.7	146227.4
33	528568.5	118467.1	457237.3	110585.4	1239616.9	201561.2	1237932.9	205614.9	835125.5	137477.2	413343.8	55071.5	1102952.1	104803.0	1528459.7	158204.7
34	2813021.8	232505.7	2550747.2	132065.6	3680045.4	32637.1	4214217.8	74062.2	2050793.0	219221.5	2142717.4	68666.6	3796479.7	107168.9	3480976.9	417572.0
35	1961162.8	282116.9	1744361.7	165911.5	522689.9	110838.9	623678.1	102326.1	1519716.8	419086.9	1909105.2	242529.1	813442.3	222311.2	567561.2	150697.4
37	23401371.0	3591434.0	29429306.7	739813.4	5216220.4	1338431.7	5924750.1	865972.9	23220021.2	1532542.8	22764726.9	366112.8	4369522.8	1326208.9	3109270.8	309170.2
41	2657323.8	261348.8	3580927.5	342623.4	1235618.7	334062.3	1585138.1	221915.0	3516596.5	52788.1	2895714.3	230711.0	1451433.6	193818.0	1640874.6	418635.9
42	810417.3	127447.7	783188.5	42990.4	2026428.0	118263.1	1467837.0	64082.2	5078127.9	427611.0	5729195.1	808463.1	1769179.2	272407.6	2522876.9	471576.4
43	269697.9	79096.9	283518.8	2151.1	457814.7	80330.7	654413.9	175661.0	327959.4	44256.0	275587.4	35210.1	547530.1	85856.0	483696.3	281457.5
44	684719.0	162705.7	673178.2	130539.7	1068053.9	99373.2	1422836.5	126285.9	601031.0	160637.3	644242.4	123854.4	1228880.4	121446.1	896065.7	194663.9
48	2509406.8	361315.1	3155222.4	208333.8	4861913.5	259429.7	4526459.2	278362.6	3208907.9	260736.8	2637970.9	684106.0	5799650.7	660763.8	4366961.5	376187.2
51	6463753.3	88832.9	5895180.6	429125.1	2602259.9	235509.2	2628769.0	217102.0	6375113.1	392428.5	6328852.4	898243.2	1965463.8	184892.6	2547731.3	245932.6
77	2461376.9	130434.3	2452470.5	25471.5	1998325.7	425940.6	1287167.2	269212.7	1905686.9	204193.7	1700097.8	122641.6	1147244.5	148837.3	1316118.5	99086.0
89	2587410.9	299707.8	2274996.4	399868.3	6151857.0	2689540.0	3397692.2	753164.6	3420785.6	999052.3	2533966.3	504730.3	4052053.5	1103428.5	2847284.9	792559.8
122	31492064.4	2057991.9	28830432.2	881293.9	27042294.1	1247958.3	22245182.9	544932.7	29604200.3	965540.9	27502007.3	2417285.1	21938649.8	1319350.4	23606566.5	1755592.7
128	9238350.7	253920.2	8650660.5	343025.7	14828255.6	1120855.7	11824207.8	528517.5	7321208.3	191559.0	7342066.4	546803.5	14084518.6	1061511.0	12843200.8	476643.1
138	3209542.9	427407.9	2293935.4	417577.6	5137413.4	892457.6	3212852.0	411848.2	2555759.5	124086.0	2197257.9	83016.5	3872222.8	342678.9	3063029.3	123264.5
142	4619117.2	248215.5	5009881.3	170210.2	7371043.3	100837.3	6487913.7	196394.6	3926962.8	417168.1	4281351.9	433138.5	7844202.3	1228355.0	6909985.0	882846.8
145	4711757.1	420981.9	3258083.3	617865.5	4715793.7	395587.6	3767288.1	316173.6	3151435.3	177165.7	3897637.3	58435.1	3705836.6	778439.1	3860798.1	1002324.3
163	4369562.4	172917.3	4221630.1	116342.8	5190361.6	520218.2	5470910.1	186334.0	3959719.8	242773.0	4376545.4	145496.4	6505162.7	253467.5	5626341.2	558886.1
184	20862536.6	2090134.3	20873732.6	385424.2	11855357.9	1252659.7	12835783.2	940614.1	25461995.1	2564287.9	18048392.3	737074.1	14247652.8	1399280.1	18430686.9	1875804.3
202	4739546.0	439305.5	4978899.1	225757.1	3446548.2	720695.1	3106266.4	516854.8	2805309.4	497380.6	3915734.7	277401.4	2217242.4	316657.3	2258640.8	122885.6
225	8989217.3	1561769.1	8747575.1	303485.9	8894940.1	389647.6	9354421.4	708841.3	7205912.9	1418586.1	8575248.4	308642.2	6883177.0	2691889.4	8330165.3	874160.0
232	4000773.6	222701.0	4071163.8	455038.0	3300085.8	352694.2	3545821.1	257565.7	2452468.1	218475.0	3048979.4	575153.6	3354097.5	148873.6	3387518.8	315150.3
233	5185308.0	300102.0	5029241.1	173833.4	4574693.0	70962.3	4028278.6	347389.2	4159067.4	721397.0	4409005.3	53622.6	4762225.1	583535.4	36	

Table S4. (continued)

Spot number	D18								D28							
	'Agathe F'				'Cima'				'Agathe F'				'Cima'			
	WW	SE	WD	SE	WW	SE	WD	SE	WW	SE	RW	SE	WW	SE	RW	SE
513	410724.5	52149.3	637251.4	127001.6	667183.6	106323.3	382441.9	85897.6	803553.2	147456.8	931635.7	258731.5	892182.4	236170.8	936827.8	130013.6
522	7267439.7	77704.9	7407517.3	83673.9	7490211.2	415050.5	6942129.6	1026805.7	7292899.6	1116196.2	7675191.6	548884.9	7845982.3	1177689.3	7656957.2	567751.4
541	2232620.2	425485.2	2273285.3	62443.6	2342697.5	433542.3	2037232.6	137725.2	2338058.0	357799.5	2173645.7	238386.8	2512844.4	453218.9	2419801.0	211904.5
542	535336.3	54998.5	1032919.9	170572.5	590346.8	75244.0	761111.8	140083.9	1102705.4	371419.5	760548.3	170772.4	652705.9	169550.2	909461.3	90968.9
548	1784025.8	658178.5	1790123.5	419609.7	1624603.1	528236.9	1376041.8	149202.1	1923149.6	172481.6	2171461.1	122075.4	1340700.4	186458.6	1541361.8	327984.2
551	25368665.3	1490821.4	22971891.0	832601.0	25150150.0	330388.7	21371019.4	472973.7	22360926.8	2153077.4	25951429.5	1147672.4	25183332.8	617208.7	25044986.2	2288208.5
553	5246648.4	458215.7	4514014.0	96261.4	3501854.4	979488.1	4470749.0	242617.0	4365474.7	420170.8	4787120.1	768491.4	3823577.2	454000.2	4660979.0	202881.9
563	10356950.6	373780.3	9125051.7	359763.2	10742920.9	464899.0	8743114.9	731591.4	8949460.9	429760.6	9791858.4	1211645.5	10945891.8	2155472.1	9637916.5	1616250.8
598	991862.8	227547.7	1795993.0	68706.4	1217970.5	252014.3	1953232.2	349718.1	2105244.2	434123.3	1559281.3	183568.0	1558783.1	382806.1	1125511.5	135024.5
636	1041848.3	71645.5	1272685.5	67179.9	1373329.6	146161.4	1092096.8	182179.5	1122904.9	372851.0	1415902.3	70158.2	1935895.6	206874.4	1660626.5	97018.7
671	4043317.8	121243.3	4043216.1	597882.5	4208767.2	383179.7	5439319.6	393656.3	3219713.6	727804.0	3890444.8	168988.0	3722469.8	609845.0	5053404.4	117807.9
672	3765389.5	136448.0	3823931.7	288942.1	4173348.1	696583.8	3648037.5	290327.8	3367524.1	466141.1	3374545.8	198785.3	3669364.1	639114.0	3423145.7	236786.2
677	13983971.1	840103.6	11586419.0	3955597.9	15504106.6	1629765.9	16087258.3	490969.2	13853578.9	722013.7	13840217.3	634595.8	13517636.7	4382244.4	16372818.9	2179116.5
685	8981256.1	441634.5	8503360.0	178516.5	9915289.3	397264.4	7999299.5	357461.2	8519158.1	588023.4	7520460.4	277210.0	10418091.9	668217.8	8453703.6	770147.6
702	2139537.8	228204.4	758397.8	358180.6	3884018.1	1514852.8	1646616.5	270315.8	1221090.2	157950.5	1876850.1	505425.1	1965054.2	503793.7	2163397.3	621046.1
704	3899472.1	979150.5	3542195.1	273240.1	3389766.8	735513.5	2531678.6	198536.5	2848171.6	257243.7	4102215.6	984584.2	2545974.3	121447.2	4008479.6	1674466.9
716	1853504.4	71032.1	2098679.1	157827.5	2448409.4	188173.6	1904839.4	274421.1	1847112.7	94989.1	1541684.7	444262.0	2002809.1	362473.2	1936160.0	369721.1
723	2254658.7	811452.4	2297890.2	56434.1	1899076.3	354364.2	1784273.4	110802.3	3903557.3	669293.5	2139005.6	32127.1	2709341.5	570140.7	3256986.5	271420.0
728	9143258.3	1072055.3	9572867.4	1416236.3	8074234.8	1073643.5	6892156.5	677130.8	13495556.5	1185383.4	9653661.3	482661.7	7981037.5	462579.5	8771524.4	897984.8

Table S5. Mean normalized abundance of the 76 identified spots and their standard error (SE) assessed in open field from well-watered (WW; $n = 3$), and water deficit (WD; $n = 3$) plants at day 50 (D50) and day 86 (D86).

Spot number	D50				D86							
	'Agathe F'		'Cima'		'Agathe F'				'Cima'			
	WW	SE	WW	SE	WW	SE	WD	SE	WW	SE	WD	SE
1	4053793.0	2043225.1	19516829.7	1870274.1	3321750.6	940232.8	2729024.3	553182.0	15566216.5	1923374.6	14744101.2	1665551.9
2	10618547.7	6272856.8	3902068.3	523841.5	14885894.5	5994007.0	25947552.1	3347941.9	3946367.4	342039.5	4098361.2	799627.5
3	8300164.7	1108211.1	43929515.8	2339217.1	12826717.3	1472382.7	9507829.1	2768495.2	42009862.8	1021258.1	43198200.8	3576240.8
4	1790250.0	156997.2	6478454.6	383444.9	1398515.3	236098.9	9506761.9	273238.3	5467547.4	964144.7	5937262.8	728588.0
5	1960363.0	15178.6	7396724.9	351311.7	2014716.1	262931.5	1421961.5	464487.4	5873172.7	197750.1	7140689.8	381558.2
6	2560668.5	1107932.7	9411451.4	2215397.3	2123482.8	719003.7	1745088.7	382505.2	6632532.8	1192730.7	7809996.1	1182218.8
7	15757288.1	2867660.8	4258916.8	1427321.2	10540158.4	2254327.2	17447824.4	1240797.6	4099602.6	213775.3	4424108.5	639826.5
8	2439735.1	378820.1	5814704.2	544299.5	1303710.0	327819.8	1497414.0	96390.3	5372737.2	57562.1	6585653.7	318036.7
9	1876535.1	397171.7	4405973.8	518506.7	1060161.6	124330.9	1192561.0	241479.9	5078456.4	590285.2	3797778.3	440542.3
10	2016936.9	541351.3	824923.7	143289.3	2219947.9	358502.7	2078235.2	418148.5	802890.3	107826.8	492291.4	135529.6
12	36823071.1	7671706.7	15171396.6	4218733.8	31081814.1	2079299.2	33422251.9	610305.5	6903509.9	1110082.4	12751108.5	5727704.0
13	8183799.7	2179612.0	20732476.3	1233780.1	6022997.7	624143.5	6536447.7	1016517.6	17837937.8	1208074.2	19001095.2	716654.1
14	1556157.6	87467.3	889131.8	206011.5	2946900.6	836742.8	1570659.5	121352.5	670569.1	168656.2	659658.5	124580.1
16	19158459.5	1948636.3	7551863.2	2182838.6	20223824.6	2427341.1	15939832.8	3429015.4	5786030.1	343185.6	7480133.4	1034606.5
20	1620742.6	103971.1	4409609.0	327462.5	1771986.3	281880.2	1460972.6	249577.9	3416533.4	442829.6	4251347.3	252062.0
21	17571418.8	808045.6	6136563.1	989498.0	14110598.4	1371526.9	13094096.9	535246.0	6643768.5	591754.6	5066888.9	818570.4
24	5169568.3	1161093.8	2228289.9	455976.0	5819246.1	1795124.6	7035508.9	919696.9	2299988.1	450056.5	2972280.7	863168.4
25	2024688.6	654048.3	1056912.8	244813.6	4278409.7	316054.2	2237055.0	870357.1	1905900.8	176663.6	688865.6	171058.3
29	3300037.3	233227.7	1424275.0	95144.4	2693577.5	198983.6	3527393.3	327676.9	1305653.2	126621.3	1388246.3	416487.6
30	2215308.1	368470.7	1294553.9	428412.1	2753488.2	288653.6	2900229.2	125551.0	1132304.9	59606.9	940776.3	183235.7
32	3145236.9	266792.7	1783520.9	349989.0	4538019.1	371334.5	4146712.8	223986.5	1697820.3	97329.9	1676704.7	56846.1
33	1968122.3	747762.8	3307400.9	200262.7	1844358.8	570248.8	1005923.2	81973.1	3804374.6	159906.4	3791495.4	224168.9
34	5793307.6	1931638.8	10758570.8	369198.4	5425424.6	1967764.4	3705451.8	1394026.2	9600859.7	342073.3	10796090.7	696996.1
35	11417572.5	1720945.3	6450538.3	708447.3	16490009.9	3949254.6	12013470.4	1251007.0	6065919.0	828284.3	6512153.0	541765.6
37	23174574.9	3713139.1	9803187.2	1728273.4	23399284.7	4693249.0	17167201.5	4963055.3	11314270.5	256213.3	9734734.7	1200316.0
41	14339161.4	1090173.8	7111172.6	1340570.0	11001028.2	362899.6	13571024.8	1641064.6	5982678.6	186352.4	5784670.5	334405.8
42	3897168.5	1813369.4	4825446.3	261099.1	1093557.6	84200.7	1357992.0	435325.5	2788189.7	226230.6	4941729.6	187218.4
43	2959973.2	236319.0	5110111.8	262257.3	2980528.2	294349.4	2665968.0	127875.5	6132810.6	30231.6	5956630.8	208399.4
44	3614329.4	221242.6	5992628.9	489389.3	2122246.0	242621.2	3493388.6	400200.0	5629374.9	432761.2	6415927.7	183288.6
48	10225386.4	1054255.6	21098984.0	3010660.9	8782016.3	1182798.8	8551505.5	472772.7	14613556.3	2585575.4	16502331.5	1791407.2
51	20915501.1	3926797.2	12257873.5	1516039.3	20368866.9	2390310.6	20559600.3	3715224.2	9646638.9	733085.2	10627000.8	657589.8
77	9187647.8	1299852.0	4519661.6	475244.2	9800501.8	668008.0	7094354.3	978997.4	5479348.9	993109.9	6000721.4	460378.8
89	6502052.4	2473011.0	8794164.4	2328018.0	5529289.2	493433.5	4931915.9	149284.8	12093151.3	381367.4	5660923.3	450509.4
122	101177956.5	3407165.4	60517002.8	3296948.5	82191519.7	3998507.2	90600051.0	6348586.4	66751157.6	2326343.1	63463590.8	4906350.2
128	26760986.5	2301622.8	35755906.7	1533767.8	24608998.7	685850.3	25621945.0	2125283.2	34238836.7	1423376.1	40578627.5	3030407.0
138	6775649.4	812247.0	7988756.8	410983.7	7002973.7	517365.4	6906491.9	1501224.8	12373943.0	789290.4	9379126.8	1137514.1
142	12423407.1	1316496.3	17077916.1	1254216.1	13239677.2	1294647.9	14075245.6	948966.5	18694400.6	608299.6	20628880.5	750794.0
145	4436541.3	1499508.4	6271378.6	187753.3	6809177.1	809795.8	3394701.6	530305.9	7787317.7	259236.4	6700929.0	730725.1
163	12099262.8	1249560.0	16168433.1	1096754.7	8031578.4	384384.5	9583329.2	800814.4	10385542.7	179425.2	12765215.2	1596935.9
184	58831249.3	2392450.1	44126196.4	1463141.9	44602193.6	3816247.1	50688448.0	5259668.5	34793804.2	2184079.8	37375290.8	1878433.5
202	27956773.6	4545665.4	19812341.9	2513907.5	18178158.5	467841.8	27176727.3	1646947.7	17748077.6	1344189.9	19990391.9	684231.2
225	24416221.2	1242557.4	20287535.9	2538569.1	24824179.5	2116726.2	20161597.6	813979.3	19305929.3	802957.0	17662261.8	446012.6
232	13008985.7	1679493.5	13791458.1	268797.3	9601812.6	668392.9	9504240.5	711301.6	10476905.2	311064.0	13565726.7	446133.6
233	22840160.8	922697.8	18285503.9	1795155.5	19448849.7	151314.7	24537830.7	1018389.6	18751219.6	609149.3	19328024.0	1463944.3
245	24220603.5	745627.2	26886783.0	303180.4	22234669.9	270845.1	24705971.4	709493.0	23238023.9	1038306.8	27956175.4	1127908.4
279	4370839.4	1460680.1	2990091.1	430822.3	6104478.5	1189349.2	4750609.3	459809.8	5547885.3	622152.6	3265105.8	445543.3
283	4320150.0	469957.4	13529509.3	3335108.1	14754554.6	4728083.1	15317419.2	3255086.2	15505859.6	3451796.4	15969582.7	3624507.5
289	21921072.9	3528647.5	26130234.9	3420486.9	11526782.8	1667226.5	15862760.4	2201442.3	11173084.0	2037812.3	24671719.0	1257544.2
305	2844749.2	139700.3	2162147.3	665953.8	3125329.1	545755.3	2338077.2	247048.6	2685793.9	74669.3	1778615.7	81587.3
341	9715606.1	724670.3	8902685.7	722286.0	5795522.4	1493453.6	14571048.8	4741693.2	9101890.6	1996998.6	6778037.5	1207952.3
357	66502617.9	15195569.5	106665915.1	14128511.6	68572889.6	10683559.0	88585299.5	6056153.3	85276171.2	4412036.0	68563320.5	2579885.1
399	12269251.4	72467.7	12973832.4	1492357.8	6759415.2	1424567.4	5084626.7	1021964.0	6218966.7	1865390.7	7293702.6	1515532.9
406	580723.2	35112.8	635228.9	56929.3	833365.6	63004.8	957228.6	200333.8	1292494.4	219196.6	876823.8	78572.7
438	5354149.4	1072085.5	5096153.8	439131.4	3733303.1	284561.6	4834898.6	288728.3	4815050.0	307067.3	5686495.2	175378.2
450	15507185.0	1029181.1	11874975.1	1242911.8	8004324.2	317928.0	14902076.4	1167673.7	10678849.1	1443158.1	11842133.0	1634364.8
472	5621839.6	316109.9	5240433.4	206092.0	3290600.3	588922.5	4900081.7	287005.6	4751499.8	243371.5	5165938.1	301116.8
482	8004997.5	1480862.1	8374549.6	1706817.0	6661114.0	613447.4	7561815.2	332356.5	7684929.7	960283.5	3929659.7	198981.1

Table S5. (continued)

Spot number	Open field											
	D50				D86							
	'Agathe F'		'Cima'		'Agathe F'				'Cima'			
	WW	SE	WW	SE	WW	SE	WD	SE	WW	SE	WD	SE
513	1883376.5	162832.8	2245482.1	759397.5	1647956.5	113459.9	1242618.5	97099.0	1502507.5	149261.6	1241351.3	120263.0
522	26680068.6	1209113.8	24224081.4	424009.1	23170802.0	843603.8	26622530.8	874878.8	21918680.5	1776279.7	24549992.0	1442417.6
541	6089689.4	518274.3	6828449.3	1773300.4	8729472.8	637454.6	6610111.4	489886.7	7545542.9	896006.0	5656034.2	6430.0
542	455131.0	122925.1	768802.5	253575.6	828705.2	244238.8	410855.3	71648.0	639204.6	48256.8	345393.3	73580.2
548	4695546.3	160458.1	4206123.6	409815.0	3909494.6	167358.5	2978386.1	132183.4	4570502.0	343243.6	3520196.9	619342.8
551	55582373.0	7571320.5	53104771.6	1579478.1	48736695.1	2244266.7	51817163.9	4237321.8	45819117.7	1853222.6	46482099.6	3802628.4
553	18189679.7	1738407.8	19693452.7	2146598.0	13354410.0	741855.8	15441078.4	761682.9	9206255.0	1369987.1	20008227.8	2299918.0
563	25028139.8	7058195.5	32752167.1	2704909.9	26053733.7	1818748.3	24588471.5	1290590.2	23274616.7	544223.4	22261255.9	6263350.5
598	2379150.5	617202.8	2747015.1	994135.3	2330929.4	285083.6	2135137.0	346080.4	1942088.3	84056.3	2346731.6	432595.3
636	8810025.7	35222.5	8386559.8	1935689.5	6866726.9	666206.2	4414601.0	562931.9	6275817.9	783661.9	5579317.9	112491.4
671	9094699.9	1398373.9	7909575.7	503214.7	6475571.7	600466.5	8180484.8	633636.0	7123977.3	416085.1	8247180.9	463709.7
672	5287814.5	757110.1	5653963.0	266580.9	6115776.5	221619.9	7274193.8	337215.8	7125589.5	145089.4	6466186.1	456716.7
677	50296442.0	5608122.9	42298170.6	6437627.4	27822096.5	2130529.1	39891488.1	2027783.8	35720558.4	3796143.5	41191376.7	3639314.3
685	24777667.5	2027435.8	26136471.3	1367938.9	25025150.5	3272443.2	22961169.5	1361899.2	24295245.2	1920572.5	22825562.0	2415394.8
702	1630914.5	691396.0	3203276.0	1236882.0	3992013.5	1586378.0	4591582.8	523638.6	4365377.0	1023356.2	2627222.7	790738.3
704	4488588.1	618816.0	6099678.9	907553.2	8156398.0	2046471.6	5540285.7	652577.5	7693952.8	933822.2	4530176.2	476536.2
716	2999925.1	154282.1	2504017.0	234311.5	2523214.7	82899.5	3244479.8	229246.9	2764425.8	244113.0	3596128.1	275610.5
723	4216372.3	926526.9	4756657.9	958415.4	5805591.8	612234.6	3948621.0	129537.4	5450029.0	895972.8	3774109.0	597382.4
728	14871551.2	2192366.9	16040021.9	3697345.3	15759086.6	476787.6	13744708.0	1546930.4	16175514.0	349023.4	11806476.9	1030877.4

Publication III

Analyse du protéome foliaire de huit géotypes *Populus ×euramericana* : les variations génétiques de la réponse à la sécheresse et de l'efficacité d'utilisation de l'eau impliquent des protéines liées aux processus photosynthétiques

Analyse du protéome foliaire de huit génotypes *Populus ×euramericana* : les variations génétiques de la réponse à la sécheresse et de l'efficacité d'utilisation de l'eau impliquent des protéines liées aux processus photosynthétiques

Auteurs

Ludovic Bonhomme, Romain Monclus, Delphine Vincent, Sabine Carpin, Anne-Marie Lomenech, Christophe Plomion, Franck Brignolas and Domenico Morabito

Manuscrit soumis à *Proteomics*

Résumé

La variation génétique du protéome foliaire a été étudiée chez huit génotypes *Populus ×euramericana* contrastés pour leur discrimination isotopique vis-à-vis du carbone (Δ), un estimateur indirect de l'efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau (W_i). Les plants de peupliers ont été cultivés en pépinière dans deux parcelles jumelles ; une sécheresse a été induite par un arrêt d'arrosage d'une des deux parcelles pendant 86 jours alors que la seconde a été régulièrement irriguée. Parmi 863 spots reproductibles révélés par électrophorèse bidimensionnelle, une interaction significative entre génotypes et traitement a été observée pour 62 protéines parmi lesquelles près de 65 % étaient impliquées dans le cycle de Calvin ou dans les chaînes de transport d'électron des thylakoïdes. Les autres protéines étaient impliquées dans les réponses au stress oxydatif et aux métabolismes des acides aminés et des protéines. Par ailleurs, des corrélations significatives entre abondance de protéines et Δ ont été également observées pour 37 protéines en condition hydrique non limitante et pour 8 protéines en condition hydrique limitante. L'abondance d'isoformes de RuBisCO activase était corrélée négativement avec Δ indépendamment du régime hydrique, suggérant qu'une forte W_i pourrait être influencée par de plus fortes abondances de RuBisCO activase. En condition témoin, l'abondance d'enzymes impliquées dans la fixation du carbone était également corrélée négativement avec Δ alors que l'abondance d'enzymes impliquées dans la photorespiration ou la respiration était positivement corrélée avec Δ .



Manuscript ID: pmic.200900047

Title: Leaf proteome analysis of eight *Populus ×euramericana* genotypes: genetic variation in drought response and in water-use efficiency involves photosynthesis-related proteins

Authors:

Bonhomme, Ludovic
Monclus, Romain
Vincent, Delphine
Carpin, Sabine
Lomenech, Anne-Marie
Plomion, Christophe
Brignolas, Franck
MORABITO, Domenico

Date Submitted: 26-Jan-2009

Manuscrit accepté le 8 juin 2009

Leaf proteome analysis of eight *Populus ×euramericana* genotypes: genetic variation in drought response and in water-use efficiency involves photosynthesis-related proteins

Authors

Ludovic Bonhomme^{1,2}, Romain Monclus^{1,2,3†}, Delphine Vincent⁴, Sabine Carpin^{1,2}, Anne-Marie Lomenech⁵, Christophe Plomion⁴, Franck Brignolas^{1,2} and Domenico Morabito^{1,2*}

Addresses

¹ Université d'Orléans, UFR-Faculté des Sciences, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, UPRES EA 1207, rue de Chartres, BP 6759, 45067 Orléans Cedex 02, France

² INRA, USC2030 'Arbres et Réponses aux Contraintes Hydrique et Environnementales' (ARCHE), F-45067 Orléans, France

³ INRA, Nancy Université, UMR1137 INRA-UHP 'Ecologie et Ecophysiologie Forestières', IFR 110 'Génomique, Ecophysiologie et Ecologie Fonctionnelle', INRA Nancy, 54280 Champenoux, France

⁴ INRA, UMR1202 BIOGECO, Equipe de Génétique, 69 route d'Arcachon, F-33612 Cestas, France

⁵ Pôle Protéomique de la Plateforme Génomique Fonctionnelle Bordeaux, Université Bordeaux 2, F-33076 Bordeaux, France

[†] *in memoriam* (September 2006)

* **Correspondence**

Dr. Domenico Morabito,

Université d'Orléans, UFR-Faculté des Sciences, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des
Grandes Cultures, UPRES EA 1207 ; INRA, USC2030 'Arbres et Réponses aux Contraintes
Hydrique et Environnementales' (ARCHE), rue de Chartres, BP 6759, 45067 Orléans Cedex
02, France.

Email: domenico.morabito@univ-orleans.fr

Fax: +33-2 38 49 40 89

Abbreviations

Δ , carbon isotope discrimination; **A**, net CO₂ assimilation; **aBiom**, aboveground biomass;
APX, ascorbate peroxidase; **ATP**, adenosine 5'-triphosphate; **C_M**, carbon content per mass
unit; **efG**, chloroplastic elongation factor G; **g_s**, stomatal conductance to water vapour; **GSH**,
glutathione; **HSC**, Heat-shock cognate; **HSP**, heat-shock protein; **MDHAR**,
monodehydroascorbate reductase; **NADPH**, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate;
N_M, nitrogen content per mass unit; **PDI**, protein disulfide-isomerase; **ROS**, reactive oxygen
species; **RuBisCO**, Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase; **RuBP**, Ribulose-1,5-
bisphosphate; **SLA**, specific leaf area; **Wi**, intrinsic water-use efficiency; **WUE**, water-use
efficiency.

Keywords

**Carbon isotope discrimination / Chloroplast / Open field experiment / RuBisCO activase
/ Poplar**

Abstract

Genetic variation of leaf proteome in drought response was investigated among eight *Populus ×euramericana* genotypes contrasting for their leaf carbon isotope discrimination (Δ), an estimate of intrinsic water-use efficiency (Wi). Plants were grown in open field on two similar plots. Drought was induced by an 86-day irrigation cessation on one plot while a second plot remained regularly irrigated. Using 2-DE, 863 reproducible spots were detected; about 60% presented at least one significant effect i.e., Treatment, Genotype and/or Genotype by Treatment interaction effect. A significant Genotype by Treatment interaction was detected for 62 reliably identified proteins among which, about 65% consisted in chloroplast-associated proteins either involved in the Calvin cycle or in the electron transport chains. The other proteins were involved in oxidative stress, amino acid or protein metabolisms. Correlations between protein abundance and Δ variations were found for 45 reliably identified proteins. The abundance of RuBisCO activase isoforms scaled negatively with Δ regardless of the treatment, suggesting that a large Wi could be due to higher abundance of RuBisCO activase. Under control condition, abundance of enzymes involved in carbon fixation was also negatively correlated with Δ , whereas abundance of enzymes involved in photorespiration or respiration was positively correlated with Δ .

1 Introduction

Soil water availability is one of the most important factors affecting plant growth and productivity in forest ecosystems [1]. In the context of global change, long-lived species such as trees, will have to cope with increased intensities and frequencies of soil water limitation [2]. In temperate regions, poplars are certainly the fastest growing tree species. Their high productivity is associated with a tight dependency upon water availability [3-5]. Therefore, the maintenance of a sustained productivity in area where soil water availability could be subjected to seasonal shortage will require the selection of genetic resources with greater drought tolerance and/or improved water-use efficiency (WUE).

The concept of water deficit tolerance, when applied to cultivated species, has been defined as the ability to limit the decrease in biomass production in response to a moderate water deficit [6]. In spite of an overall sensitivity to drought in species belonging to the *Populus* genus, a consistent genetic variation has been reported in their pattern of drought response [7-10]. This variation encompasses several physiological and morphological traits, such as stomatal closure [11, 12], osmotic adjustment [12, 13], leaf expansion, leaf abscission, and root/shoot ratio [8, 14-17]. WUE is defined at the whole-plant level as the ratio between biomass production and water consumption. One functional trait that could be of interest as an index to improve or maintain productivity under reduced water availability is the intrinsic water-use efficiency (W_i), i.e. the ratio between net CO_2 assimilation and stomatal conductance to water vapour pressure. W_i can be indirectly estimated at a leaf life time-scale via carbon isotope discrimination (Δ) [18]. Δ occurs during photosynthesis because of the slower diffusion of $^{13}CO_2$ than $^{12}CO_2$ through the stomata, and because of the activity of RuBisCO, which favours the carboxylation from $^{12}CO_2$. Since stomatal diffusion and carboxylation are linked through the leaf intercellular CO_2 concentration, a linear and negative correlation between Δ and W_i has been evidenced in cereals [18, 19] and trees [20,

21]. In response to drought, Δ decreases primarily due to a reduction of stomatal conductance; a moderate drought is usually conducted to strengthen genetic variations in term of Δ . A large genetic variation of Δ has been already reported in poplars [21-25]. WUE is hypothesized to confer a fitness advantage under reduced soil water availability [21, 26]. Therefore, an improved WUE would be of considerable advantage to sustain plant productivity in moderately drought-prone areas [27-31].

The genome sequence of *Populus trichocarpa* provided considerable key genomic resources for gene and protein identification [32], placing poplar as a relevant model for studying the molecular basis of drought tolerance and WUE in trees. Notwithstanding extensive physiological descriptions of drought tolerance and Δ in *Populus* species, little information has been reported to explain the genetic variation at the molecular level [33-35]. Until now, drought-responsive proteins have been found based on the analysis of a particular genotype [36-39]. To our knowledge, no proteomic study has dealt with Δ , and its molecular basis is still in its infancy. Although many studies have identified QTL for Δ [40-46], its molecular dissection has been recently initiated in *Arabidopsis* in which ERECTA and HARDY genes have been reported to play a role in stomatal behaviour [47, 48].

In this study, a proteomic analysis was conducted from mature leaves collected from eight *P. ×euramericana* genotypes contrasting for their leaf carbon isotope discrimination [24]. The objectives of this study were twofold: (i) to assess the degree of genetic control of leaf proteome plasticity in drought response and (ii) to evaluate the relationship between genetic variation in leaf protein abundance and genetic variation in leaf Δ under control and drought conditions. Therefore, genotype differences and drought responses occurring in leaf proteome were evaluated using 4 year-old rooted cuttings held irrigated or submitted to a moderate drought for 86 days in an open field design.

Table 1. Abbreviations, origins and values of Δ measured under well-watered condition during 2003 [24] of the eight *Populus ×euramericana* genotypes studied.

Genotype	Abbreviation	Origin	Δ measured in 2003 (‰)	
			General mean	SEM
Agathe_F	A	USA	19.18	0.14
Cima	C	Italy	20.59	0.12
Eco_28	E	Italy	21.51	0.11
Flevo	F	The Netherlands	19.37	0.10
I45-51	I	Italy	19.63	0.12
Luisa_Avanzo	L	Italy	20.58	0.15
Pannonia	P	Hungary	18.73	0.16
Robusta	R	France	20.79	0.15

2 Materials and methods

2.1 Plant material and growth conditions

Eight *Populus deltoides* Bartr. ex Marsh. × *Populus nigra* L. (*P. ×euramericana*) genotypes were selected for their contrasting leaf carbon isotope discrimination measured in 2003 by Monclus et al. [24] (Table 1). The experiment was conducted in an open field trial including 29 *P. ×euramericana* genotypes [21]. Briefly, homogeneous 25-cm long woody-stem cuttings were planted in January 2001 in an open field localised at INRA Orléans (47°46' N, 1°52' E; 110 m above sea level). Two similar plots were established at 15 m spacing. Each plot was divided into five randomized complete blocks (one cutting of each genotype per block). Cuttings were coppiced at the end of 2001, 2002, and 2003. From bud flush to June 15, 2004, the two plots were irrigated every second day (20 mm of water) with overhead sprinklers. From this date to the end of the growing season, one of the plots ceased to be watered while the second remained irrigated and served as control. Soil water availability was monitored from predawn leaf water potential (Ψ_{wp} , MPa) on a mature leaf using a Scholander-type pressure chamber as described in Monclus et al. [21]. On September 9th, the non-irrigated plot displayed a 0.3 MPa decrease in Ψ_{wp} relative to the control plot [21]. On this date, the three youngest fully expanded leaves per plant were collected from three control plants and three drought stressed plants (i.e. three biological replicates per genotype and per condition). Sampled leaves were immediately frozen in liquid N₂ and stored at -80°C until protein extraction. One fully expanded leaf was also collected from each control and drought stressed plants for ecophysiological measurements (i.e. five biological replicates per genotype and per condition).

2.2 Trait measurements

Specific leaf area (SLA, cm² g⁻¹) was assessed from six calibrated discs (0.8 cm radius) cut from lamina of the fully expanded leaves, and dried at 60°C over 2 days. Carbon isotope composition ($\delta^{13}\text{C}$), as well as carbon (C_M ; mg g⁻¹_{DW}) and nitrogen contents (N_M ; mg g⁻¹_{DW}) of bulk leaf material were assessed from 1 mg homogeneous dry powder obtained from the oven-dried calibrated discs. These analyses were conducted from continuous flux isotope ratio mass spectrometer (Delta S; Finnigan MAT, Bremen, Germany) as described by Monclus et al. [21]. $\delta^{13}\text{C}$ was calculated relative to Pee Dee Belemnite limestone standard as described in Craig [49]:

$$\delta^{13}\text{C} = \frac{(R_{\text{sample}} - R_{\text{standard}})}{(R_{\text{standard}})} \times 1000 \text{ [‰]}, (1)$$

where R_{sample} and R_{standard} are the ¹³C/¹²C ratio in plant tissue and the standard, respectively. Carbon isotope discrimination (Δ , ‰) was calculated according to Farquhar and Richards [18], as:

$$\Delta = \frac{(\delta_{\text{air}} - \delta_{\text{plant}})}{(-13.4)} \text{ [‰]}, (2)$$

where δ_{air} and δ_{plant} are $\delta^{13}\text{C}$ of the atmospheric CO₂ (assumed to be close to -8‰) and the leave sample, respectively. Productivity was estimated from fresh aboveground biomass (aBiom, g FW) on January 7th, 2005.

2.3 Protein extraction and solubilisation

Proteins were extracted according to the procedure described by Damerval et al. [50] and modified by Gion et al. [51]; protein extracts were obtained from 500 mg of frozen lamina sampled from the grinding of the three youngest fully expanded leaves collected on one individual plant. Samples were ground in liquid nitrogen and suspended in 10 ml 10% TCA (w/v) and 0.07% β -mercapto-ethanol (v/v) in acetone at -20°C during 2 h to precipitate

proteins. The suspension was centrifuged at 16 000 *g* (23 min, -10°C), the pellet was washed 3 times with ice-cold acetone containing 0.07% β -mercapto-ethanol, dried and ground finely in a ball crusher (MM 200; Retsch, Haan, Germany) for 5 min. Dried powder was resuspended to solubilize proteins on the basis of 30 μ l of a “TCT” solution (urea 7 M, thiourea 2 M, Triton X-100 0.4% v/v, CHAPS 4% w/v, DTT 10 mM, IPG buffer 1% v/v) per milligram of pellet. To insure that all cellular fragments were removed from the solubilized extracts, samples were centrifuged at 11 000 *g* during 6 min. Protein content was quantified with BSA as standard, according to Ramagli and Rodriguez [52].

2.4 Two-dimensional electrophoresis (2-DE) and gel staining

Isoelectric focusing (IEF) was conducted using the IPGphor II system (GE Healthcare; Little Chalfont, UK) and immobilized linear pH gradient (IPG) strips (Immobiline Drystrip pH 4-7, 24 cm, GE Healthcare). Strips were passively rehydrated for 10 h with TCT solution, then 300 μ g of proteins were cup-loaded. The IEF running conditions were: 500 V for 1 h, 500 - 1000 V linear gradient for 1 h, 1000 - 8000 V linear gradient for 3 h, and 8000 V to achieve a total of 78 000 Vh. The focused strips were equilibrated twice for 15 min each as described by Görg et al. [53]. Second dimension was performed by SDS-PAGE in vertical slabs of acrylamide (acrylamide/bis acrylamide 36.5/1 11 %, Tris HCl 1.5 M pH 8.8 24.5 % v/v, SDS 0.1 % w/v, APS 0.042 % w/v and TEMED 0.066 % v/v). Migration was performed in the Ettan Dalt six (GE Healthcare). The lower chamber was filled with 1X running buffer (Tris HCl pH 8.8 25 mM, glycine 0.2 M and SDS 0.1 M) whereas the upper chamber contained 2X running buffer. Running program was performed as follow: 1 W per gel for 1 h followed by 3 W per gel overnight until the migration front reached 0.5 mm of the gel bottom. Gels were stained using CBB G-250, according to Gion et al. [51].

2.5 Image acquisition and spot detection

Forty-eight analytical gels, i.e. three biological replicates per genotype and per condition, were scanned with the flatbed ImageScanner II system and the LabScan V3.00 software (GE Healthcare). The resolution was defined at 300 dots per inch with an image depth of 14 bits. Image analysis was performed using the Progenesis SameSpots software (Nonlinear Dynamics, Durham, NC, USA). All gels were warped to a single reference gel. Matching was performed automatically and systematically confirmed after one-by-one visual checking: artefacts, or spots that could not be confidently validated as true matches, were disregarded and misalignments were corrected by manual warping when appropriate. Spots were considered reproducible when well-resolved in at least two of the three biological replicates. Statistical analyses were performed on 863 spots deemed reproducible. For each reproducible spot, a measurement was carried out from each biological replicate and normalized volumes were computed using the total spot volume normalization procedure of Progenesis SameSpots software.

2.6 Statistical analyses

Results were evaluated by using the R programming language v2.7.0 (R Development Core Team, 2008. R: *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing; Vienna, AU). For each variable, the normality of the distribution was tested with a Shapiro-Wilk test. Relationship between protein abundance and Δ were evaluated by rank correlations (Spearman's coefficient, r_s) performed spot by spot from the genotypic means in each condition (well-watered and drought). Genotype-dependent drought responses were assessed from the genotype by treatment interaction using two-way ANOVA with the following model: $Y_{ijk} = \mu + G_i + T_j + G_i \times T_j + \epsilon_{ijk}$; where Y_{ijk} refers to individual values, μ is the general mean, G_i is the effect of genotype i ($i = 8$), T_j is the effect of treatment j

($j = 2$), $G_i \times T_j$ is the genotype by treatment interaction and ε_{ijk} is the residual ($k = 3$). Levels of significance were $* = P \leq 0.05$, $** = P \leq 0.01$, $*** = P \leq 0.001$ and ns = non significant. The R package QVALUE (version 1.1) was used to calculate q -values from the resulting p -values of each individual effect [54]. A q -value lower than 0.05 was defined in order to control the positive false discovery rate (pFDR, i.e. the rate that significant features are truly null) at a 0.05 level. We used the hierarchical clustering software PermutMatrix v1.9.3 (<http://www.lirmm.fr/~caraux/PermutMatrix/index.html>; [55]) to appreciate the relatedness between the eight genotypes. The clustering was computed from raw values of the ratios between mean normalized volumes recorded during drought and mean normalized volumes recorded under well-watered conditions. The Ward's method algorithm was used to cluster proteins based on their $\log_{10}$ transformed ratios.

2.7 Protein identification by nanoLC-MS/MS

Any spot with a q -value of <0.05 associated with the genotype by treatment interaction was deemed to have a significant change attributed to the specified effect and was subsequently excised, i.e. 81 spots. Additionally, any spot proven significant in the Spearman's rank correlation analysis was excised as well, i.e. 61 spots regardless of the water regime. Considering that 10 spots were shared between both analyses, a total of 132 spots were excised and submitted to tandem mass spectrometry.

In-gel digests of the excised spots were obtained using trypsin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) according to the procedure described by Plomion et al. [39]. Peptides were analyzed by on-line capillary HPLC (LC Packings, Amsterdam, The Netherlands) coupled to a nanospray LCQ Deca XP Ion Trap mass spectrometer (Thermo-Finnigan, San Jose, CA). The peptides were eluted from the trap column onto an analytical 75- μm id x 15-cm C18 PepMapTM column (LC Packings) with a 5–40% linear gradient of solvent B in 35 min

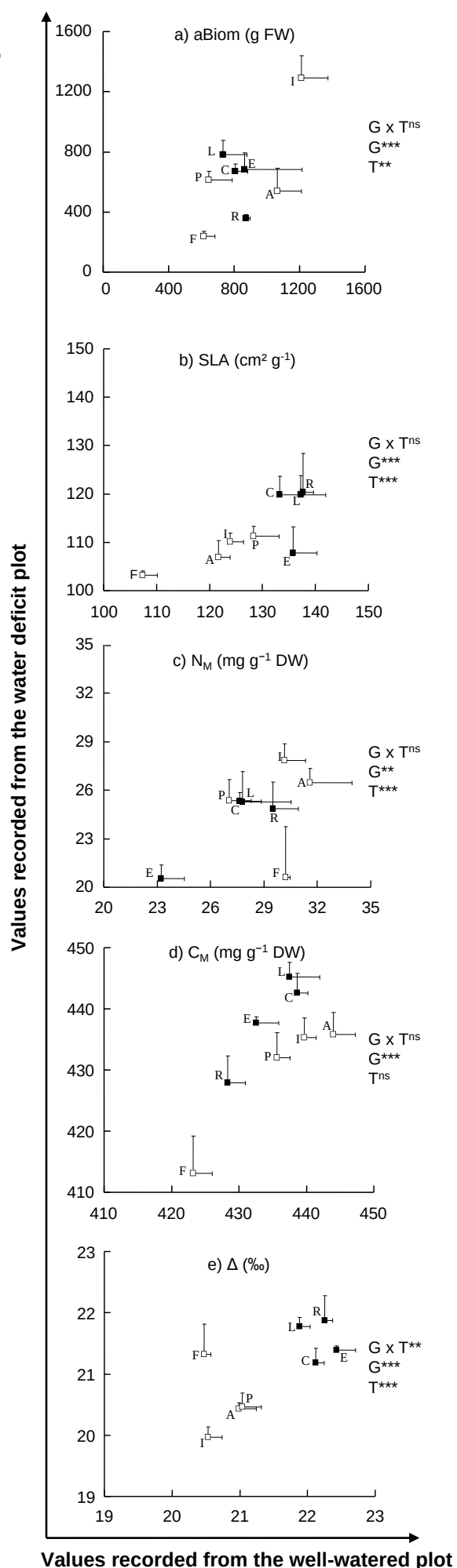


Figure 1. Genetic variation in productivity (a; aBiom, g FW), specific leaf area (b; SLA, $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$), nitrogen and carbon contents (c and d; N_M and C_M , $\text{mg g}^{-1} \text{DW}$) and carbon isotope discrimination (e; Δ , ‰) were presented for the eight *Populus x euramericana* genotypes. Means were presented for variables recorded in water deficit condition ($n = 5$) according to their values recorded in well-watered condition ($n = 5$). The four genotypes displaying the lowest Δ values in well-watered condition are shown in white squares along the graphics whereas the four genotypes of highest Δ values are shown in black squares. Levels of significance are indicated for the genotype effect (G), for the treatment effect (T) and for the genotype by treatment interaction ($G \times T$); ns = non significant; * = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$; *** = $P \leq 0.001$. See Table 1 for genotype abbreviations.

(solvent A was 0.1% formic acid in 5% ACN, and solvent B was 0.1% formic acid in 80% ACN). The separation flow rate was set at 200 nl/min. The mass spectrometer operated in positive ion mode at a 2-kV needle voltage and a 3-V capillary voltage. Data were acquired in a data-dependent mode alternating a MS scan survey over the range m/z 150-2000, a zoom scan on the most intense ion and its MS/MS spectrum using a 2 m/z units ion isolation window and a 35% relative collision energy. After mass spectrometric analyses, all data were searched using SEQUEST algorithm through Bioworks 3.3.1 interface (ThermoFinnigan) against the DFCI Poplar Gene Index release 3.0 (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=poplar>; September 2006) and the JGI *Populus* genome release 1.1 (http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html, December 2004). Altogether data were searched against 314 640 entries. DTA files were generated for MS/MS spectra that both reached a minimal intensity ($5 \cdot 10^{-4}$) and a sufficient number of ions (15). The DTA generation allowed the averaging of several MS/MS spectra corresponding to the same precursor ion with a tolerance of 1.4 Da. Spectra from precursor ion higher than 3500 Da or lower than 600 Da were rejected. The search parameters were as follows: mass accuracy of the peptide precursor and peptide fragments was set to 2 Da and 1 Da, respectively. Only b- and y-ions were considered for mass calculation. Oxidation of methionines (+ 16 Da) and carbamidomethylation of cysteines (+ 57 Da) were considered as differential modifications. Two missed trypsin cleavages were allowed. Only peptides with Xcorr higher than 1.9 (single charge), 2.2 (double charge) and 3.75 (triple charge) were retained. In all cases, ΔC_n had to be higher than 0.1 and peptide p-value lower than 10^{-3} . Proteins identified by a unique peptide were rejected. Proteins were classified into groups based on their functional categories using the DBGET system (<http://www.genome.ad.jp/dbget/>).

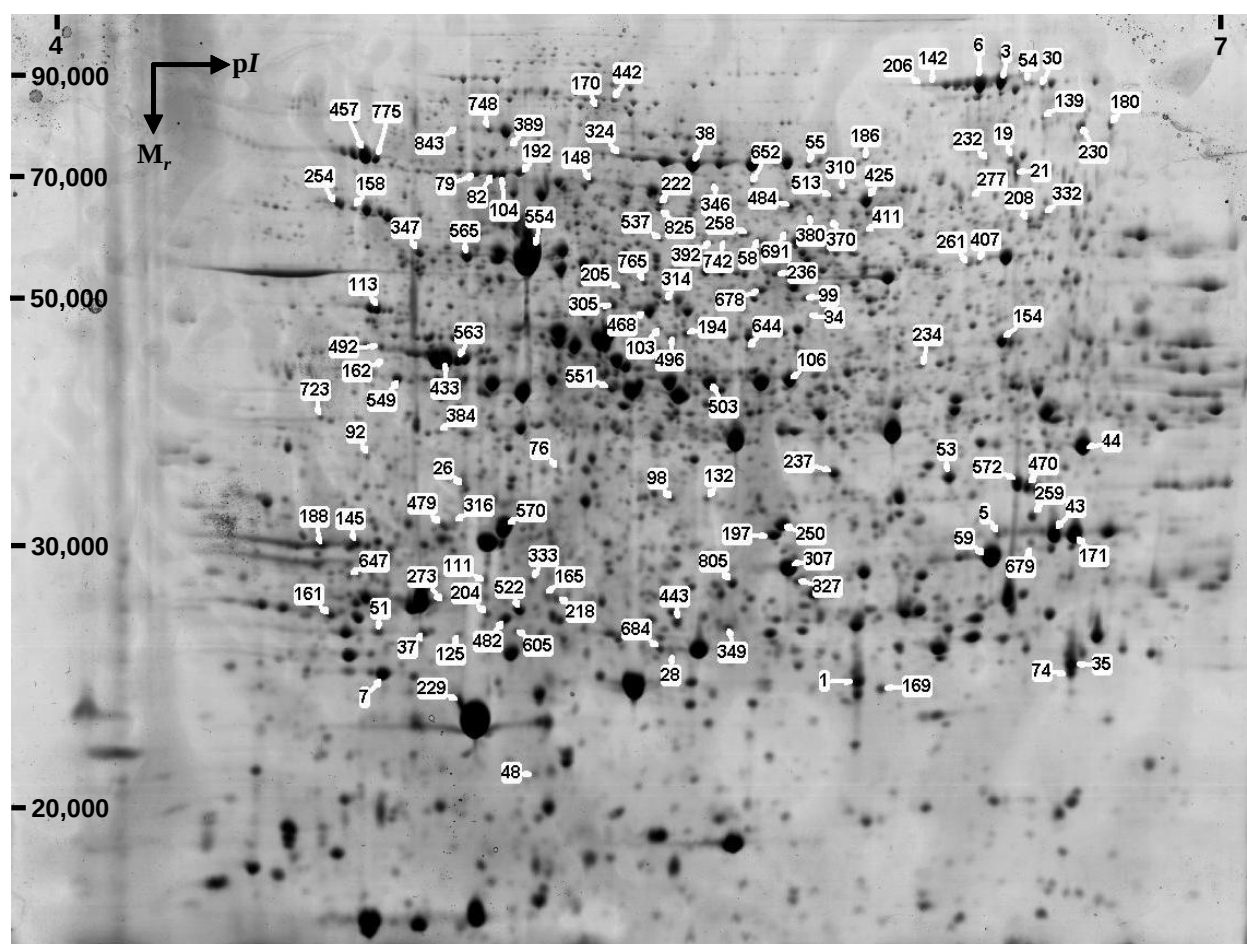


Figure 2. Reference 2-D map of *Populus ×euramericana* leaves. The 132 spots submitted to MS/MS analysis are marked with arrows and numbers. The isoelectric point (pI) extended from pH 4 to 7 (linear gradient) and the molecular mass (M_r) from 14,000 to 90,000 Da.

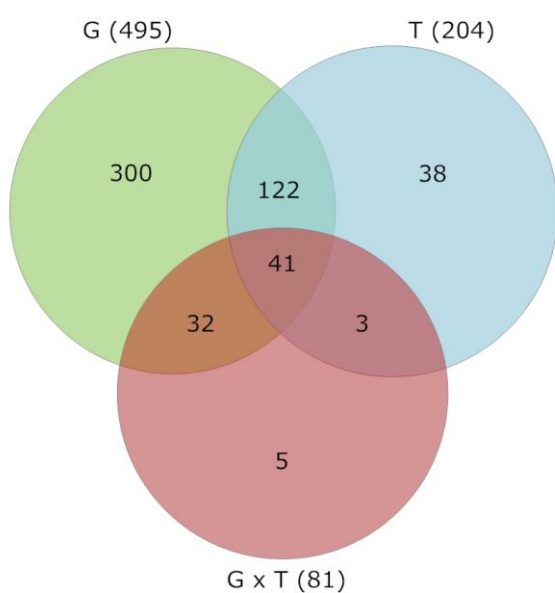


Figure 3. Venn diagram showing the total number of spots displaying at least one significant effect from two-way ANOVA i.e., Genotype (G), Treatment (T) and/or Genotype by Treatment interaction (G × T) effect.

3 Results

3.1 Genetic variation in productivity and in leaf related traits – drought effect

After an 86-day irrigation cessation, predawn leaf water potential of water deficit plants decreased by 0.3 MPa compared to well-watered plants [21]. The eight *P. ×euramericana* genotypes displayed significant genetic variations for all variables regardless of the treatment (Fig. 1). The genotypic ranking for Δ established in well-watered condition in the present experiment, remained stable ($r_s = 0.79$; $P \leq 0.05$) compared to that obtained by Monclus et al. [24].

No significant genotype by treatment interaction effect was detected except for Δ . Under drought condition, values of aBiom, SLA and N_M were significantly lower compared to values recorded under well-watered condition. The decrease of aBiom under drought condition ranged from 0 to 50% compared to well-watered condition. Values of Δ scaled negatively with N_M in well-watered ($r_s = -0.71$; $P \leq 0.05$) and in drought conditions ($r_s = -0.81$; $P \leq 0.05$), while it scaled positively with SLA in well-watered condition only ($r_s = 0.86$; $P \leq 0.01$). We were unable to detect any relationship neither between Δ and aBiom, nor between Δ and the extent of the aBiom decrease observed during drought.

3.2 Genetic variation of leaf proteome in drought response

Out of the 863 reproducible spots (Fig. 2), 81 displayed a significant genotype by treatment interaction effect ($G \times T$; $q\text{-value} \leq 0.05$); while genotype and treatment effects accounted for 495 and 204 of the spots, respectively (Fig. 3). The 81 spots with significant $G \times T$ (i.e., for which the plasticity is genetically controlled) were submitted to MS/MS analysis and 62 proteins were reliably identified. It should be noted that some of these proteins (e.g., spots no. 411, 84, 492) probably result from the degradation of higher M_r proteins, according to the difference between experimental and theoretical M_r (Table 2). As

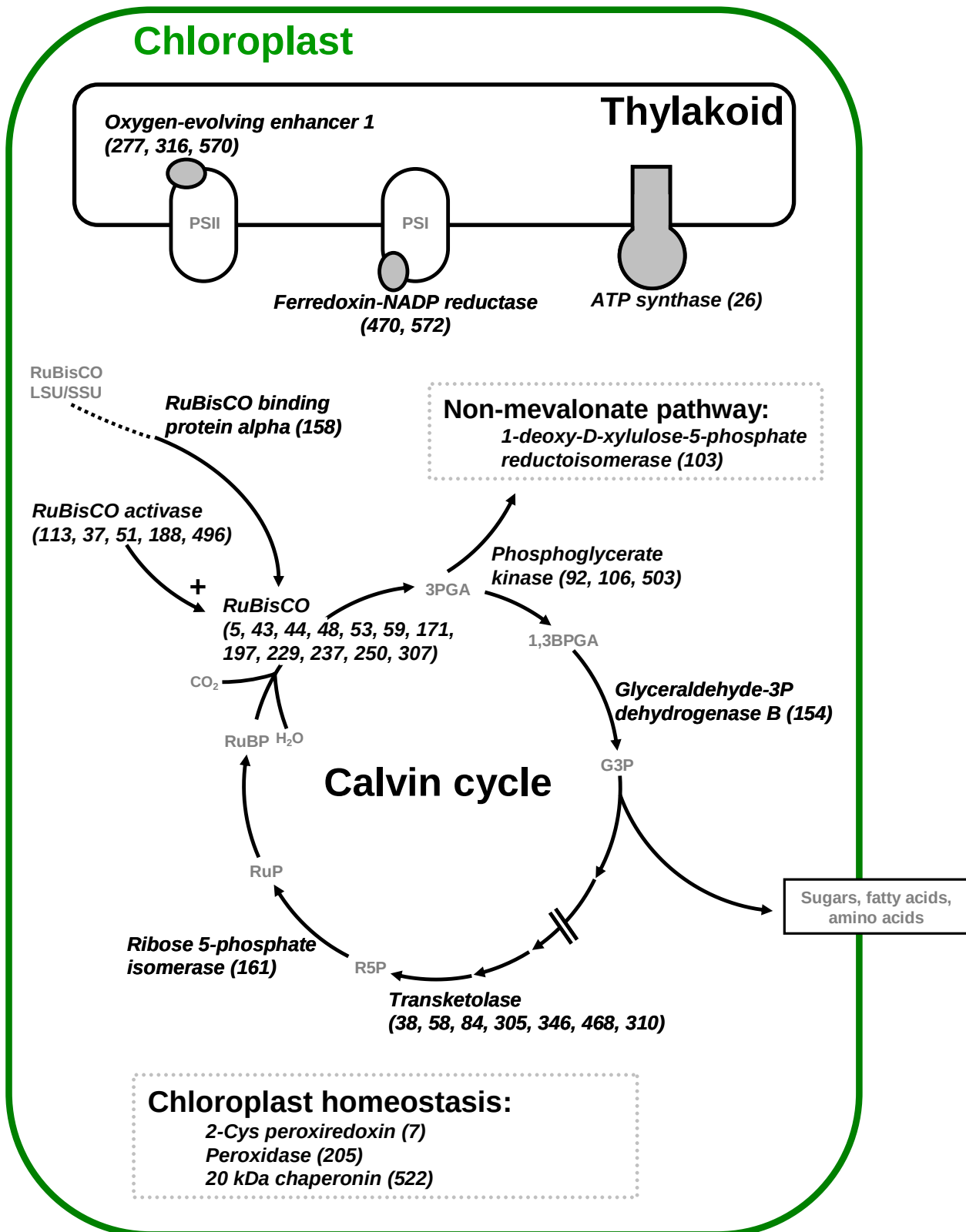


Figure 4. Genetic variation in drought response of chloroplast-associated proteins from eight *Populus ×euramericana* genotypes. Enzymes identified in this study are shown in *italics* with their corresponding spot number (see Table 2 and Fig. 2). Abbreviations: RuBisCO LSU/SSU, ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase large/small subunit mRNA/protein; 3PGA, 3-phosphoglycerate; 1,3BPGA, 1,3-bisphosphoglycerate; G3P, glyceraldehyde 3-phosphate; R5P, ribose-5-phosphate; RuP, ribulose-5-phosphate; RuBP, ribulose-1,5-bisphosphate; PSI, photosystem I; PSII, photosystem II.

for the 19 remaining spots, four were identified based on a single peptide (spots no. 1, 21, 55 and 333), two failed to show any peak in the mass spectra (spots no. 484 and 513) and the 13 resulted in multiple protein identification. The relative protein variation of these later spots was considered irrelevant, and therefore disregarded (Supplementary Table S1). Among the 62 reliably identified proteins, more than 60 % fell into “energy metabolism” category; the other proteins fell into “amino acid metabolism”, “carbohydrate metabolism”, “lipid metabolism”, “oxidative stress” and “protein metabolism” categories. Interestingly, nearly 65 % of these proteins took part in chloroplast-related functions (Fig. 4).

Based on the $\log_{10}$ transformed ratio between protein abundance under drought condition and protein abundance under control condition, the clustering of the 62 proteins gathered genotypes into two distinct sub-trees (Fig. 5). A first branch gathered ‘Agathe_F’, ‘Cima’ and ‘Flevo’ genotypes, whereas a second branch gathered ‘Luisa_Avanzo’, ‘Robusta’, ‘Pannonia’, ‘Eco_28’ and ‘I45-51’ genotypes. Their proteomic signature was quite contrasted. The first branch grouped genotypes displaying mainly slight changes in protein abundance in response to drought while the second, grouped genotypes displaying mainly substantial changes. The clustering analysis also gathered proteins into two distinct sub-trees. Interestingly, most of the proteins bearing the same annotation were found in the same sub-tree. The first branch included mainly proteins whose abundance tended to decrease in response to drought. For instance, this branch gathered the three identified isoforms of a glycine dehydrogenase, the four identified isoforms of a HSC70, the two identified isoforms of a ferredoxin-NADP reductase, two isoforms (out of three identified) of a phosphoglycerate kinase, ten isoforms (out of 12 identified) of RuBisCO large chain and five isoforms (out of seven identified) of a transketolase. Overall, these proteins tended to be down-regulated in the second set of genotypes (‘Luisa_Avanzo’, ‘Robusta’, ‘Pannonia’, ‘Eco_28’ and ‘I45-51’).

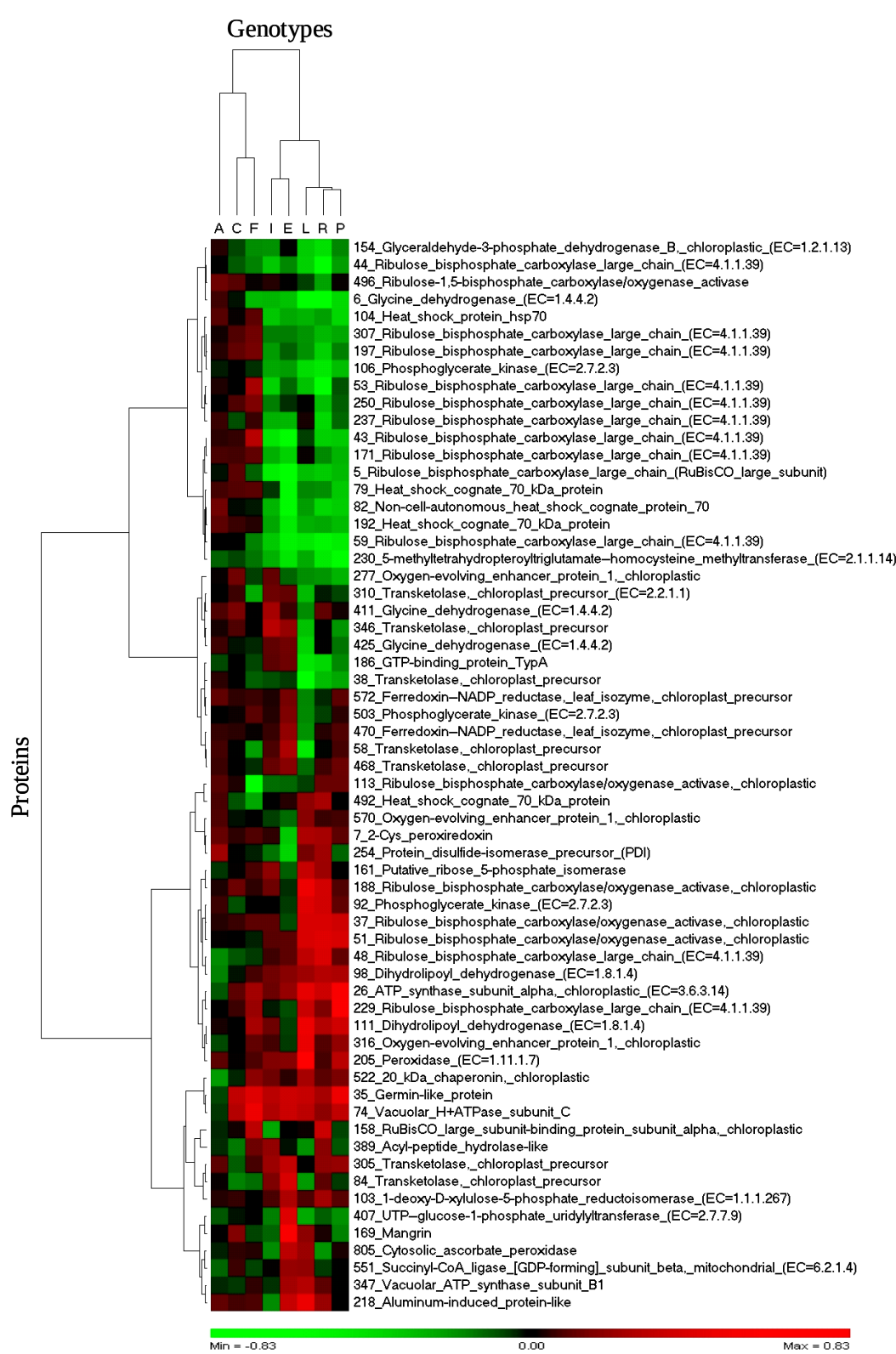


Figure 5. Hierarchical clustering analysis of the 62 reliably identified proteins with significant genotype by treatment interaction recorded from the two-way ANOVA ($G \times T$; q -value ≤ 0.05). Genotype abbreviations refer to Table 1 and protein-associated numbers refer to Table 2 and Fig. 2. Down-regulation and up-regulation of proteins under drought condition are indicated in green and red colours, respectively.

The second branch included mainly proteins whose abundance tended to increase in response to drought. For instance, this branch gathered the two identified isoforms of a dihydrolipoyl dehydrogenase, four isoforms (out of five identified) of a RuBisCO activase, RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha, the three identified ATP synthase, two isoforms (out of three identified) of an oxygen-evolving enhancer and the three identified proteins involved in oxidative stress (2-Cys peroxiredoxin, cytosolic ascorbate peroxidase and peroxidase). Overall, these proteins tended to be up-regulated in the second set of genotypes ('Luisa_Avanzo', 'Robusta', 'Pannonia', 'Eco_28' and 'I45-51').

3.3 Relationship between spot abundance and Δ variation

Among the 863 reproducible spots, the rank correlation analyses (Spearman's coefficient, r_s) computed at the genotype level between spot abundance and Δ values were significant for 49 and 12 spots under well-watered and drought conditions, respectively. These 61 spots were excised and 45 proteins were reliably identified according to the criteria previously defined. While 23 protein abundances scaled positively with Δ , 22 displayed negative correlations with Δ (Table 3; Fig. 6). As for the 16 remaining spots, they resulted in multiple protein identification (Supplementary Table S2) and were therefore not considered further.

Identified proteins fell mainly into the "energy metabolism" category regardless of the treatment, particularly being involved in the carbon fixation process. The other proteins fell into the "carbohydrate and protein metabolism" categories. Five isoforms of RuBisCO activase (spots no. 563, 433, 496, 644 and 647), two isoforms of ferredoxin-dependent glutamate synthase (spots no. 139 and 652) and two isoforms of putative aminopeptidase M1 (spots no. 170 and 442) were detected regardless of the treatment. Proteins belonging to

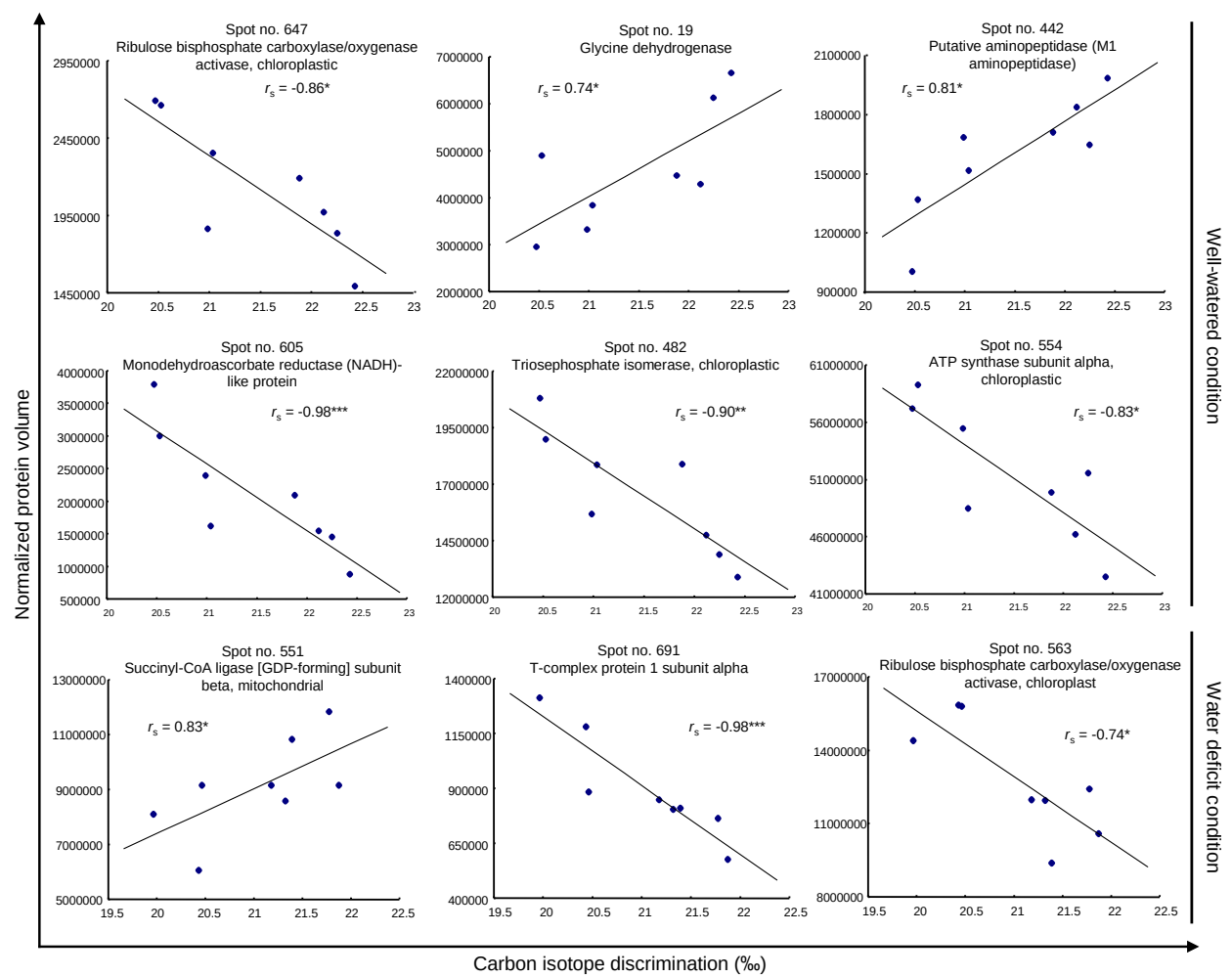


Figure 6. Examples of nine proteins (among 45 identified) displaying relationship between protein abundance (y axis, normalized spot volume) and carbon isotope discrimination (x axis, ‰) under well-watered or water deficit conditions. Rank correlations (Spearman rank coefficient, r_s) are indicated with level of significance (* = $P \leq 0.05$; ** = $P \leq 0.01$; *** = $P \leq 0.001$).

333 “amino acid” and “nucleotide metabolism” categories were specifically observed under
334 control condition.
335

4 Discussion

Leaf proteome was analyzed from fully functional leaves of eight *P. ×euramericana* genotypes initially selected for their contrasted leaf carbon isotope discrimination (Δ) [24]. In this experiment, genotypes also differed by their productivity, by their specific leaf area and by their carbon and nitrogen contents. Plants were grown in open field and half of them were subjected to an 86-day irrigation cessation that led the predawn leaf water potential to a 0.3 MPa decrease compared to well-watered plants. Plants have thus experienced a long-lasting and moderate drought period. Genotype-dependent changes in response to drought were recorded for Δ and substantial differences in drought tolerance were observed (i.e., differences in biomass drop induced by drought). As expected, productivity, SLA and N_M overall decreased under drought condition [12, 21].

4.1 Genetic control of proteome plasticity in response to drought

Sampled leaves experienced a long-lasting and moderate drought period, increasing the likelihood that protein changes may arise from acclimation responses. The two clusters of genotypes obtained from the hierarchical clustering performed from proteomic data, did not refer to any genotype rankings related to ecophysiological variables such as aboveground biomass or Δ . However, we observed that most of the differentially-regulated proteins acted in three distinct processes: photosynthesis, photorespiration and cell homeostasis.

4.1.1 Photosynthesis-related proteins

Nearly 65% of the proteins displaying genotype-dependent changes in response to the long-lasting moderate drought were chloroplastic either involved in the Calvin cycle, in the electron transport chains or in the stability of chloroplastic components (Fig. 4). Previous poplar proteomic studies each dealing with one particular genotype, have already reported drought-induced regulations in proteins involved in carbon fixation, such as RuBisCO,

RuBisCO activase, glyceraldehyde-3P dehydrogenase, phosphoglycerate kinase or triosephosphate isomerase [36, 37, 39]. In the present study, we observed genetic variations in the drought-induced changes in the abundance of 31 proteins or breakdown products matching to enzymes involved in the Calvin cycle: likely degraded forms of RuBisCO large chain (spots no. 5, 43, 44, 48, 53, 59, 171, 197, 229, 237, 250, 307), RuBisCO activase (spots no. 113, 496 and likely degraded forms: spots no. 37, 51, 188), RuBisCO binding protein (spot no. 158), a co-chaperonin of the chloroplastic Cpn60 (20 kDa chaperonin; spot no. 522) involved in the assembly of RuBisCO [56], phosphoglycerate kinase (spots no. 106, 503 and a likely degraded form: spots no. 92), glyceraldehyde-3P dehydrogenase (spot no. 154), transketolase (spots no. 38, 58, 346, 310 and likely degraded forms: spots no. 84, 305, 468) and ribose 5-P isomerase (spot no. 161). These results suggest that the long-lasting moderate drought led to genotype-dependent changes in the CO₂ fixation, in the triose-phosphate reduction pathway and in the regeneration of ribulose-1,5-bisphosphate either affecting expression of isoforms or resulting from protein degradation. Genotype differences in drought response also involved the regulation of thylakoid-associated enzymes (oxygen-evolving enhancer: spots no. 277, 316, 570; ferredoxin-NADP reductase: spots no. 470, 572; ATP synthase: spot no. 26), suggesting that genotype-dependent changes also occur in the chloroplastic ATP and NADPH supplies. Concomitantly with the contrasted regulations of the Calvin cycle, regulations of the electron transport chain may be required to avoid photooxidative damage [57, 58, 59].

Genotype-dependent changes in response to drought concerned also three proteins involved in the stability of the chloroplastic components. Contrasted regulation was observed in a 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (spot no. 103), a key enzyme of the chloroplastic non-mevalonate pathway [60, 61]. This result could suggest contrasted regulation in the synthesis of light-harvesting and light-protecting agents, such as carotenoids,

386 phytols or plastoquinones. Contrasted decreases in chlorophyll and carotenoid contents have
387 already been reported during water deficit in two cotton genotypes differing by their drought
388 tolerance [62]. Genotype-dependent changes in response to drought were also observed in two
389 oxidative stress-related enzymes (2-Cys peroxiredoxin, spot no. 7 and peroxidase, spot no.
390 205) suggesting that protection of the photosynthetic apparatus against oxidative damage
391 could differ between genotypes in response to drought.

392 **4.1.2 Photorespiration-related proteins**

393 Genotype-dependent changes in drought response included three likely degraded
394 forms of a glycine dehydrogenase (spots no. 6, 411, 425) involved in the mitochondrial step
395 of the photorespiratory pathway [63, 64]. Concomitantly with the reduced intercellular CO₂
396 concentrations due to reduced stomatal conductance, photorespiration is likely to increase
397 under drought stress [65]. In drought-stressed leaves, photorespiration is suggested to protect
398 the photosynthetic apparatus against photoinhibition by sustaining photon utilization during
399 reduced electron consumption when CO₂ assimilation decreases [66-68]. The regulation of a
400 homocysteine S-methyltransferase (spot no. 230) differed also between genotypes. This
401 enzyme regenerates S-adenosyl methionine from a methyl donor provided by the
402 photorespiratory cycle; S-adenosyl methionine is assumed to play a role in drought tolerance
403 through the methyl cycle [69].

404 **4.1.3 Cell homeostasis-related proteins**

405 Genotype-dependent changes were observed for six isoforms of chaperones, such as
406 HSP70 (spot no. 104), a protein disulfide-isomerase (PDI; spot no. 254), three isoforms of a
407 HSC70 (spots no. 79, 192 and a likely degraded form: spot no. 492) and a non-cell-
408 autonomous HSC70 (spot no. 82). Contrasted regulations of HSP70 and PDI have already
409 been evidenced in drought response in three wheat genotypes [70]. These proteins are
410 involved in protein repair and protection against denaturation [56]; PDI could also act as a

regulator of chloroplast translational activation [71]. HSC70s are cytosolic chaperones constitutively expressed and they could be involved in the import/translocation of mitochondrial or chloroplast precursor proteins [56]. As for non-cell-autonomous HSC70s, they interact with the plasmodesmatal translocation pathway [72]. These chaperones have also been hypothesized to contribute to long-distance signals through the phloem [73]. A functional role of HSP70 and HSC70 has already been suggested in maintaining stress-tolerant phenotype under water deficit conditions [74, 75]. The amount of a cytosolic ascorbate peroxidase (APX; spot no. 805) also displayed genotype-dependent changes in response to drought. Involved in ROS defence, changes in APX activity and amounts have already been identified as an indicator of a redox status change under drought conditions [76, 77]. Genotype-dependent changes in response to drought were also detected in a vacuolar ATP synthase subunit B1 (spot no. 347) and in a likely degraded form of a vacuolar H⁺-ATPase subunit C (spot no. 74). By acting in the translocation of protons, such enzymes could stabilize and maintain intracellular ion concentrations within the optimal range for normal cellular functions [78].

4.2 Co-variation between leaf protein abundance and Δ variation

Δ is a reliable and sensitive marker negatively correlated to intrinsic water-use efficiency (W_i), i.e. the ratio between net CO₂ assimilation (A) and stomatal conductance to water vapour (g_s) [18-21]. Therefore, low Δ could depend on higher A and/or reduced g_s ; A resulting from the photosynthetic rate deducted from both photorespiration and respiration rates, while g_s resulting from the degree of stomatal closure. In this experiment, we identified 45 spots that could be associated with the genetic variation of Δ . The function of these proteins is discussed in view of their involvement in Δ variation.

4.2.1 Photosynthesis-related proteins

The abundance of RuBisCO activase isoforms (spots no. 433, 496, 563, 644, 647) were negatively correlated with Δ regardless of the treatment, exemplifying a positive relationship with W_i . This enzyme has already been suggested as a candidate controlling WUE in tomato [79]. Since the CO_2 fixation rate is under the control of RuBisCO activase through its effect on the activation level of RuBisCO, it is likely that RuBisCO activase promotes high W_i by elevating A . The abundance of two enzymes of the Calvin cycle also scaled negatively with Δ under well-watered condition: a sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (spot no. 549) and a triosephosphate isomerase (spot no. 482). Photosynthetic capacity and CO_2 fixation is also determined by the rate of RuBP regeneration [80] thus, increased abundance of both enzymes could also suggest higher A . Likewise, ATP synthase subunit alpha (spots no. 554, 565) and ferredoxin-NADP reductase (spot no. 28) also displayed higher abundance with reduced Δ under well-watered condition. By providing ATP and NADPH in the chloroplast, they could contribute to strengthen CO_2 fixation, as well.

Higher abundance of a spermidine synthase (spot no. 723) was recorded along with reduced Δ under well-watered condition. Since spermidine controls the integrity and liquidity of the thylakoid membranes, it could sustain a greater PSII activity [81]. The abundance of a monodehydroascorbate reductase (MDHAR, spot no. 605) and chloroplastic elongation factor G (efG, spot no. 748) also scaled negatively with Δ . MDHAR reduces monodehydroascorbate radical to ascorbate. An increase in ascorbate has been demonstrated to lead to higher photosynthetic rate [82]. Ascorbate and efG are known to control the expression levels of nuclear and chloroplastic components of the photosynthetic apparatus [83, 84]; their higher abundance could participate to strengthen A , as well.

4.2.2 Photorespiration-related proteins

Photorespiration affects electron transport and carboxylation capacity [85]. Thereby, it could result in the loss of up to 25% of the carbon that is fixed during photosynthetic carbon

assimilation [86]. Under well-watered condition, the abundance of seven isoforms of a glycine dehydrogenase (spots no. 3, 6, 19, 30, 142, 206, 232) scaled positively with Δ whereas a likely degraded isoform of about 50 kDa (spot no. 678) scaled negatively. Glycine dehydrogenase is involved in the mitochondrial step of the photorespiratory cycle by salvaging glycine [63, 87]. This result suggests higher photorespiration rate in plant of low W_i . Such hypothesis is also supported by the positive correlation between Δ and the abundance of a ferredoxin-dependent glutamate synthase (spot no. 139). This enzyme is involved in the reassimilation of photorespiratory ammonium [88] and thus, could also suggest greater photorespiration rate along with lower W_i .

In contrast to well-watered condition, higher abundance of an isoform of a ferredoxin-dependent glutamate synthase (spot no. 652) scaled with lower Δ under water deficit condition. Although photorespiration could lead to a decrease in A , it could also maintain electron flow to prevent photoinhibition under stress conditions [65]. In plants facing water deficit, photorespiration could participate to sustain CO_2 fixation and yield to greater W_i .

4.2.3 Respiration-related proteins

Cellular respiration starts with the products of glycolysis being transported into the mitochondria. In the present experiment, only one enzyme involved in glycolysis was detected, a 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase (spot no. 825) whose abundance scaled positively with Δ . Two key enzymes of the Krebs cycle were identified: succinyl-CoA ligase (spot no. 551) and aconitate hydratase (spot no. 54). Both enzymes displayed abundances positively correlated with Δ suggesting greater respiration rate along with the lowest W_i . Furthermore, Carrari et al. [89] also reported that an enhanced expression of aconitate hydratase resulted in enhanced levels of Krebs cycle intermediates as well as in a reduced photosynthetic rate.

4.2.4 Stomatal conductance

Under well-watered condition a positive correlation was recorded between Δ and the abundance of a S-formylglutathione hydrolase (spot no. 259), an enzyme providing GSH. High GSH level in guard cells is known to limit stomatal closure during daylight [90]. By enhancing the GSH pool size, we suggest that higher level of S-formylglutathione hydrolase could promote the amount of water transpired through stomata, resulting in lower W_i . Furthermore, two isoforms of a HSP70 (spots no. 457, 775) displayed higher abundances along with elevated W_i under well-watered condition. HSP70 chaperones are usually expressed in response to environmental stress conditions, such as heat, to strengthen protein structure and function [56]. Since high transpiration rates are essential for leaf cooling, an improved WUE may lead to high temperature stress along with stomatal closure. Thus, HSP70 could contribute to avoid protein damages when leaf temperature rise with decreased water losses.

In conclusion, this experiment demonstrated that the genetic control of the molecular plasticity in drought response of eight *P. ×euramericana* genotypes contrasting for their Δ consisted mainly in chloroplastic proteins involved in carbon fixation (Fig. 4). Differences in drought tolerance might reside within this set of proteins; they could yield a physiological advantage under drought, making them potential breeding targets for improvement of drought tolerance. This study also indicated that among proteins which abundance was correlated with Δ , most of them displayed functions able to modulate either net CO_2 assimilation or stomatal conductance.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Dr. Stéphane Claverol from the Pôle Protéomique de la Plateforme de Génomique Fonctionnelle of Bordeaux for the expertise help with MS/MS data. The authors are grateful to Alain Guichard and Gilles Moreau (Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures) as well as to Jonathan Bourdeau-Garrel for their excellent technical assistance. This study was supported by the Conseil Régional, Région Centre, France (L.B. 's PhD fellowship).

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Loustau, A., Bosc, A., Colin, A., Ogée, J. *et al.*, Modeling climate change effects on the potential production of French plains forests at the sub-regional level. *Tree Physiol.* 2005, 25, 813-823.
- [2] Saxe, H., Cannell, M.G.R., Johnsen, Ø., Ryan, M.G., Vourlitis, G., Tree and forest functioning in response to global warming. *New Phytol.* 2001, 149, 369-400.
- [3] Tschaplinski, T.J., Blake, T.J., Water relations, photosynthetic capacity, and root/shoot partitioning of photosynthate as determinants of productivity in hybrid poplar. *Can. J. Bot.* 1989, 67, 1689-1697.
- [4] Tschaplinski, T.J., Tuskan, G.A., Gunderson, C.A., Water-stress tolerance of black cottonwood and eastern cottonwood clones and four of their hybrid progeny. I. Growth, water relations and gas exchange. *Can. J. Forest Res.* 1994, 24, 364-371.
- [5] Zsuffa, L., Giordano, E., Pryor, L.D., Stettler, R.F., in: Stettler, R.F., Bradshaw, H.D. Jr., Heilman, P.E., Hinckley, T.M. (Eds.), *Biology of Populus and its Implications for Management and Conservation*, N.R.C. Research Press, National Research Council of Canada, Ottawa, CA, 1996, pp. 515-539.
- [6] Passioura, J.B., Environmental biology and crop improvement. *Funct. Plant Biol.* 2002, 29, 537-546.
- [7] Liu, Z., Dickmann, D.I., Effects of water and nitrogen interaction on net photosynthesis, stomatal conductance, and water-use efficiency in two hybrid poplar clones. *Physiol. Plant.* 1996, 97, 507-512.
- [8] Marron, N., Dreyer, E., Boudouresque, E., Delay, D., *et al.*, Impact of successive drought and re-watering cycles on growth and specific leaf area of two *Populus × canadensis* (Moench) clones, 'Dorskamp' and 'Luisa_Avanzo'. *Tree Physiol.* 2003, 23, 1225-1235.

- 541 [9] Marron, N., Gielen, B., Brignolas, F., Jian, G., *et al.*, in: Isebrands, J.G., Richardson, J.
542 (Eds.), *Poplars and willows in the world*, 2008, chapter 7.
- 543 [10] Pallardy, S.G., Kozłowski, T.T., Water relations in *Populus* clones. *Ecology* 1981, 62,
544 159-169.
- 545 [11] Harvey, H.P., van den Driessche, R., Nutrition, xylem cavitation and drought resistance
546 in hybrid poplar. *Tree Physiol.* 1997, 17, 647-654.
- 547 [12] Marron, N., Delay, D., Petit, J.M., Dreyer, E., *et al.*, Physiological traits of two *Populus*
548 *×euramericana* clones, Luisa Avanzo and Dorskamp, during a water stress and re-
549 watering cycle. *Tree Physiol.* 2002, 22, 849-858.
- 550 [13] Gebre, G.M., Kuhns, M.R., Brandle, J.R., Organic solute accumulation and dehydration
551 tolerance in tree water-stressed *Populus deltoides* clones. *Tree Physiol.* 1994, 14, 575-
552 587.
- 553 [14] Chen, S., Wang, S., Altman, A., Hüttermann, A., Genotypic variation in drought
554 tolerance of poplar in relation to abscisic acid. *Tree Physiol.* 1997, 17, 797-803.
- 555 [15] Ibrahim, L., Proe, M.F., Cameron, A.D., Main effects of nitrogen supply and drought
556 stress upon whole-plant carbon allocation in poplar. *Can. J. For. Res.* 1997, 27, 1412-
557 1419.
- 558 [16] Liu, Z., Dickmann, D.I., Responses of two hybrid *Populus* clones to flooding, drought,
559 and nitrogen availability. I. Growth and morphology. *Can. J. Bot.* 1992, 70, 2265-2270.
- 560 [17] Tschaplinski, T.J., Tuskan, G.A., Gebre, D.E., Todd, D.E., Drought resistance of two
561 hybrid *Populus* clones grown in a large-scale plantation. *Tree Physiol.* 1998, 18, 653-658.
- 562 [18] Farquhar, G.D., Richards, R.A., Isotopic composition of plant carbon correlates with
563 water-use efficiency of wheat genotypes. *Aust. J. Plant Physiol.* 1984, 11, 539-552.
- 564 [19] Farquhar, G.D., Ehleringer, J.R., Hubick, K.T., Carbon isotope discrimination and
565 photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1989, 40, 503-537.

- 566 [20] Ponton, S., Dupouey, J.L., Bréda, N., Feuillat, F., et al., Carbon isotope discrimination
567 and wood anatomy variations in mixed stands of *Quercus robur* and *Quercus petraea*.
568 *Plant Cell Environ.* 2001, 24, 861-868.
- 569 [21] Monclus, R., Dreyer, E., Villar, M., Delmotte, F.M., et al., Impact of drought on
570 productivity and water use efficiency in 29 genotypes of *Populus deltoides* × *Populus*
571 *nigra*. *New Phytol.* 2006, 169, 765-777.
- 572 [22] Bonhomme, L., Barbaroux, C., Monclus, R., Morabito, D., et al., Genetic variation in
573 productivity, leaf traits and carbon isotope discrimination in hybrid poplars cultivated on
574 contrasting sites. *Ann. For. Sci.* 2008, 65, 1-9.
- 575 [23] Marron, N., Villar, M., Dreyer, E., Delay, D., et al., Diversity of leaf traits related to
576 productivity in 31 *Populus deltoides* × *Populus nigra* clones. *Tree Physiol.* 2005, 25,
577 425-435.
- 578 [24] Monclus, R., Dreyer, E., Delmotte, F.M., Villar, M., et al., Productivity, leaf traits and
579 carbon isotope discrimination in 29 *Populus deltoides* × *P. nigra* clones. *New Phytol.*
580 2005, 167, 53-62.
- 581 [25] Zhang, X., Zang, R., Li, C., Population differences in physiological and morphological
582 adaptations of *Populus davidiana* seedlings in response to progressive drought stress.
583 *Plant Sci.* 2004, 166, 791-797.
- 584 [26] Dawson, T.E., Mambelli, S., Plamboeck, A.H., Templer, P.H., Tu, K.P., Stable isotopes
585 in plant ecology. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 2002, 33, 507-559.
- 586 [27] Araus, J.L., Slafer, G.A., Reynolds, M.P., Royo, C., Plant breeding and drought in C3
587 cereals: what should we breed for? *Ann. Bot.* 2002, 89, 925-940.
- 588 [28] Braatne, J.H., Hinckley, T.M., Stettler, R.F., Influence of soil water on the physiological
589 and morphological components of plant water balance in *Populus trichocarpa*, *Populus*
590 *deltoides* and their F1 hybrids. *Tree Physiol.* 1992, 11, 325-339.

- 591 [29] Condon, A.G., Richards, R.A., Rebetzke, G.J., Farquhar, G.D., Improving intrinsic
592 water-use efficiency and crop yield. *Crop Sci.* 2002, 42, 122-131.
- 593 [30] Cao, H.X., Zhang, Z.B., Xu, P., Chu, L.Y., *et al.*, Mutual physiological genetic
594 mechanism of plant high water use efficiency and nutrition use efficiency. *Colloid.*
595 *Surface. B: Biointerfaces* 2007, 57, 1-7.
- 596 [31] Rebetzke, G.J., Condon, A.G., Richards, R.A., Farquhar, G.D., Selection for reduced
597 carbon isotope discrimination increases aerial biomass and grain yield on rainfed bread
598 wheat. *Crop Sci.* 2002, 42, 739-745.
- 599 [32] Tuskan, G.A., DiFazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., *et al.*, The Genome of Black
600 Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 2006, 313, 1596-1604.
- 601 [33] Chaves, M.M., Maroco, J.P., Pereira, J.S., Understanding plant responses to drought:
602 from genes to the whole plant. *Funct. Plant Biol.* 2003, 30, 239-264.
- 603 [34] Vinocur, B., Altman, A., Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress:
604 achievements and limitations. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2005, 16, 123-132.
- 605 [35] Street, N.R., Skogström, O., Sjödin, A., Tucker, J., *et al.*, The genetics and genomics of
606 the drought response in *Populus*. *Plant J.* 2006, 48, 321-341.
- 607 [36] Bogeat-Triboulot, M.B., Brosche, M., Renaut, J., Jouve, L., *et al.*, Gradual soil water
608 depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles,
609 ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in arid
610 regions. *Plant Physiol.* 2007, 143, 876-892.
- 611 [37] He, C., Zhang, J., Duan, A., Zheng, S. *et al.*, Proteins responding to drought and high-
612 temperature stress in *Populus ×euramericana* cv. '74/76'. *Trees* 2008, 22, 803-813.
- 613 [38] Pelah, D., Shoseyov, O., Altman, A., Characterization of BspA, a major boiling-stable,
614 water-stress-responsive protein in aspen (*Populus tremula*). *Tree Physiol.* 1995, 15, 673-
615 678.

- 616 [39] Plomion, C., Lalanne, C., Claverol, S., Meddour, H., *et al.*, Mapping the proteome of
617 poplar and application to the discovery of drought-stress responsive proteins. *Proteomics*
618 2006, 6, 6509-6527.
- 619 [40] Hall, N.M., Griffiths, H., Corlett, J.A., Jones, H.G., *et al.*, Relationships between water-
620 use traits and photosynthesis in *Brassica oleracea* resolved by quantitative genetic
621 analysis. *Plant Breed.* 2005, 124, 557-564.
- 622 [41] Handley, L.L., Nevo, E., Raven, J.A., Martinez-Carrasco, R., *et al.*, Chromosome 4
623 controls potential water use efficiency in barley. *J. Exp. Bot.* 1994, 45, 1661-1663.
- 624 [42] Juenger, T.E., Mckay, J.K., Hausmann, N., Keurentjes, J.J.B., *et al.*, Identification and
625 characterization of QTL underlying whole-plant physiology in *Arabidopsis thaliana*:
626 $\delta^{13}\text{C}$, stomatal conductance and transpiration efficiency. *Plant, Cell and Environ.* 2005,
627 28, 697-708.
- 628 [43] Price, A.H., Cairns, J.E., Horton, P., Jones, H.G., Griffiths, H., Linking drought-
629 resistance mechanisms to drought avoidance in upland rice using a QTL approach:
630 progress and new opportunities to integrate stomatal and mesophyll responses. *J. Exp.*
631 *Bot.* 2002, 53, 989-1004.
- 632 [44] Teulat, B., Merah, O., Sirault, X., Borries, C., *et al.*, QTLs for grain carbon isotope
633 discrimination in Weld-grown barley. *Theor. Appl. Genet.* 2002, 106, 118-126.
- 634 [45] Thumma, B.R., Naidu, B.P., Chandra, A., Cameron, D.F., *et al.*, Identification of causal
635 relationships among traits related to drought resistance in *Stylosanthes scabra* using QTL
636 analysis. *J. Exp. Bot.* 2001, 52, 203-214.
- 637 [46] Xu, X., Martin, B., Comstock, J.P., Vision, T.J., *et al.*, Fine mapping a QTL for carbon
638 isotope composition in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 2008, 117, 221-233.

- 639 [47] Karaba, A., Dixit, S., Greco, R., Aharoni, A., *et al.*, Improvement of water use efficiency
640 in rice by expression of HARDY, an *Arabidopsis* drought and salt tolerance gene. *PNAS*
641 2007, 104, 15270-15275.
- 642 [48] Masle, J., Gilmore, S.R., Farquhar, G.D., The ERECTA gene regulates plant
643 transpiration efficiency in *Arabidopsis*. *Nature* 2005, 436, 866-870.
- 644 [49] Craig, H., Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-
645 spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochim. Cosmochim. Ac.* 1957, 12, 133-149.
- 646 [50] Damerval, C., de Vienne, D., Zivy, M., Thiellement, H., Technical improvements in two-
647 dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-
648 seedling proteins. *Electrophoresis* 1986, 7, 52-54.
- 649 [51] Gion, J.M., Lalanne, C., Le Provost, G., Ferry-Dumazet, H., *et al.*, The proteome of
650 maritime pine wood forming tissue. *Proteomics* 2005, 5, 3731-3751.
- 651 [52] Ramagli, L.S., Rodriguez, L.V., Quantitation of microgram amounts of protein in two-
652 dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. *Electrophoresis* 1985, 6,
653 559-563.
- 654 [53] Görg, A., Postel, W., Weser, J., Gunther, S., *et al.*, Elimination of point streaking on
655 silver stained two-dimensional gels by addition of iodoacetamide to the equilibration
656 buffer. *Electrophoresis* 1987, 8, 122-124.
- 657 [54] Storey, J.D., Tibshirani, R., Statistical significance for genome wide studies. *PNAS* 2003,
658 100, 9440-9445.
- 659 [55] Caraux, G., Pinloche, S., Permutmatrix: A graphical environment to arrange gene
660 expression profiles in optimal linear order. *Bioinformatics* 2005, 21, 1280-1281.
- 661 [56] Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A., Role of plant heat-shock proteins and
662 molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* 2004, 9, 244-252.

- 663 [57] Herbert, S.K., A new regulatory role for the chloroplast ATP synthase. *PNAS* 2002, 99,
664 12518-12519.
- 665 [58] Ranieri, A., Giuntini, D., Ferraro, F., Nali, C. *et al.*, Chronic ozone fumigation induces
666 alterations in thylakoid functionality and composition in two poplar clones. *Plant*
667 *Physiol. Biochem.* 2001, 39, 999-1008.
- 668 [59] Blödner, C., Majcherczyk, A., Kues, U., Polle, A., Early drought-induced changes to the
669 needle proteome of Norway spruce. *Tree Physiol.* 2007, 27, 1423-1431.
- 670 [60] Lichtenthaler, H.K., The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid
671 biosynthesis in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1999, 50, 47-65.
- 672 [61] Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D., Rohdich, F., Biosynthesis of isoprenoids via the
673 non-mevalonate pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* 2004, 61, 1401-1426.
- 674 [62] Parida, A.K., Dagaonkar, V.S., Phalak, M.S., Umalkar, G.V., Aurangabadkar, L.P.,
675 Alterations in photosynthetic pigments, protein and osmotic components in cotton
676 genotypes subjected to short-term drought stress followed by recovery. *Plant Biotechnol.*
677 *Rep.* 2007, 1, 37-48.
- 678 [63] Lorimer, G.H., Andrews, T.J., in: Hatch, M.D., Boardman, N.K. (Eds.), *The*
679 *Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise: Photosynthesis*, Academic Press,
680 New York 1981, pp 329-374.
- 681 [64] Husic, D.W., Husic, H.D., Tolbert, N.E., The oxidative photosynthetic carbon cycle or
682 C₂ cycle. *Crit. Rev. Plant Sci.* 1987, 5, 45-100.
- 683 [65] Wingler, A., Quick, W.P., Bungard, R.A., Bailey, K.J., *et al.*, The role of
684 photorespiration during drought stress: an analysis utilizing barley mutants with reduced
685 activities of photorespiratory enzymes. *Plant, Cell and Environ.* 1999, 22, 361-373.

- 686 [66] Park, Y.-I., Chow, W.S., Osmond, C.B., Anderson, J.M., Electron transport to oxygen
687 mitigates against photoinactivation of photosystem II in vivo. *Photosynth. Res.* 1996, 50,
688 23–32.
- 689 [67] Osmond, B., Badger, M., Maxwell, K., Björkman, O., Leegood, R.C., Too many
690 photons: photorespiration, photoinhibition and photooxidation. *Trends in Plant Sci.* 1997,
691 2, 119-121.
- 692 [68] Osmond, C.B., Grace, S.C., Perspectives on photoinhibition and photorespiration in the
693 field: quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis? *J.*
694 *Exp. Bot.* 1995, 46, 1351-1362.
- 695 [69] Bohnert, H.J., Jensen, R.G., Strategies for engineering water-stress tolerance in plants.
696 *TIBTECH.* 1996, 14, 89-97.
- 697 [70] Hajheidari, M., Eivazi, A., Buchanan, B.B., Wong, J.H., *et al.*, Proteomics uncovers a
698 role for redox in drought tolerance in wheat. *J. Proteome Res.* 2007, 6, 1451-1460.
- 699 [71] Kim, J., Mayfield, S.P., Protein disulfide isomerase as a regulator of chloroplast
700 translational activation. *Science* 2008, 278, 1954-1957.
- 701 [72] Aoki, K., Kragler, F., Xoconostle-Cázares, B., Lucas, W.J., A subclass of plant heat
702 shock cognate 70 chaperones carries a motif that facilitates trafficking through
703 plasmodesmata. *PNAS* 2002, 99, 16342-16347.
- 704 [73] Xoconostle-Cázares, B., Xiang, Y., Ruiz-Medrano, R., Wang, H.-L., *et al.*, Plant paralog
705 to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem. *Science*
706 1999, 283, 94-98.
- 707 [74] Alvim, F.C., Carolino, S.M.B., Cascardo, J.C.M., Nunes, C.C., *et al.*, Enhanced
708 accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. *Plant Physiol.*
709 2001, 126, 1042-1054.

- 710 [75] Cho, E.K., Hong, C.B., Over-expression of tobacco NtHSP70-1 contributes to drought-
711 stress tolerance in plants. *Plant Cell Rep.* 2006, 25, 349-358.
- 712 [76] Veljovic-Jovanovic, S., Kukavica, B., Stevanovic, B., Navari-Izzo, F., Senescence- and
713 drought-related changes in peroxidase and superoxide dismutase isoforms in leaves of
714 *Ramonda serbica*. *J. Exp. Bot.* 2006, 57, 1759-1768.
- 715 [77] Schwanz, P., Polle, A., Differential stress responses of antioxidative systems to drought
716 in pedunculate oak (*Quercus robur*) and maritime pine (*Pinus pinaster*) grown under high
717 CO₂ concentrations. *J. Exp. Bot.* 2001, 52, 133-143.
- 718 [78] Mundree, S.G., Baker, B., Mowla, S., Peters, S., *et al.*, Physiological and molecular
719 insights into drought tolerance. *Afr. J. Biotech.* 2002, 1, 28-38.
- 720 [79] Zhu, Y., Lin, K.R., Huang, Y., Tauer, C.G., Martin, B., A cDNA from tomato
721 (*Lycopersicon pennellii*) encoding ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase
722 activase (Accession No. AF037361) (PRG98-0053). *Plant Physiol.* 1998, 116, 1603-
723 1606.
- 724 [80] Gimenez, C., Mitchell, V.J., Lawlor, D.W., Regulation of photosynthetic rate of two
725 sunflower hybrids under water stress. *Plant Physiol.* 1992, 98, 516-524.
- 726 [81] Sakurai, I., Hagio, M., Combos, Z., Tyystjarvi, T., *et al.*, Requirement of
727 phosphatidylglycerol for maintenance of photosynthetic machinery. *Plant Physiol.* 2003,
728 133, 1376-1384.
- 729 [82] Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Lytovchenko, A., Smith, A.M.O., *et al.*, Enhanced
730 photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial
731 malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. *Plant Physiol.* 2005, 137, 611-
732 622.

- 733 [83] Breitenberger, C.A., Spemulli, L.L., Purification of *Euglena gracilis* chloroplast
734 elongation factor G and comparison with other prokaryotic and eukaryotic translocases. *J.*
735 *Biol. Chem.* 1980, 255, 9814-9820.
- 736 [84] Kiddle, G., Pastori, G.M., Bernard, S., Pignocchi, C., *et al.*, Effects of leaf ascorbate
737 content on defence and photosynthesis gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Antioxid.*
738 *Redox Sign.* 2003, 5, 3-32.
- 739 [85] Harley, P.C., Tenhunen, J.D., in: Boote K.J. (Eds.), *Modelling Crop Photosynthesis-from*
740 *Biochemistry to Canopy*, Crop Science Society of America, Madison 1991, pp. 17-39.
- 741 [86] Ludwig, J., Calvin, D.T., The rate of photorespiration during photosynthesis and the
742 relationship of the substrate of light respiration to the products of photosynthesis in
743 sunflower leaves. *Plant Physiol.* 1971, 48, 712-719.
- 744 [87] Oliver, D.J., The glycine decarboxylase complex from plant mitochondria. *Ann. Rev.*
745 *Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1994, 45, 323-337.
- 746 [88] Suzuki, A., Rioual, S., Lemarchand, S., Godfroy, N., *et al.*, Regulation by light and
747 metabolites of ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize. *Physiol. Plant.* 2001,
748 112, 524-530.
- 749 [89] Carrari, F., Nunes-Nesi, A., Gibon, Y., Lytovchenko, A., *et al.*, Reduced expression of
750 aconitase results in an enhanced rate of photosynthesis and marked shifts in carbon
751 partitioning in illuminated leaves of wild species tomato. *Plant Physiol.* 2003, 133, 1-14.
- 752 [90] Jahan, M.S., Ogawa, K., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., *et al.*, Deficient glutathione in
753 guard cells facilitates abscisic acid-induced stomatal closure but does not affect light-
754 induced stomatal opening. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2008, 72, 2795-2798.

Table 2. Protein identities of the reliably identified spots which displayed a significant genotype by treatment interaction

Spot no. ^a	Assignment	Dbase ^b	TC or Protein id ^c	# pep. ^d	Cover. ^e	Accession no. ^f	Species	Theoretical ^g		Experimental		G × T ^h	
								M _r (Da)	pI	M _r (Da)	pI	p-value	q-value
Amino acid metabolism													
Glycine, serine and threonine metabolism													
98	Dihydrolipoyl dehydrogenase (EC=1.8.1.4)	JGI	656596	6	16.2	Q93WQ1	<i>Bruguiera gymnorhiza</i>	53967	6.7	33950	5.7	0.013	0.050
111	Dihydrolipoyl dehydrogenase (EC=1.8.1.4)	JGI	656596	4	11.2	Q93WQ1	<i>Bruguiera gymnorhiza</i>	53967	6.7	28768	5.3	0.008	0.042
6	Glycine dehydrogenase (EC=1.4.4.2)	JGI	832093	6	5.38	O49954	<i>Solanum tuberosum</i>	112914	6.5	87086	6.4	0.001	0.020
411	Glycine dehydrogenase (EC=1.4.4.2)	JGI	832093	4	3.58	O49954	<i>Solanum tuberosum</i>	112914	6.5	61602	6.1	0.006	0.037
425	Glycine dehydrogenase (EC=1.4.4.2)	JGI	832093	7	8.02	O49954	<i>Solanum tuberosum</i>	112914	6.5	66682	6.1	0.005	0.037
Methionine metabolism													
230	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase (EC=2.1.1.14)	JGI	821018	12	19.7	Q42699	<i>Catharanthus roseus</i>	84857	6.1	78627	6.6	0.004	0.037
		JGI	679841	8	12.5								
		JGI	738500	6	9.7								
Carbohydrate metabolism													
Citrate cycle													
551	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial (EC=6.2.1.4)	JGI	730613	6	17.1	O82662	<i>Arabidopsis thaliana</i>	45346	6.3	43214	5.6	0.008	0.042
Pentose and glucuronate interconversions													
407	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase (EC=2.7.7.9)	JGI	592888	7	19.8	Q9SDX3	<i>Musa acuminata</i>	51362	5.5	57071	6.4	0.005	0.037
Energy metabolism													
Carbon fixation													
154	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B, chloroplastic (EC=1.2.1.13)	JGI	831715	8	24.6	P12859	<i>Pisum sativum</i>	48097	7.6	46948	6.4	0.003	0.035
92	Phosphoglycerate kinase (EC=2.7.2.3)	JGI	832630	5	11.9	O82160	<i>Populus nigra</i>	50298	8.5	37828	5.0	0.009	0.043
106	Phosphoglycerate kinase (EC=2.7.2.3)	JGI	832630	10	27.7	O82160	<i>Populus nigra</i>	50298	8.5	43321	6.0	0.005	0.037
503	Phosphoglycerate kinase (EC=2.7.2.3)	JGI	833719	13	35.8	O82160	<i>Populus nigra</i>	50298	8.5	43178	5.8	0.012	0.049
161	Putative ribose 5-phosphate isomerase	JGI	241207	4	25.6	Q9S726	<i>Arabidopsis thaliana</i>	29306	5.7	27374	4.9	0.012	0.049
43	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain (EC=4.1.1.39)	PplGI	TC43608	4	9.2	A4GYR8	<i>Populus trichocarpa</i>	52601	6.0	30862	6.6	0.000	0.009
44	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain (EC=4.1.1.39)	PplGI	TC43608	4	6.7	A4GYR8	<i>Populus trichocarpa</i>	52601	6.0	37828	6.6	0.013	0.050
48	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain (EC=4.1.1.39)	PplGI	TC43608	2	4.2	A4GYR8	<i>Populus trichocarpa</i>	52601	6.0	21410	5.4	0.008	0.042
53	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain (EC=4.1.1.39)	PplGI	TC43608	5	12.9	A4GYR8	<i>Populus trichocarpa</i>	52601	6.0	35601	6.3	0.011	0.046

Table 2. (continued)

Spot no. ^a	Assignment	Dbase ^b	TC or Protein id ^c	# pep. ^d	Cover. ^e	Accession no. ^f	Species	Theoretical ^g		Experimental		G × T ^h	
								M _r (Da)	pI	M _r (Da)	pI	p-value	q-value
59	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (EC=4.1.1.39)	PplGI	TC43608	4	9.6	A4GYR8	<i>Populus trichocarpa</i>	52601	6.0	29546	6.4	0.001	0.020
171	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (EC=4.1.1.39)	PplGI	TC43608	5	11.7	A4GYR8	<i>Populus trichocarpa</i>	52601	6.0	30862	6.6	0.006	0.038
197	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (EC=4.1.1.39)	PplGI	TC43608	4	8.4	A4GYR8	<i>Populus trichocarpa</i>	52601	6.0	30790	5.9	0.007	0.042
229	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (EC=4.1.1.39)	PplGI	TC43608	3	6.9	A4GYR8	<i>Populus trichocarpa</i>	52601	6.0	23874	5.3	0.000	0.003
237	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (EC=4.1.1.39)	PplGI	TC43608	2	5.8	A4GYR8	<i>Populus trichocarpa</i>	52601	6.0	35961	6.1	0.000	0.009
250	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (EC=4.1.1.39)	PplGI	TC43608	2	5.6	A4GYR8	<i>Populus trichocarpa</i>	52601	6.0	31795	6.0	0.005	0.037
307	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (EC=4.1.1.39)	PplGI	TC43608	2	4.8	A4GYR8	<i>Populus trichocarpa</i>	52601	6.0	29125	6.0	0.001	0.024
5	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (RuBisCO large subunit)	JGI	270932	2	22.8	Q9GHP8	<i>Poliothyrsis sinensis</i>	51675	6.0	31005	6.4	0.007	0.042
113	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplast	PplGI	TC50610	7	16.2	Q06B50	<i>Acer rubrum</i>	51650	6.1	49461	5.1	0.008	0.043
37	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic	JGI	421185	7	16.9	O98997	<i>Vigna radiata</i>	47902	7.6	26661	5.2	0.002	0.025
		JGI	227384	4	13.2	P10896	<i>Arabidopsis thaliana</i>	51981	5.9				
51	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic	JGI	227384	6	16.5	P10896	<i>Arabidopsis thaliana</i>	51981	5.9	26742	5.1	0.009	0.043
188	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic	JGI	227384	2	8	P10896	<i>Arabidopsis thaliana</i>	51981	5.9	30144	4.9	0.008	0.043
496	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase	PplGI	TC68558	7	17.2	Q19RP2	<i>Pachysandra terminalis</i>	34548	5.6	47379	5.7	0.002	0.027
158	RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha, chloroplastic	JGI	833331	9	20	P08926	<i>Pisum sativum</i>	61979	5.2	65584	5.0	0.010	0.045
38	Transketolase, chloroplast precursor	JGI	552034	7	11.4	Q43848	<i>Solanum tuberosum</i>	79992	5.9	71625	5.8	0.005	0.037
		PplGI	TC82233	6	8.6	Q9LZY8	<i>Arabidopsis thaliana</i>	81475	5.8				
58	Transketolase, chloroplast precursor	JGI	730849	6	12.3	Q43848	<i>Solanum tuberosum</i>	79992	5.9	60229	5.9	0.003	0.032
84	Transketolase, chloroplast precursor	JGI	730849	8	13.6	Q43848	<i>Solanum tuberosum</i>	79992	5.9	49102	6.0	0.004	0.036
		JGI	552034	6	10.2								
305	Transketolase, chloroplast precursor	PplGI	TC82233	7	11	Q9LZY8	<i>Arabidopsis thaliana</i>	81475	5.8	49892	5.6	0.009	0.043
		JGI	730849	7	13.1	Q43848	<i>Solanum tuberosum</i>	79992	5.9				

Table 2. (continued)

Spot no. ^a	Assignment	Dbase ^b	TC or Protein id ^c	# pep. ^d	Cover. ^e	Accession no. ^f	Species	Theoretical ^g		Experimental		G × T ^h	
								M _r (Da)	pI	M _r (Da)	pI	p-value	q-value
346	Transketolase, chloroplast precursor	PplGI	TC82233	8	11.4	Q9LZY8	<i>Arabidopsis thaliana</i>	81475	5.8	69703	5.8	0.004	0.037
468	Transketolase, chloroplast precursor	JGI	730849	8	15	Q43848	<i>Solanum tuberosum</i>	79992	5.9	49605	5.7	0.006	0.039
310	Transketolase, chloroplast precursor (EC=2.2.1.1)	JGI	730849	5	9.78	Q43848	<i>Solanum tuberosum</i>	79992	5.9	68192	6.1	0.011	0.045
ATP synthesis													
26	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic (EC=3.6.3.14)	PplGI	TC56146	2	6.1	Q37628	<i>Prototheca wickerhamii</i>	54953	7.6	34596	5.3	0.008	0.042
		JGI	292339	3	9	P56757	<i>Arabidopsis thaliana</i>	55328	5.2				
		JGI	594336	3	10.4	Q9BBS3	<i>Lotus japonicus</i>	55781	5.2				
347	Vacuolar ATP synthase subunit B 1	JGI	821076	13	32.38	Q40078	<i>Hordeum vulgare</i>	54026	5.1	58581	5.2	0.000	0.012
74	Vacuolar H ⁺ -ATPase subunit C	PplGI	TC44382	3	10.30	Q0PGG3	<i>Gossypium hirsutum</i>	42674	5.5	25170	6.6	0.004	0.037
		PplGI	TC46138	3	9.20								
Photosynthesis													
470	Ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme, chloroplast precursor	JGI	827055	7	25.9	P10933	<i>Pisum sativum</i>	40194	8.6	34883	6.5	0.001	0.020
		JGI	817211	5	19.8								
572	Ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme, chloroplast precursor	JGI	827055	7	26.2	P10933	<i>Pisum sativum</i>	40194	8.6	35099	6.5	0.006	0.037
277	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	JGI	813989	3	17.8	Q40459	<i>Nicotiana tabacum</i>	35228	5.9	68467	6.4	0.009	0.043
316	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	JGI	813989	3	13.9	Q40459	<i>Nicotiana tabacum</i>	35228	5.9	31436	5.2	0.000	0.003
570	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	JGI	716206	2	10.3	Q9LRC4	<i>Bruguiera gymnorhiza</i>	35137	6.5	30826	5.3	0.005	0.037
		JGI	813989	2	10.2	Q40459	<i>Nicotiana tabacum</i>	35228	5.9				
Lipid Metabolism													
Biosynthesis of steroids													
103	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (EC=1.1.1.267)	JGI	728585	5	12.3	Q70KX8	<i>Populus tremula</i> x <i>Populus alba</i>	51317	5.8	48169	5.7	0.012	0.049
Oxidative stress													
7	2-Cys peroxiredoxin	JGI	576525	2	9.3	Q93X25	<i>Pisum sativum</i>	28864	6.0	25138	5.1	0.009	0.043
		JGI	832036	2	9.5								
805	Cytosolic ascorbate peroxidase	JGI	821619	5	28.9	Q41712	<i>Vigna unguiculata</i>	27034	5.6	28541	5.8	0.011	0.046
205	Peroxidase (EC=1.11.1.7)	JGI	714789	3	12.5	Q43854	<i>Phaseolus angularis</i>	39068	8.5	52815	5.6	0.008	0.042

Table 2. (continued)

Spot no. ^a	Assignment	Dbase ^b	TC or Protein id ^c	# pep. ^d	Cover. ^e	Accession no. ^f	Species	Theoretical ^g		Experimental		G × T ^h	
								M _r (Da)	pI	M _r (Da)	pI	p-value	q-value
Protein metabolism													
Protein folding													
522	20 kDa chaperonin, chloroplastic	JGI	736748	5	27.1	O65282	Arabidopsis thaliana	26802	8.9	27504	5.4	0.003	0.035
79	Heat shock cognate 70 kDa protein	JGI	739211	3	18.4	P27322	Solanum lycopersicum	70707	5.1	71213	5.3	0.003	0.032
		JGI	832542	13	26.7								
		JGI	563894	11	24.4								
		JGI	675629	10	24.1								
		JGI	822482	9	21.6								
		JGI	563887	12	26.7								
192	Heat shock cognate 70 kDa protein	JGI	563894	11	22.53	P27322	Solanum lycopersicum	70707	5.1	71350	5.4	0.004	0.036
492	Heat shock cognate 70 kDa protein	JGI	563894	5	11.3	P27322	Solanum lycopersicum	70707	5.1	46589	5.1	0.010	0.044
104	Heat shock protein HSP70	JGI	563894	9	20.5	Q9M6R1	Malus domestica	71216	5.2	70526	5.3	0.002	0.025
		JGI	587192	7	16.6	Q40980	Pisum sativum	71167	5.2	70595	5.3	0.011	0.045
		JGI	563887	7	15	Q9M4E6	Cucumis sativus	70828	5.3				
		JGI	563887	6	10.2	Q8GSN4	Cucurbita maxima	70813	5.1				
254	Protein disulfide-isomerase precursor (PDI)	JGI	280896	11	25	Q43116	Ricinus communis	55561	5.0	66270	5.0	0.003	0.034
		JGI	643603	16	36.8								
		JGI	801273	3	8.1								
Proteolysis													
389	Acyl-peptide hydrolase-like	PplGI	TC62254	3	19.8	Q9FG66	Arabidopsis thaliana	75423	5.1	75195	5.3	0.010	0.045
		JGI	798903	5	11.3								
Miscellaneous													
218	Aluminum-induced protein-like	JGI	657667	3	16.53	Q9FG81	Arabidopsis thaliana	27509	6.4	27990	5.5	0.006	0.039
35	Germin-like protein	PplGI	TC49791	3	12.5	A7Y2G2	Chimonanthus praecox	22354	5.9	25446	6.6	0.005	0.037
		PplGI	TC51689	3	12								
186	GTP-binding protein TypA	JGI	819068	7	15.7	Q6SYB1	Trifolium pratense	74909	6.8	73341	6.1	0.001	0.020
169	Mangrin	JGI	198984	2	10.2	Q9AYT8	Bruguiera sexangula	27918	9.3	24587	6.2	0.000	0.004

^a Excised spot number (spot no.), refers to the spot number labelled in Figure 2.^b PplGI: hit on *Populus* Gene Index v3.0 database from the DFCI's Gene Indices, JGI: hit on the *Populus trichocarpa* v1.1 database from the Joint Genome Institute (Dbase).^c Tentative consensus (TC) or protein identifier (protein id) given in the DFCI and the JGI databases, respectively.^d Number of matching peptides (# pep.).^e Ratio of the amino acids in detected peptides to total protein amino acids: coverage (Cover., %).^f Accession number (accession no.) of the corresponding protein in the Uniprot database.^g Theoretical molecular mass (M_r) and isoelectric point (pI) computed by the ExPASy website.^h p-value and q-value given for the genotype by treatment interaction [G × T] from the two-way ANOVA.

Table 3. Protein identities of the reliably identified spots which displayed a significant rank correlation between spot abundance and Δ values ($n = 8$).

Spot no. ^a	Assignment	Dbase ^b	TC or Protein id ^c	# pep. ^d	Cover. ^e	Accession no. ^f	Species	Theoretical ^g		Experimental		Spearman rank ^h			
								M _r (Da)	pI	M _r (Da)	pI	WW		WD	
												r _s	p-value	r _s	p-value
Amino Acid Metabolism															
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis															
380	2-isopropylmalate synthase 2, chloroplastic (EC=2.3.3.13)	JGI	207648	9	21.1	Q9C550	Arabidopsis thaliana	68136	6.0	64622	6.0	0.83	0.015	-	ns
Methionine metabolism															
180	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase (EC=2.1.1.14)	JGI	679841	6	11	Q42699	Catharanthus roseus	84857	6.1	79039	6.7	0.83	0.015	-	ns
723	Spermidine synthase	JGI	657096	3	11.3	Q8GTQ5	Malus domestica	36392	4.8	40700	4.9	-0.79	0.028	-	ns
Glycine, serine and threonine metabolism															
3	Glycine dehydrogenase (EC=1.4.4.2)	JGI	832093	6	6.6	O49954	Solanum tuberosum	112914	6.5	89143	6.4	0.81	0.022	-	ns
6	Glycine dehydrogenase (EC=1.4.4.2)	JGI	832093	6	5.38	O49954	Solanum tuberosum	112914	6.5	87086	6.4	0.76	0.037	-	ns
19	Glycine dehydrogenase (EC=1.4.4.2)	JGI	832093	6	6.32	O49954	Solanum tuberosum	112914	6.5	73272	6.5	0.74	0.046	-	ns
30	Glycine dehydrogenase (EC=1.4.4.2)	JGI	832093	2	1.98	O49954	Solanum tuberosum	112914	6.5	88914	6.5	0.83	0.015	-	ns
142	Glycine dehydrogenase (EC=1.4.4.2)	JGI	832093	4	4.15	O49954	Solanum tuberosum	112914	6.5	88914	6.3	0.74	0.046	-	ns
206	Glycine dehydrogenase (EC=1.4.4.2)	JGI	832093	2	2.55	O49954	Solanum tuberosum	112914	6.5	88914	6.3	0.74	0.046	-	ns
232	Glycine dehydrogenase (EC=1.4.4.2)	JGI	832093	3	3.96	O49954	Solanum tuberosum	112914	6.5	73410	6.4	0.74	0.046	-	ns
678	Glycine dehydrogenase (EC=1.4.4.2)	JGI	832093	4	4.62	O49954	Solanum tuberosum	112914	6.5	52265	5.9	-0.79	0.028	-	ns
Carbon metabolism															
Glycolysis / Gluconeogenesis															
825	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase (EC=5.4.2.1)	JGI	739764	7	17.9	P35493	Ricinus communis	60818	5.5	65721	5.7	0.95	0.001	-	ns
Citrate cycle															
54	Aconitate hydratase, cytoplasmic (EC=4.2.1.3)	JGI	816803	11	15	P49608	Cucurbita maxima	98005	5.7	88914	6.5	0.76	0.037	-	ns
551	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit beta, mitochondrial (EC=6.2.1.4)	JGI	730613	6	17.1	O82662	Arabidopsis thaliana	45346	6.3	43214	5.6	-	ns	0.83	0.015
Ascorbate and aldarate metabolism															
605	Monodehydroascorbate reductase (NADH)-like protein	JGI	836268	3	11.1	Q0WUV6	Arabidopsis thaliana	46487	6.4	26791	5.4	-0.98	0.000	-	ns
Energy metabolism															
ATP synthesis															
554	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic (EC=3.6.3.14)	JGI	292334	4	16.1	P00823	Nicotiana tabacum	55454	5.1	57071	5.4	-0.81	0.022	-	ns
		JGI	285169	3	13.2	Q9BBS3	Lotus japonicus	55781	5.2						
		JGI	594336	3	15.8										
565	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic (EC=3.6.3.14)	PpLGI	TC76839	6	11.4	Q9MU41	Magnolia tripetala	53624	5.4	57757	5.3	-0.83	0.015	-	ns
		JGI	242776	2	4.2	Q8MCB3	Populus tomentosa	53568	5.0						

Table 3. (continued)

Spot no. ^a	Assignment	Dbase ^b	TC or Protein id ^c	# pep. ^d	Cover. ^e	Accession no. ^f	Species	Theoretical ^g		Experimental		Spearman rank ^h			
								M _r (Da)	pI	M _r (Da)	pI	WW		WD	
												r _s	p-value	r _s	p-value
Carbon fixation															
106	Phosphoglycerate kinase (EC=2.7.2.3)	JGI	832630	10	27.7	O82160	<i>Populus nigra</i>	50298	8.5	43321	6.0	0.81	0.022	-	ns
644	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic	JGI	227384	4	15.6	P10896	<i>Arabidopsis thaliana</i>	51981	5.9	46158	5.9	-0.74	0.046	-	ns
647	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic	JGI	227384	4	10.8	P10896	<i>Arabidopsis thaliana</i>	51981	5.9	28833	5.0	-0.86	0.011	-	ns
563	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplast	JGI	421185	6	18.9	O98997	<i>Vigna radiata</i>	47902	7.6	45440	5.2	-	ns	-0.74	0.046
433	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplast	JGI	421185	4	13.7	O98997	<i>Vigna radiata</i>	47902	7.6	44865	5.2	-	ns	-0.74	0.046
496	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase	PplGI	TC87535	2	8.3	Q9AXG0	<i>Gossypium hirsutum</i>	48355	5.1	47379	5.7	-	ns	-0.86	0.011
		PplGI	TC68558	7	17.2	Q19RP2	<i>Pachysandra terminalis</i>	34548	5.6						
549	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, chloroplast precursor	JGI	567316	7	20.7	O20252	<i>Spinacia oleracea</i>	42081	5.9	43680	5.1	-0.83	0.015	-	ns
482	Triosephosphate isomerase, chloroplastic (EC=5.3.1.1)	JGI	721810	9	34.9	Q9M4S8	<i>Fragaria ananassa</i>	33526	7.7	27310	5.3	-0.90	0.005	-	ns
		JGI	713199	7	34.8										
Methane metabolism															
259	S-formylglutathione hydrolase (EC=3.1.2.12)	PplGI	TC43956	4	14.4	Q8LAS8	<i>Arabidopsis thaliana</i>	31656	5.9	32442	6.5	0.81	0.022	-	ns
		PplGI	TC58624	4	14.4										
Nitrogen metabolism															
139	Ferredoxin-dependent glutamate synthase 1 (EC=1.4.7.1)	JGI	819004	2	1.7	Q9ZNZ7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	179920	6.1	79863	6.5	0.79	0.028	-	ns
652	Ferredoxin-dependent glutamate synthase, chloroplast (Fd-GOGAT) (EC=1.4.7.1)	JGI	825050	4	4.4	Q43155	<i>Spinacia oleracea</i>	165402	5.8	69703	5.9	-	ns	-0.76	0.037
76	Glutamine synthetase cytosolic isozyme 1 (EC=6.3.1.2)	JGI	710678	2	5.6	P51118	<i>Vitis vinifera</i>	39199	5.8	36284	5.5	-0.79	0.028	-	ns
		JGI	831163	2	5.6										
		JGI	716066	2	5.6	P14656	<i>Oryza sativa</i>	39201	5.5						
99	Putative formamidase	JGI	818419	4	11.3	Q8H1G4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	49698	5.5	51167	6.0	0.81	0.022	-	ns
Photosynthesis															
28	Ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme, chloroplast precursor	JGI	817211	3	12.1	P10933	<i>Pisum sativum</i>	40194	8.6	26062	5.7	-0.90	0.005	-	ns
Nucleotide Metabolism															
162	Adenosine kinase 2 (EC=2.7.1.20)	JGI	720292	3	13.8	Q9LZG0	<i>Arabidopsis thaliana</i>	37846	5.1	45512	5.1	-0.79	0.028	-	ns
370	Dihydropyrimidinase (EC=3.5.2.2)	JGI	722702	4	11.86	Q9FMP3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	57991	5.6	63799	6.1	0.88	0.007	-	ns

Table 3. (continued)

Spot no. ^a	Assignment	Dbase ^b	TC or Protein id ^c	# pep. ^d	Cover. ^e	Accession no. ^f	Species	Theoretical ^g		Experimental		Spearman rank ^h			
								M _r (Da)	pI	M _r (Da)	pI	WW		WD	
												r _s	p-value	r _s	p-value
Protein metabolism															
Translation															
314	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 56 (EC=3.6.1.-)	JGI	578196	3	8.4	Q9LFN6	Arabidopsis thaliana	48337	5.4	50412	5.7	0.76	0.037	-	ns
		JGI	819597	3	8.4										
Protein folding															
192	Heat shock cognate 70 kDa protein	JGI	563894	11	22.53	P27322	Solanum lycopersicum	70707	5.1	71350	5.4	0.76	0.037	-	ns
457	Heat shock protein 70	JGI	596744	9	14.9	Q39641	Cucumis sativus	75412	5.2	73204	5.0	-0.79	0.028	-	ns
		JGI	828338	8	13.6										
775	Heat shock protein 70	JGI	596744	14	27.1	Q39641	Cucumis sativus	75412	5.2	73547	5.1	-0.76	0.037	-	ns
		PplGI	TC75567	3	8.9										
Proteolysis															
765	Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha (EC=3.4.24.64)	JGI	815252	4	8.7	P29677	Solanum tuberosum	54677	5.7	53364	5.7	0.74	0.046	-	ns
442	Putative aminopeptidase (M1 aminopeptidase)	JGI	830842	7	10.7	Q8H0S9	Arabidopsis thaliana	99159	5.4	85029	5.6	0.81	0.022	-	ns
170	Putative aminopeptidase (M1 aminopeptidase)	JGI	830842	2	2.8	Q8H0S9	Arabidopsis thaliana	99159	5.4	83200	5.5	-	ns	-0.76	0.037
Miscellaneous															
258	Coatomer subunit delta	JGI	824854	2	4.5	Q93Y22	Arabidopsis thaliana	57719	5.6	61465	5.9	0.76	0.037	-	ns
748	Elongation factor G, chloroplastic	JGI	711780	6	11	P34811	Glycine max	86957	5.5	78215	5.3	-0.86	0.011	-	ns
186	GTP-binding protein TypA	JGI	819068	7	15.7	Q6SYB1	Trifolium pratense	74909	6.8	73341	6.1	-	ns	-0.76	0.037
679	F14P1.8 protein	JGI	830061	5	26.2	Q9FWR5	Arabidopsis thaliana	29971	7.1	30215	6.5	0.95	0.001	-	ns
691	T-complex protein 1 subunit alpha	JGI	836390	6	13	P28769	Arabidopsis thaliana	59229	5.9	61876	6.0	-	ns	-0.98	0.000

^a Excised spot number (spot no.), refers to the spot number labelled in Figure 2.

^b PplGI: hit on *Populus* Gene Index v3.0 database from the DFCI's Gene Indices, JGI: hit on the *Populus trichocarpa* v1.1 database from the Joint Genome Institute (Dbase).

^c Tentative consensus (TC) or protein identifier (protein id) given in the DFCI and the JGI databases, respectively.

^d Number of matching peptides (# pep.).

^e Ratio of the amino acids in detected peptides to total protein amino acids: coverage (Cover., %).

^f Accession number (accession no.) of the corresponding protein in the Uniprot database.

^g Theoretical molecular mass (M_r) and isoelectric point (pI) computed by the ExPASy website.

^h Spearman rank coefficient (r_s) with their associated p-value computed between protein abundance and Δ value from plants grown under well-watered (WW) and water deficit (WD) condition. Any negative r_s is indicated in bold.

Supporting information

Supplementary Table S1. Spots with significant Genotype by Treatment interaction. Spots did not fulfil the MS/MS criteria (indicated as “no hit”), identification was based on a single peptide or proteins showed multiple identifications (indicated as “cross-contamination”).

Supplementary Table S2. Spots with significant rank correlation between spot abundance and Δ values showing multiple identifications.

Supplementary Table S1. Spots with significant Genotype by Treatment interaction. Spots did not fulfil the MS/MS criteria (indicated as “no hit”), identification was based on a single peptide or proteins showed multiple identifications (indicated as “cross-contamination”).

Spot no. ^a	Assignment	Dbase ^b	TC or Protein id ^c	# pep. ^d	Cover. ^e	Accession no. ^f	Species	Theoretical ^g		Experimental		G × T ^h	
								M _r (Da)	pI	M _r (Da)	pI	p-value	q-value
No hit													
484	no hit	no hit	-	-	-	-	-	-	-	65721	6.0	0.001	0.025
513	no hit	no hit	-	-	-	-	-	-	-	67094	6.1	0.001	0.024
Identification based on only one peptide													
1	Germin-like protein	PplGI	TC49791	1	3.77	A7Y2G2	<i>Chimonanthus praecox</i>	22354	5.9	24781	6.1	0.003	0.032
21	P66 protein (glycosyl hydrolase 1 family)	PplGI	TC72140	1	6.4	Q84L69	<i>Hevea brasiliensis</i>	61412	6.1	71487	6.5	0.002	0.032
55	Late elongated hypocotyl	PplGI	TC58512	1	7.2	Q56TL1	<i>Castanea sativa</i>	83598	6.1	72174	6.0	0.005	0.037
333	ATP synthase gamma chain, chloroplastic (EC=3.6.3.14)	JGI	233277	1	4.1	P29790	<i>Nicotiana tabacum</i>	41447	8.2	28671	5.4	0.001	0.020
Cross contamination													
443	Carbonic anhydrase, chloroplastic (EC=4.2.1.1)	JGI	814132	6	30.1	P27141	<i>Nicotiana tabacum</i>	34511	6.4	27083	5.7	0.004	0.037
	3-isopropylmalate dehydratase, small subunit	JGI	415236	3	27.9	Q9ZW85	<i>Arabidopsis thaliana</i>	26790	6.3				
	20 kDa chaperonin, chloroplastic	JGI	739211	2	9.8	O65282	<i>Arabidopsis thaliana</i>	26802	8.9				
208	Ketol-acid reductoisomerase, chloroplastic (EC=1.1.1.86)	JGI	817858	2	4.2	Q05758	<i>Arabidopsis thaliana</i>	63812	6.4	62975	6.5	0.008	0.043
		JGI	827835	2	4.8								
	NAD-dependent malic enzyme 59 kDa isoform, mitochondrial (EC=1.1.1.39)	JGI	731028	5	8.4	P37225	<i>Solanum tuberosum</i>	66272	5.9				
479	F6I1.12 protein	JGI	563483	3	10.8	Q9FZ47	<i>Arabidopsis thaliana</i>	31295	5.0	31508	5.2	0.005	0.037
		JGI	725336	3	7.9								
	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	JGI	716206	4	18.4	Q9LRC4	<i>Bruguiera gymnorhiza</i>	35137	6.5				
165	ATP synthase gamma chain, chloroplastic (EC=3.6.3.14)	JGI	555320	4	14.7	P29790	<i>Nicotiana tabacum</i>	41447	8.2	28023	5.4	0.000	0.015
	Aluminum-induced protein-like	JGI	657667	4	25	Q9FG81	<i>Arabidopsis thaliana</i>	27509	6.4				
	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	JGI	716206	3	10.9	Q9LRC4	<i>Bruguiera gymnorhiza</i>	35137	6.5				
273	Putative uncharacterized protein T16L4.100	JGI	416669	4	29	Q9SU88	<i>Arabidopsis thaliana</i>	35373	7.0	27893	5.2	0.010	0.044
	Phosphoglycerate kinase (EC=2.7.2.3)	JGI	832630	4	11	O82160	<i>Populus nigra</i>	50298	8.5				

Supplementary Table S1. (Continued)

Spot no. ^a	Assignment	Dbase ^b	TC or Protein id ^c	# pep. ^d	Cover. ^e	Accession no. ^f	Species	Theoretical ^g		Experimental		G × T ^h	
								M _r (Da)	pI	M _r (Da)	pI	p-value	q-value
125	Chlorophyll a-b binding protein CP26, chloroplastic	JGI	743910	3	11.38	Q9XF89	<i>Arabidopsis thaliana</i>	30157	6.0	26596	5.2	0.010	0.044
	Probable plastid-lipid-associated protein 10, chloroplastic	JGI	552393	2	8.19	Q8W4F1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	31580	8.4				
132	Ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme, chloroplast precursor	JGI	827055	2	7.2	P10933	<i>Pisum sativum</i>	40194	8.6	33950	5.8	0.000	0.012
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A, chloroplastic (EC=1.2.1.13)	JGI	412421	2	6.9	P12858	<i>Pisum sativum</i>	43338	8.8				
234	Isocitrate dehydrogenase [NAD] regulatory subunit 1, mitochondrial (EC=1.1.1.41)	JGI	819931	5	18	Q8LFC0	<i>Arabidopsis thaliana</i>	39627	8.4	45009	6.3	0.007	0.042
	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic (EC=3.6.3.14)	JGI	285169	2	8.7	Q9BBS3	<i>Lotus japonicus</i>	55781	5.2				
		JGI	292339	2	9	P56757	<i>Arabidopsis thaliana</i>	55328	5.2				
		JGI	594336	2	10.4	Q9BBS3	<i>Lotus japonicus</i>	55781	5.2				
		JGI	292334	3	11.6	P00823	<i>Nicotiana tabacum</i>	55454	5.1				
392	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplast uncharacterized protein	JGI	421185	4	15.3	O98997	<i>Vigna radiata</i>	47902	7.6	60229	5.8	0.009	0.043
		JGI	713821	5	10.9	Q8VYA4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	65468	8.2				
148	Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial	JGI	833144	10	19.2	Q01899	<i>Phaseolus vulgaris</i>	72537	6.0	69840	5.5	0.000	0.009
	Ferredoxin-dependent glutamate synthase, chloroplast (Fd-GOGAT) (EC=1.4.7.1)	JGI	819004	2	2.1	Q9ZNZ7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	179920	6.1				
		JGI	825050	2	2.3	Q43155	<i>Spinacia oleracea</i>	165402	5.8				
222	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase (EC=5.4.2.1)	JGI	739764	7	17.7	P35493	<i>Ricinus communis</i>	60818	5.5	66064	5.7	0.003	0.035
	Phosphoglucomutase, cytoplasmic (EC=5.4.2.2)	JGI	832763	5	12.2	Q9ZSQ4	<i>Populus tremula</i>	63124	5.5				
537	uncharacterized protein	JGI	713821	8	16.6	Q8VYA4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	65468	8.2	60435	5.7	0.000	0.003
	Transketolase, chloroplast precursor	JGI	552034	7	11.3	Q43848	<i>Solanum tuberosum</i>	79992	5.9				
145	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic	JGI	227384	4	14.6	P10896	<i>Arabidopsis thaliana</i>	51981	5.9	30072	5.0	0.003	0.035
	Uncharacterized protein	JGI	675847	3	12.3	Q2V3Q7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	39485	6.2				

^a Excised spot number (spot no.), refers to the spot number labelled in Figure 2.

^b PplGI: hit on *Populus* Gene Index v3.0 database from the DFCI's Gene Indices, JGI: hit on the *Populus trichocarpa* v1.1 database from the Joint Genome Institute (Dbase).

^c Tentative consensus (TC) or protein identifier (protein id) given in the DFCI and the JGI databases, respectively.

^d Number of matching peptides (# pep.).

^e Ratio of the amino acids in detected peptides to total protein amino acids: coverage (Cover., %).

^f Accession number (accession no.) of the corresponding protein in the Uniprot database.

^g Theoretical molecular mass (M_r) and isoelectric point (pI) computed by the ExPASy website.

^h p -value and q -value given for the genotype by treatment interaction [$G \times T$] from the two-way ANOVA.

Supplementary Table S2. Spots with significant rank correlation between spot abundance and Δ values showing multiple identifications.

Spot no. ^a	Assignment	Dbase ^b	TC or Protein id ^c	# pep. ^d	Cover. ^e	Accession no. ^f	Species	Theoretical ^g		Experimental		Spearman rank ^h			
								M _r (Da)	pI	M _r (Da)	pI	WW		WD	
												r _s	p-value	r _s	p-value
827	Cytosolic ascorbate peroxidase	JGI	821619	5	25.3	Q41712	Vigna unguiculata	27034	5.6	28671	6.0	0.76	0.037	-	ns
	T24D18.18 protein	JGI	554915	6	32.6	Q9S9M7	Arabidopsis thaliana	34130	6.4						
		JGI	747358	6	33.5										
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic (EC=1.2.1.12)	JGI	575307	2	7.4	P25861	Antirrhinum majus	36685	8.3						
		JGI	728998	2	7.4	P26518	Magnolia liliiflora	36982	7.1						
208	Ketol-acid reductoisomerase, chloroplastic (EC=1.1.1.86)	JGI	817858	2	4.2	Q05758	Arabidopsis thaliana	63812	6.4	62975	6.5	0.74	0.046	-	ns
		JGI	827835	2	4.8										
	NAD-dependent malic enzyme 59 kDa isoform, mitochondrial (EC=1.1.1.39)	JGI	731028	5	8.4	P37225	Solanum tuberosum	66272	5.9						
684	Beta-primeverosidase (EC=3.2.1.149)	PpLGI	TC50417	5	24.1	Q7X9A9	Camellia sinensis	57041	9.0	26110	5.7	-0.81	0.022	-	ns
	Chlorophyll a-b binding protein 8, chloroplastic	JGI	664934	2	14.6	P27522	Solanum lycopersicum	29363	9.0						
	Putative uncharacterized protein At3g52150	JGI	202723	3	14.9	Q8VYM4	Arabidopsis thaliana	27748	8.9						
324	Putative oligopeptidase A	JGI	243706	10	18.3	Q94AM1	Arabidopsis thaliana	88757	5.9	74096	5.6	0.76	0.037	-	ns
		JGI	820137	9	17.8										
	Transketolase, chloroplast precursor	JGI	552034	6	10.2	Q43848	Solanum tuberosum	79992	5.9						
		JGI	730849	5	10.3										
194	S-adenosylmethionine synthetase (EC=2.5.1.6)	JGI	564333	4	13.4	P47916	Populus deltoides	43269	5.6	47666	5.7	0.76	0.037	-	ns
		JGI	724015	4	13.4										
	Eukaryotic initiation factor 4A (EC=3.6.1.-)	JGI	297570	3	10.3	P41381	Nicotiana tabacum	46888	5.6						
		JGI	645764	3	9.7										
		JGI	674047	3	18.7										
		JGI	681660	3	9.7										
261	Glycerol kinase (EC=2.7.1.30)	JGI	810168	3	7.13	Q6RUF8	Glycine max	56133	5.7	56796	6.4	0.95	0.001	-	ns
		PpLGI	TC65717	4	6.22										
	Aspartyl aminopeptidase	JGI	834353	4	8.9	Q9LST0	Arabidopsis thaliana	52426	6.3						
204	Chlorophyll a-b binding protein CP29.3, chloroplastic	JGI	832587	4	24.73	Q9S7W1	Arabidopsis thaliana	30212	5.2	27374	5.3	-0.81	0.022	-	ns
	Cytosolic ascorbate peroxidase	JGI	821619	4	16.06	Q41712	Vigna unguiculata	27034	5.6						
125	Chlorophyll a-b binding protein CP26, chloroplastic	JGI	743910	3	11.38	Q9XF89	Arabidopsis thaliana	30157	6.0	26596	5.2	-0.90	0.005	-	ns
	Probable plastid-lipid-associated protein 10, chloroplastic	JGI	552393	2	8.19	Q8W4F1	Arabidopsis thaliana	31580	8.4						
742	Putative seryl-tRNA synthetase	JGI	816363	3	8.4	Q8RWT8	Arabidopsis thaliana	57352	6.5	60641	5.8	0.90	0.005	-	ns
	AT3g46780/T6H20_190	JGI	549130	6	17.8	Q9ASP7	Arabidopsis thaliana	31245	8.9						
	Aldehyde dehydrogenase family 7 member B4 (EC=1.2.1.3)	JGI	745820	2	4.9	Q9SYG7	Arabidopsis thaliana	54208	5.5						

Supplementary Table S2. (Continued)

Spot no. ^a	Assignment	Dbase ^b	TC or Protein id ^c	# pep. ^d	Cover. ^e	Accession no. ^f	Species	Theoretical ^g		Experimental		Spearman rank ^h			
								M _r (Da)	pI	M _r (Da)	pI	WW		WD	
												r _s	p-value	r _s	p-value
843	Endoplasmin homolog	JGI	818818	5	7.7	P35016	Catharanthus roseus	93492	4.9	78490	5.2	-0.83	0.015	-	ns
	Putative heat-shock protein	JGI	548678	6	9.3	Q8VZ83	Arabidopsis thaliana	91711	5.1						
	Uncharacterized protein	JGI	837213	2	3.9	Q3EAI3	Arabidopsis thaliana	72374	5.8						
349	GDSL-motif lipase/hydrolase-like protein (AT5g45670/MRA19_6)	JGI	827727	2	10.8	Q9FK75	Arabidopsis thaliana	39576	6.0	26921	5.8	-0.74	0.046	-	ns
	Uncharacterized protein At3g23600.2	JGI	820918	3	10.4	Q2V3T4	Arabidopsis thaliana	25563	5.1						
	Triosephosphate isomerase, cytosolic	JGI	656103	6	30.3	P48491	Arabidopsis thaliana	27169	5.4						
384	Probable fructokinase-4 (EC=2.7.1.4)	JGI	741475	3	11.6	Q9M1B9	Arabidopsis thaliana	35044	5.2	39479	5.2	-0.76	0.037	-	ns
		JGI	562225	7	27.7										
	Phosphoglycerate kinase (EC=2.7.2.3)	JGI	833719	4	12.5	O82160	Populus nigra	50298	8.5						
		JGI	832630	3	9.4										
	Putative uncharacterized protein	JGI	649024	2	8.5	Q9FG13	Arabidopsis thaliana	36597	5.4						
684	Beta-primeverosidase (EC=3.2.1.149)	PpLGI	TC50417	5	24.1	Q7X9A9	Camellia sinensis	57041	9.0	26110	5.69	-	ns	0.76	0.037
	Chlorophyll a-b binding protein 8, chloroplastic	JGI	664934	2	14.6	P27522	Solanum lycopersicum	29363	9.0						
	Putative uncharacterized protein At3g52150	JGI	202723	3	14.9	Q8VYM4	Arabidopsis thaliana	27748	8.9						
236	Leucine aminopeptidase 1 (EC=3.4.11.1)	JGI	262677	7	16.7	P30184	Arabidopsis thaliana	54509	5.7	55149	5.94	-	ns	-0.76	0.037
	Prolyl carboxypeptidase like protein	JGI	828859	2	4.5	Q683F9	Arabidopsis thaliana	53712	6.2						
	GDP dissociation inhibitor	JGI	828557	3	8.3	O65744	Cicer arietinum	49647	5.6						
222	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase (EC=5.4.2.1)	JGI	739764	7	17.7	P35493	Ricinus communis	60818	5.5	66064	5.68	-	ns	-0.81	0.022
	Phosphoglucomutase, cytoplasmic (EC=5.4.2.2)	JGI	832763	5	12.2	Q9ZSQ4	Populus tremula	63124	5.5						
332	Ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme, chloroplast precursor (EC=1.4.7.1)	JGI	817211	3	12.1	P10933	Pisum sativum	40194	8.6	64211	6.54	-	ns	-0.76	0.037
	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic	JGI	813989	2	8.1	Q40459	Nicotiana tabacum	35228	5.9						

^a Excised spot number (spot no.), refers to the spot number labelled in Figure 2.

^b PpLGI: hit on *Populus* Gene Index v3.0 database from the DFCI's Gene Indices, JGI: hit on the *Populus trichocarpa* v1.1 database from the Joint Genome Institute (Dbase).

^c Tentative consensus (TC) or protein identifier (protein id) given in the DFCI and the JGI databases, respectively.

^d Number of matching peptides (# pep.).

^e Ratio of the amino acids in detected peptides to total protein amino acids: coverage (Cover., %).

^f Accession number (accession no.) of the corresponding protein in the Uniprot database.

^g Theoretical molecular mass (M_r) and isoelectric point (pI) computed by the ExPASy website.

^h Spearman rank coefficient (r_s) with their associated p-value computed between protein abundance and Δ value from plants grown under well-watered (WW) and water deficit (WD) condition. Any negative r_s is indicated in bold.

Conclusions et Perspectives

Conclusions et perspectives

S'inscrivant dans la continuité des études menées au sein du Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures, ce travail était centré sur le caractère « efficacité d'utilisation de l'eau », abordé à l'interface entre écophysiologie et protéomique. Il visait à apporter des éléments de réponse à deux objectifs majeurs : le premier s'intéressait aux variations génétiques de l'efficacité d'utilisation de l'eau chez des peupliers cultivés en peupleraie. Le second, consistait à initier une approche protéomique des variations génétiques de l'efficacité d'utilisation de l'eau.

1. Variation génétique de la discrimination isotopique vis-à-vis du ^{13}C chez les peupliers

Des études antérieures menées au sein du laboratoire ont montré l'existence de fortes variations génétiques de l'efficacité d'utilisation de l'eau (estimée *via* Δ), chez de jeunes boutures de peuplier âgées de quatre mois cultivées en serre (Marron *et al.*, 2005) ainsi que chez des plançons de quatre ans cultivés en pépinière (Monclus *et al.*, 2005 et 2006). De façon à évaluer l'intérêt de développer un programme de sélection sur l'efficacité d'utilisation de l'eau chez le peuplier, il convenait à présent d'aborder la variation génétique de Δ chez des arbres plus âgés, cultivés en peupleraie commerciale. Il s'agissait également de juger de l'impact de deux types de sol, contrastés par leur fertilité et leur disponibilité en eau du sol, sur le classement pour Δ de génotypes de peuplier.

Dans ce cadre, nous avons mené une étude à partir de 14 génotypes de peuplier (10 *P. ×euramericana* et 4 *P. ×interamericana*) âgés de 5 à 14 ans, cultivés au sein de la peupleraie du Moulin de Bariteau (Poitou-Charentes). Deux types de sol cultivés ont été distingués. Le premier, appelé site alluvial, correspondait à un milieu optimal pour la populiculture. Localisé sur les rives du ruisseau 'Le Chavenay' traversant la

plantation, ce site se caractérisait par une forte disponibilité en eau du sol liée à l’affleurement superficiel de la nappe phréatique et par une fertilité importante relative à la nature alluviale du sol. Le second type de sol, appelé site non alluvial, se caractérisait par une disponibilité en eau du sol et une fertilité moindre ; ce site se localisait sur les coteaux adjacents au cours d’eau.

Quel que soit le site étudié, ces travaux ont permis de valider l’existence d’importantes variations génétiques de Δ et du niveau de productivité chez *P. ×euramericana* et *P. ×interamericana*. Nous avons pu mettre en évidence une corrélation positive entre Δ mesurée à partir de la matière organique des feuilles (Δ_l) et Δ mesurée à partir de la sève élaborée (Δ_s). Au niveau foliaire, Δ est un estimateur indirect de l’efficacité intrinsèque d’utilisation de l’eau à l’échelle de la vie d’une feuille alors qu’au niveau de la sève élaborée, Δ intègre l’ensemble du houppier (Farquhar et Richards, 1984 ; Cernusak *et al.*, 2003 ; Gessler *et al.*, 2001). En peupleraie, la majorité du feuillage étant soumis à un effet d’ombrage des cimes, une mesure de Δ à partir de feuilles d’ombre peut donc s’avérer être une appréciation prédictive de la signature isotopique de l’ensemble du houppier. Par ailleurs, aucun lien évident n’a pu être établi entre niveau de productivité et Δ_l ou Δ_s . Ce résultat également constaté lors des expériences menées en serre et en pépinière (Marron *et al.*, 2005 ; Monclus *et al.*, 2005 et 2006) est donc confirmé à partir de peupliers plus âgés et cultivés en peupleraie dans des conditions de croissance très différentes. Compte tenu que Δ constitue un estimateur fiable de l’efficacité intrinsèque d’utilisation de l’eau chez les hybrides de peuplier (Monclus *et al.*, 2006), ces résultats permettent d’envisager la sélection de génotypes associant un niveau de productivité élevé à une efficacité d’utilisation de l’eau satisfaisante.

En comparaison avec le site alluvial, les arbres cultivés sur le site non alluvial présentaient logiquement des productivités, des SLA et des teneurs en azote des feuilles globalement plus faibles. Par ailleurs, le classement des génotypes pour Δ_l et Δ_s différait considérablement entre sites alluviaux et non alluviaux. Compte tenu que l’âge des arbres était comparable entre sites, ce résultat suggère un contrôle génétique important de la plasticité de Δ en réponse aux fluctuations de la fertilité et de la disponibilité en eau du sol. L’impact du type de sol sur Δ doit donc être mieux défini

afin de permettre aux populteurs d'ajuster la répartition des génotypes en fonction des caractéristiques du milieu.

L'étendue des variations génétiques observées pour Δ_1 chez *P. ×euramericana* (2,2 à 3‰, étendue des valeurs moyennes) était comparable à celle observée aux expérimentations menées en serre et en pépinière (Marron *et al.*, 2005 ; Monclus *et al.*, 2005 et 2006). Nous avons également noté que le classement génotypique pour Δ_1 établi en site alluvial était comparable à celui mesuré à partir de boutures de peuplier de trois mois cultivées en serre (Marron *et al.*, 2005). Ce résultat suggère la possibilité de sélectionner des génotypes pour leur efficacité d'utilisation de l'eau, de façon précoce à partir de plants cultivés en serre.

Compte tenu que nos expériences ont été abordées à partir d'arbres dont l'âge variait de 5 à 14 ans, il apparaît nécessaire de mieux définir l'effet de l'âge des plants sur les variations génétiques et les classements génotypiques pour Δ . Dans ce but, il serait nécessaire d'explorer la variabilité de Δ des feuilles ou de la sève élaborée à partir de plantations multi-clonales disposant d'individus strictement de même âge. Une étude des variations génétiques de Δ mesurée au niveau des cernes de croissance annuelle permettrait également de mieux établir le degré d'influence de ce facteur sur le classement des génotypes de peupliers. Ces perspectives sont actuellement développées en collaboration avec le centre INRA de Nancy et l'Institut pour le Développement Forestier (IDF).

2. Variation génétique du protéome foliaire de génotypes de peupliers euraméricains et relation avec la discrimination isotopique vis-à-vis du ^{13}C

Afin d'initier une approche exploratoire des mécanismes moléculaires qui pourraient contribuer à expliquer les variations génétiques de Δ observées chez les peupliers, notre démarche a été abordée au travers de deux objectifs principaux. Tout d'abord nous avons (i) jugé de l'existence de variations génétiques du protéome foliaire chez deux génotypes de peuplier *P. ×euramericana* contrastés pour leur Δ et (ii) évalué la stabilité de ces différences au cours du temps et entre conditions de culture

contrastées (deux dates de prélèvements et deux conditions de culture soient quatre points de comparaison). Ensuite, nous avons étendu l'expertise à huit génotypes de peupliers *P. ×euramericana* contrastés pour leur Δ (Monclus *et al.*, 2005) afin (i) d'évaluer le contrôle génétique de la plasticité moléculaire en réponse à la sécheresse et (ii) de juger des liens entre abondance des protéines foliaires et variations génétiques de Δ .

Les huit génotypes sélectionnés pour la présente étude étaient cultivés dans deux parcelles jumelles établies en pépinière depuis quatre ans; l'une était maintenue irriguée alors que la seconde était soumise à une sécheresse de 86 jours pendant la saison estivale. Par ailleurs, deux de ces génotypes (cv. 'Agathe_F' et 'Cima') contrastés pour Δ mais disposant d'une productivité comparable, ont également été cultivés en serre à partir de boutures enracinées depuis quatre mois. Dans ce cas, deux lots ont été constitués ; le premier a été continuellement irrigué alors que le second a été soumis à un déficit hydrique d'intensité comparable à la sécheresse survenue en pépinière (~0,3 MPa) mais d'une durée plus courte de 18 jours.

Nous avons montré que deux génotypes issus d'une formule hybride similaire (*P. deltoides* × *P. nigra* cv. 'Agathe_F' et 'Cima') présentaient d'importantes variations génétiques de leur protéome foliaire dans chacune des comparaisons (20 à 30% des spots reproductibles). Toutefois, tous les spots présentant des variations génétiques significatives n'étaient pas les mêmes entre comparaisons ; environ 4% des spots reproductibles distinguaient systématiquement les deux génotypes, soient 44 spots. Ces résultats suggèrent qu'une part de l'étendue des variations génétiques observées lors d'une comparaison donnée est également sous l'influence d'autres facteurs, tels que l'âge des plants, l'environnement de culture ou encore la date de prélèvement.

L'identification des spots protéiques par spectrométrie de masse a montré que près de 60% des 44 spots présentant des variations systématiques étaient assignés à neuf protéines différentes, *i.e.*, de nombreuses différences génotypiques reposaient sur des variations quantitatives de spots présentant la même annotation (Annexe 2). Nous avons montré que toutes les protéines identifiées, ayant un rôle dans le stress oxydatif, présentaient systématiquement les plus fortes abondances chez le génotype 'Cima'. En réponse aux déficits hydriques menés en serre et en pépinière, les deux génotypes se

distinguaient également par la plasticité de leurs protéomes foliaires. ‘Cima’ se distinguait principalement par une augmentation des quantités de protéines impliquées dans la photorespiration et dans le stress oxydatif, alors que ‘Agathe_F’ se distinguait par de plus importantes accumulations d’enzymes impliquées dans la photosynthèse.

À notre connaissance, aucune étude ne s’est intéressée à la variabilité génétique des protéomes foliaires chez le peuplier. Si à ce stade ces résultats ne permettent pas d’émettre d’hypothèses en lien avec les variations génétiques d’efficacité d’utilisation de l’eau des deux génotypes, ils confirment néanmoins la possibilité de cataloguer des génotypes de peupliers à partir de leurs profils protéiques foliaires. Ils valident également la possibilité d’aborder les relations entre efficacité d’utilisation de l’eau et abondances des protéines foliaires par électrophorèse bidimensionnelle chez différents génotypes de peuplier.

D’importantes différences ont été observées entre les changements induits par un arrêt d’arrosage simulé pendant 18 jours en serre et par une sécheresse d’intensité comparable menée en pépinière sur une période de 86 jours. Cette distinction peut être expliquée par les différences de durée de contrainte et/ou de conditions de culture. En effet, en pépinière les plants ont été soumis à un déficit hydrique plus progressif induisant probablement des réponses moléculaires différentes de celles survenues lors d’un stress simulé en pots. Lors d’une contrainte progressive et durable, la plante met en place un nouvel équilibre homéostatique lui permettant de maintenir son fonctionnement (DaMatta, 2003). Ainsi, en analysant le protéome après 86 jours d’arrêt d’arrosage, nous avons eu accès aux produits des gènes résultants potentiellement des réponses d’acclimatation de la plante. Dans ce cadre, nous avons montré que les huit génotypes de peupliers présentaient une plasticité substantielle dans leur réponse à la sécheresse. Cette plasticité phénotypique s’observait tant au niveau des traits foliaires (*e.g.*, modifications de l’épaisseur et/ou de la densité des feuilles, de la discrimination isotopique vis-à-vis du ^{13}C) qu’à des échelles moléculaires (modification des protéomes foliaires). À l’échelle protéique, nous avons observé un contrôle génétique de cette plasticité pour 81 spots, soit près de 10% de l’ensemble des spots reproductibles. L’identification de ces spots par spectrométrie de masse a permis d’établir une liste de 62 protéines parmi lesquelles près de 65% étaient impliquées dans les fonctions relatives aux processus photosynthétiques. Les génotypes se distinguaient par une

régulation différentielle de 31 enzymes impliquées dans le cycle de Calvin et de six protéines participant à la chaîne de transport d'électrons des thylakoïdes. Des génotypes se distinguant par leur Δ , diffèrent donc aussi dans leur réponse à la sécheresse particulièrement par des protéines modulant la fixation du CO_2 . Par ailleurs, nous avons également observé de telles régulations dépendantes du génotype pour d'autres protéines impliquées dans la photorespiration et dans le maintien de l'homéostasie cellulaire (*e.g.*, chaperonnes, protéines impliquées dans la réponse au stress oxydatif). L'ensemble de ces régulations différentielles pourrait contribuer à un avantage adaptatif conféré par les différences d'efficacité d'utilisation de l'eau.

Nous avons également noté qu'il existait des liens entre abondance des protéines foliaires et variations génétiques de Δ . Des corrélations significatives entre abondance de protéines et Δ ont été observées pour 61 spots protéiques indépendamment du régime hydrique. Δ est un estimateur négativement corrélé à l'efficacité intrinsèque d'utilisation de l'eau (Farquhar et Richards, 1984 ; Farquhar *et al.*, 1989 ; Ponton *et al.*, 2002 ; Monclus *et al.*, 2006). Par conséquent, une faible valeur de Δ peut dépendre d'une augmentation de A et/ou d'une diminution de g_s ; où A est l'assimilation nette de CO_2 (la résultante de la photosynthèse brute déduit du taux de photorespiration et de respiration cellulaire), alors que g_s est contrôlée par le degré d'ouverture des stomates.

L'identification de ces 61 spots par spectrométrie de masse a permis d'établir une liste de 45 protéines parmi lesquels près de 30% correspondaient à des enzymes intervenant directement ou indirectement dans les processus liés à la photosynthèse. De façon intéressante, des isoformes de *RuBisCO activase* étaient corrélées négativement avec Δ indépendamment du régime hydrique, suggérant qu'une forte W_i pourrait être influencée par de plus importantes abondances de *RuBisCO activase*. En condition hydrique non limitante, nous avons également constaté que l'abondance de protéines impliquées dans la photorespiration et dans la respiration cellulaire était corrélée positivement avec Δ , donc probablement négativement avec W_i . Par ailleurs, nous avons observé, que l'abondance d'une protéine pouvant intervenir dans l'augmentation de g_s était plus importante chez les génotypes présentant un fort Δ . En condition hydrique non limitante, les génotypes présentant de faible Δ se caractérisaient par des quantités plus importantes de protéines impliquées dans la limitation des dommages cellulaires qui pourraient être occasionnés par une augmentation de la température des surfaces foliaires engendrée par de plus faibles g_s . Cette approche exploratoire des

variations génétiques de l'efficacité d'utilisation de l'eau estimée *via* l'outil isotopique Δ a montré des résultats prometteurs nous encourageant à approfondir les investigations du déterminisme moléculaire de ce caractère.

En continuité de ce travail, la caractérisation du déterminisme génétique de l'efficacité d'utilisation de l'eau chez le peuplier pourrait être abordée par la recherche de QTLs associés à Δ . Des études menées actuellement au sein de notre équipe et en collaboration avec les centres INRA d'Orléans et de Nancy, et l'université d'Anvers, visent à déterminer des QTLs associés à Δ chez des familles de peupliers *P. ×interamericana* et *P. ×euramericana*. Dans le champ de la génétique, les approches protéomiques permettent également de rechercher des QTLs appliqués aux quantités relatives de protéines révélées sur les gels d'électrophorèse bidimensionnelle, appelés PQLs (Protein quantity loci) (Damerval *et al.*, 1994 ; de Vienne *et al.*, 1996 et 1999 ; Consoli *et al.*, 2002). Ainsi, la co-localisation sur une carte génétique de PQLs et de QTLs associés à Δ pourrait permettre d'affiner la caractérisation du déterminisme génétique de l'efficacité d'utilisation de l'eau.

Par ailleurs, les résultats protéomiques acquis au cours de cette thèse renvoient une image globale de la régulation des protéines de l'ensemble des tissus constituant l'organe foliaire. Les feuilles sont des organes complexes, dont la diversité des tissus ne permet pas de distinguer le rôle respectif des acteurs moléculaires d'une cellule ou d'un organe donné. C'est pourquoi, une étude de l'efficacité d'utilisation de l'eau à l'échelle cellulaire ou subcellulaire pourrait permettre de distinguer les mécanismes catégoriels participant aux variations génétiques de Δ . Les méthodes de microdissection offrent à présent une avancée technologique pour le prélèvement d'échantillons à l'échelle de la cellule (Day *et al.*, 2005 ; Goué *et al.*, 2008). Si les limites majeures de la LCM reposent sur la quantité de matériel isolé qu'elle peut produire, plusieurs études récentes rapportent le succès de son association avec les approches protéomiques (Craven *et al.*, 2002 ; Mustafa *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2008 ; Liu *et al.*, 2009). Il pourrait donc être intéressant d'aborder notre problématique à partir du protéome de stomates de feuilles. Cette perspective pourrait être envisagée en développant une collaboration avec l'équipe de Bioclimatologie et Ecophysiologie (responsable : D. Le Thiec) de l'UMR INRA/UHP-Nancy1 'Ecologie et Ecophysiologie Forestières' qui utilise la microdissection de ce type cellulaire, notamment pour des approches

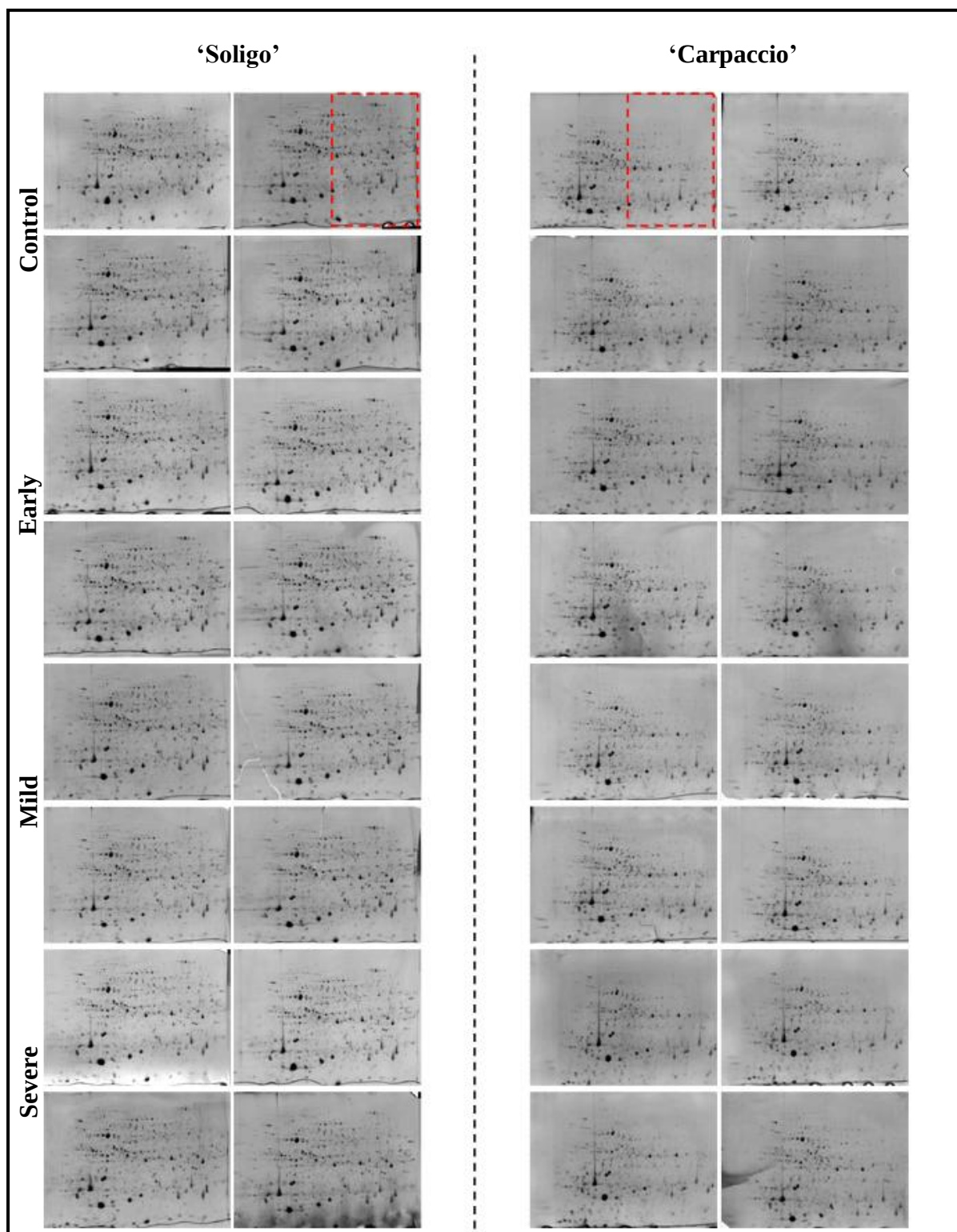


Figure P1. Variation génétique des protéomes foliaires des génotypes 'Soligo' et 'Carpaccio' étudiés dans le cadre du projet « *Molecular basis of acclimation and adaptation to drought in poplar*, Projet Popsec - GPLA06028G ». Control, early, mild et severe représentent les différentes modalités de traitements.

transcriptomiques s'intéressant aux mécanismes de tolérance à la sécheresse des arbres. A l'échelle subcellulaire, compte tenu que nos résultats ont démontré que le contrôle génétique de la plasticité moléculaire en réponse à la sécheresse concernait principalement des protéines chloroplastiques, il serait également intéressant d'envisager une étude du protéome à partir de chloroplastes isolés.

Dans le cadre d'une approche ciblée, les aquaporines sont des protéines membranaires impliquées dans la diffusion facilitée et sélective de petites molécules comme l'eau au travers de la membrane plasmique ou du tonoplaste, et participent également au transport du CO₂ (Uehlein *et al.*, 2003 ; Hanba *et al.*, 2004 ; Cochard *et al.*, 2007 ; Maurel, 2007). Il serait intéressant de juger des relations existantes entre aquaporines et efficience d'utilisation de l'eau. Cette approche est actuellement initiée au sein de notre laboratoire en collaboration avec les centres INRA de Clermont-Ferrand et d'Orléans, dans le cadre d'un projet qui vise à juger des variations génétiques d'aquaporines positionnées sur des QTLs associés à Δ chez le peuplier.

Enfin, dans le cadre de mon recrutement actuel sur un poste d'ATER au sein du département de Biologie de l'université d'Orléans pour la période 2008-2009, mon travail de recherche consiste à évaluer les variations génétiques du protéome foliaire et du bois de génotypes de peupliers contrastés pour leur niveau de tolérance à la sécheresse. Ce travail constitue une approche complémentaire de la problématique de cette thèse compte tenu de l'orthogonalité observée entre efficience d'utilisation de l'eau et tolérance à la sécheresse chez les peupliers (Monclus *et al.*, 2006). Cette investigation s'intègre à un programme ANR-Génoplane (*Molecular basis of acclimation and adaptation to drought in poplar*, Projet Popsec - GPLA06028G), nous associant à l'INRA de Bordeaux, de Nancy et d'Orléans, pour la période 2007-2009. Ce projet a pour but d'identifier des gènes candidats pour l'acclimatation et/ou l'adaptation au déficit hydrique chez le peuplier. Dans ce cadre des approches transcriptomique et protéomique sont menées à différents stades et intensités de stress et simultanément dans différents tissus de la plante : l'apex racinaire en croissance, le bois, la feuille entière et le stomate. Au niveau foliaire, les premiers résultats montrent, en dehors de tout effet sécheresse, une très forte spécificité génotypique des profils protéiques foliaires (Figure P1). L'identification de protéines foliaires et du bois, dont l'abondance varie sous l'effet du déficit nous permettra (i) de juger des effets du déficit hydrique à court et à long termes, (ii) de distinguer les effets relatifs à l'intensité de la contrainte et

(iii) d'évaluer le degré de variation génétique de la plasticité moléculaire de géotypes de peupliers contrastés pour leur niveau de tolérance au déficit hydrique.

Bibliographie

Bibliographie

~

- Aarts M.M., Keijzer C.J., Stiekema J. et Pereira A., 1995.** Molecular characterization of the CER1 gene of *Arabidopsis* involved in epicuticular wax biosynthesis and pollen fertility. *Plant Cell*. 7, 2115-2127.
- Abebe T., Guenzi A.C., Martin B. et Cushman J.C., 2003.** Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiol*. 131, 1748-1755.
- Agrawal G.K., Yonekura M., Iwahashi Y., Iwahashi H. et Rakwal R., 2005a.** System, trends and perspectives of proteomics in dicot plants Part II: Proteomes of the complex developmental stages. *J. Chromatogr. B*. 815, 125-136.
- Agrawal G.K., Yonekura M., Iwahashi Y., Iwahashi H. et Rakwal R., 2005b.** System, trends and perspectives of proteomics in dicot plants Part III: Unraveling the proteomes influenced by the environment, and at the levels of function and genetic relationships. *J. Chromatogr. B*. 815, 137-145.
- Aharoni A., Dixit S., Jetter R., Thoenes E., van Arkel G. et Pereira A., 2004.** The SHINE clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 16, 2463-2480.
- Ali G.M. et Komatsu S., 2006.** Proteomic analysis of rice leaf sheath during drought stress. *J. Proteome Res*. 5, 396-403.
- Araus J.L., Slafer G.A., Reynolds M.P. et Royco C., 2002.** Plant breeding and drought in C₃ cereals: what should we breed for? *Ann. Bot*. 89, 925-940.
- Ashok R.S., Aftab Hussain I.S., Prasad T.G., Udayakumar M., Nageswararao R.C. et Wright G.C., 1999.** Variations in transpiration efficiency and carbon isotope discrimination in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) genotypes. *Aust. J. Plant Physiol*. 26, 503-510.

- Bacon M.A., 2004.** Water Use Efficiency of Plants. Ed Bacon M.A., Blackwell. Oxford, UK.
- Balzinger M. et Ginisty C., 2002.** Compte rendu de la commission Nationale du Peuplier. 11 juin. 13p.
- Belrose V., Nageleisen L.M. et Renaud J.P., 2004.** Les conséquences de la canicule et de la sécheresse sur la santé des forêts : bilan à la fin de l'année 2003. Bilan du Département de la santé des forêts, décembre, 16p.
- Benetka V., Mottl J., Vackova K., Popsikova M. et Dubsky M., 1999.** Estimation of the introgression level in *Populus nigra* L. populations by means of isozyme gene markers. *Silvae Genet.* 48, 218-223.
- Berthelot A. et Chantre G., 2004.** La peupleraie française : un maillon essentiel de la filière bois. *Biofutur.* 247, 20-23.
- Bhatnagar-Mathur P., Jyostna Devi M., Srinivas Reddy D., Lavanya M., Vadez V., Serraj R., Yamaguchi-Shinozaki K. et Sharma K.K., 2007.** Stress-inducible expression of At DREB1A in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) increases transpiration efficiency under water-limiting conditions. *Plant Cell Rep.* 26, 2071-2082.
- Blake T.J., Sperry J.S. et Tschaplinski T.J., 1996.** Water relations. Eds Stettler R.F., Bradshaw H.D.J., Heilman P.E. et Hinckley T.M., *Biology of Populus and its implications for management and conservation*, pp. 401-422. NRC Research Press, National Research Council of Canada, Ottawa, ON, USA.
- Bogeat-Triboulot M.B., Brosche M., Renaut J., Jouve L., Le Thiec D., Fayyaz P., Vinocur B., Witters E., Laukens K., Teichmann T., Altman A., Hausman J.F., Polle A., Kangasjarvi J. et Dreyer E., 2007.** Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in arid regions. *Plant Physiol.* 143, 876-892.
- Bohler S., Bagard M., Oufir M., Planchon S., Hoffmann L., Jolivet Y., Hausman J.F., Dizengremel P. et Renaut J., 2007.** A DIGE analysis of developing poplar leaves subjected to ozone reveals major changes in carbon metabolism. *Proteomics.* 7, 1584-1599.

- Bouchabke O., Tardieu F. et Simonneau T., 2006.** Leaf growth and turgor in growing cells of maize (*Zea mays* L.) respond to evaporative demand in well-watered but not in water saturated soil. *Plant Cell Environ.* 29, 1138-1148.
- Bouchabke-Coussa O., Quashie M.L., Seoane-Redondo J., Fortabat M.N., Gery C., Yu A., Linderme D., Trouverie J., Granier F., Téoulé E. et Durand-Tardif M., 2008.** ESKIMO1 is a key gene involved in water economy as well as cold acclimation and salt tolerance. *BMC Plant Biol.* *In press*.
- Braatne I.H., Hinckley T.M. et Stettler R.F., 1992.** Influence of soil water on the physiological and morphological components of plant water balance in *Populus trichocarpa*, *Populus deltoides* and their F1 hybrids. *Tree Physiol.* 11, 325-339.
- Brendel O., Pot D., Plomion C., Rozenberg P. et Guehl J.M., 2002.** Genetic parameters and QTL analysis of delta ¹³C and ring width in maritime pine. *Plant Cell Environ.* 25, 945-953.
- Brendel O., Le Thiec D., Scotti-Saintagne C., Bodénès C., Kremer A. et Guehl J.M., 2008.** Quantitative trait loci controlling water use efficiency and related traits in *Quercus robur* L. *Tree Genet. Genomes.* 4, 263-278.
- Breton V., 2000.** Évolution de la populiculture - période 1996-1999. Rapport national de la France. Commission Internationale du Peuplier (FAO) XIX^{ème} session, Portland, Oregon, USA.
- Brignolas F., Thierry C., Guerrier G. et Boudouresque E., 2000.** Compared water deficit response of two *Populus ×euramericana* clones, Luisa Avanzo and Dorskamp. *Ann. For. Sci.* 57, 261-266.
- Britton N.L. et Brown A., 1913.** Illustrated flora of the northern states and Canada. The PLANTS Database (<http://plants.usda.gov>). National Plant Data Center, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA.
- Broun P., Poindexter P., Osborne E., Jiang C.Z. et Riechmann J.L., 2004.** WIN1, a transcriptional activator of epidermal wax accumulation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 4706-4711.
- Brown G.R., Gill G.P., Kuntz R.J., Langley C.H. et Neale D.B., 2004.** Nucleotide variation and linkage disequilibrium in loblolly pine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 15255-15260.

- Cánovas F.M., Dumas-Gaudot E., Recorbet G., Jorrín J., Mock H.P. et Rossignol M., 2004.** Plant proteome analysis. *Proteomics*. 4, 285-298.
- Cao H.X., Zhang Z.B., Xu P., Chu L.Y., Shao H.B., Lu Z.H. et Liu J.H., 2007.** Mutual physiological genetic mechanism of plant high water use efficiency and nutrition use efficiency. *Colloid Surface B*. 57, 1-7.
- Carvajal M., Cooke D.T. et Clarkson D.T., 1996.** Responses of wheat plants to nutrient deprivation may involve the regulation of water-channel function. *Planta*. 199, 372-381.
- Casasoli M., Pot D., Plomion C., Monteverdi M.C., Barreneche T., Lauteri M. et Villani F., 2004.** Identification of QTLs affecting adaptive traits in *Castanea sativa* Mill. *Plant Cell Environ*. 27, 1088-1101.
- Casasoli M., Derory J., Morera-Dutrey C., Brendel O., Porth I., Guehl J.-M., Villani F. et Kremer A., 2006.** Comparison of quantitative trait loci for adaptive traits between oak and chestnut based on an expressed sequence tag consensus map. *Genetics*. 172, 533-546.
- Cernusak L.A., Arthur D.J., Pate J.S. et Farquhar G.D., 2003.** Water relations link carbon and oxygen isotope discrimination to phloem sap sugar concentration in *Eucalyptus globulus*. *Plant Physiol*. 131, 1544-1554.
- Chang S., Puryear J.D., Dias M.A.D.L., Funkhouser E.A., Newton R.J., et Cairney J., 1996.** Gene expression under water deficit in loblolly pine (*Pinus taeda*): isolation and characterization of cDNA clones. *Physiol. Plant*. 97, 139-148.
- Chaves M.M., Maroco J.P. et Pereira J.S., 2003.** Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Funct. Plant Biol*. 30, 239-264.
- Chen S., Wang S., Altman A. et Hüttermann A., 1997.** Genotypic variation in drought tolerance of poplar in relation to abscisic acid. *Tree Physiol*. 17, 797-803.
- Christians J.K., et Keightley P.D., 2002.** Genetic architecture: Dissecting the genetic basis of phenotypic variation. *Curr. Biol*. 12, 415-416.

- Cochard H., Venisse J.S., Barigah T.S., Brunel N., Herbette S., Guilliot A., Tyree M.T. et Sakr S., 2007.** Putative role of aquaporins in variable hydraulic conductance of leaves in response to light. *Plant Physiol.* 143, 122-133.
- Collinson M.E., 1992.** The early fossil record of the Saliceae. *Proc. Royal Soc. Edimburgh* 98, 155-167.
- Condon A.G., Farquhar G.D. et Richard R.A., 1990.** Genotypic variation in carbon isotope discrimination and transpiration efficiency in wheat. Leaf gas exchange and whole plant studies. *Austr. J. Plant Physiol.* 17, 9-22.
- Condon A.G., Richard R., Rebetzke G. et Farquhar G. 2002.** Improving intrinsic water-use efficiency and crop yield. *Crop Sci.* 42, 122-131.
- Consoli L., Lefèvre A., Zivy M., de Vienne D. et Damerval C., 2002.** QTL analysis of proteome and transcriptome variations for dissecting the genetic architecture of complex traits in maize. *Plant Mol. Biol.* 48, 575-581.
- Cosgrove D.J., 2005.** Growth of the cell wall. *Nature Reviews. Mol. Cell Biol.* 6, 850-861.
- Costa P., Bahrman N., Frigerio J.M., Kremer A. et Plomion C., 1998.** Water-deficit responsive proteins in maritime pine. *Plant Mol. Biol.* 38, 587-596.
- Craig H., 1957.** Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochim. Cosmochim. Ac.* 12, 133-149.
- Craven R.A., Totty N., Harnden P., Selby P.J. et Banks R.E., 2002.** Laser capture microdissection and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: evaluation of tissue preparation and sample limitations, *Am. J. Pathol.* 160, 815-822.
- DaMatta F.M., 2003.** Drought as a multidimensional stress affecting photosynthesis in tropical tree crops. Ed Hemantaranjan A., *Advances in Plant Physiology*, vol. 5, pp.227-265. Scientific Publishers, Jodhpur.
- Damerval C., Maurice A., Josse J.M. et de Vienne D., 1994.** Quantitative trait loci underlying gene product variation - a novel perspective for analyzing regulation of genome expression. *Genetics.* 137, 289-301.

- Dawson T.E., Mambelli S., Plamboeck A.H., Templer P.H. et Kevin P.T., 2002.** Stable isotopes in plant ecology. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 33, 507-559.
- Day R.C., Grossniklaus U. et Macknight R.C., 2005.** Be more specific! Laser-assisted microdissection of plant cells, *Trends Plant Sci.* 10, 397-406.
- de Vienne D., Burstin J., Gerber S., Leonardi A., Le Guilloux M., Murigneux A., Beckert M., Bahrman N., Damerval C. et Zivy M., 1996.** Two-dimensional electrophoresis of proteins as a source of monogenetic and codominant markers for population genetics and mapping the expressed genome. *Heredity.* 76, 166-177.
- de Vienne D., Leonardi A., Damerval C. et Zivy M., 1999.** Genetics of proteome variation for QTL characterization: application to drought-stress responses in maize. *J. Exp. Bot.* 50, 303-309.
- Dickmann D.I. et Kuzovkina J., 2008.** Poplars and willow of the world, with emphasis on silviculturally important species (Chapter 2) In *Poplars and Willows in the World: meeting the needs of society and the environment*. Eds. J.G. Isebrands and J. Richardson, 135 p., FAO/IPC (Food and Agricultural Organization of the United States / International Poplar Commission). Rome, Italy.
- Dillen S.Y., Marron N., Koch B. et 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'). *Ann. Bot.* 102, 399-407.
- Dreyer E., Bogeat-Triboulot M.B., Le Thiec D., Guehl J.M., Brignolas F., Villar M., Bastien C., Martin F. et Kolher A., 2004.** Tolérance des peupliers à la sécheresse : peut-on espérer l'améliorer ? *Biofutur.* 247, 54-58.
- Du J., Xie H.L., Zhang D.Q., He X.Q., Wang M.J., Li Y.Z., Cui K.M. et Lu M.Z., 2006.** Regeneration of the secondary vascular system in poplar as a novel system to investigate gene expression by a proteomic approach. *Proteomics.* 6, 881-895.
- Echevarría-Zomeño S., Ariza D., Jorge I., Lenz C., Del Campo A., Jorrín J.V. et Navarro R.M., 2008.** Changes in the protein profile of *Quercus ilex* leaves in response to drought stress and recovery. *J. Plant Physiol.* *in press*.

- Eckenwalder J.E., 1980.** Foliar heteromorphism in *Populus* (Salicaceae), a source of confusion in the taxonomy of Tertiary leaf remains. *Syst. Bot.* 5, 366-383.
- Eckenwalder J.E., 1996.** Systematics and evolution of *Populus*. Eds Stettler R.F., Bradshaw, Jr. H.D., Heilman P.E. et Hinkley T.M., *Biology of Populus and Its Implications for Management and Conservation*, pp. 7-32, Ottawa, Canada: NRC Research Press.
- Ehdaie B. et Waines J.G., 1993.** Variation in water-use efficiency and its components in wheat. I. Well-watered pot experiment. *Crop Sci.* 33, 294-299.
- Ehleringer J.R., 1993.** Carbon and water relations in desert plants : an isotopic perspective. Eds Ehleringer J.R., Hall A.E. et Farquhar G.D., *Stable Isotopes and Plant Carbon-water relations*, pp. 155-172, Academic Press. San diego, U.S.A.
- Eichelmann H. et Laisk A., 1999.** Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase content, assimilatory charge and mesophyll conductance in leaves. *Plant Physiol.* 119, 179-189.
- Einspahr D.W., van Buijtenen J.P. et Peckham J.R., 1963.** Natural variation and heritability in triploid aspen. *Silvae Genet.* 12, 51-58.
- Every A.D. et Wiens D., 1971.** Triploidy in Utah aspens. *Madroño.* 21, 138-147.
- FAO, 2008.** Les peupliers, les saules et le bien-être des populations. Synthèse des rapports d'activité nationaux. 23^{ème} session de la Commission internationale du Peuplier. 83p.
- Farquhar G.D., O'Leary H.M. et Berry J.A., 1982.** On the relationship between carbon isotope discrimination and intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Aust. J. Plant. Physiol.* 9, 121-137.
- Farquhar G.D. et Richards R.A., 1984.** Isotopic composition of plant carbon correlates with water-use efficiency of wheat genotypes. *Austr. J. Plant Physiol.* 40, 503-552.
- Farquhar G.D., Ehleringer J.R. et Hubick K.T., 1989.** Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40, 503-537.

- Fiebig A., Mayfield J.A., Miley N.L., Chau S., Fischer R.L. et Preuss D., 2000.** Alterations in CER6, a gene identical to CUT1, differentially affect long- chain lipid content on the surface of pollen and stems. *Plant Cell*. 12, 2001-2008.
- Fischer R.A., Rees D., Sayre K.D., Lu Z.M., Condon A.G. et Larque Saavedra A., 1998.** Wheat yield progress associated with higher stomatal conductance and photosynthetic rate and cooler canopies. *Crop Sci*. 38, 1467-1475.
- Flint J. et Mott R., 2001.** Finding the molecular basis of quantitative traits: successes and pitfalls. *Nat. Genet.* 2, 437-445.
- Garg A.K., Kim J.K., Owens T.G., Ranwala A.P., Choi Y.D., Kochian L.V. et Wu R.J., 2002.** Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 99, 15898-15903.
- Gebre G.M., Kuhns M.R. et Brandle J.R., 1994.** Organic solute accumulation and dehydration tolerance in three water-stressed *Populus deltoides* clones. *Tree Physiol*. 14, 575-587.
- Gessler A., Schrempp S., Matzarakis A., Mayer H., Rennenberg H. et Adams M.A., 2001.** Radiation modifies the effect of water availability on the carbon isotope composition of beech (*Fagus sylvatica*). *New Phytol*. 150, 653-664.
- Gygi S.P., Rochon Y., Franza B.R. et Aebersold R., 1999.** Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell. Biol*. 19, 1720-1730.
- González-Martínez S.C., Ersoz E., Brown G.R., Wheeler N.C. et Neale D.B., 2006.** DNA sequence variation and selection of tag SNPs at candidate genes for drought-stress response in *Pinus taeda* L.. *Genetics*. 172, 1915-1926.
- González-Martínez S.C., Huber D., Ersoz E., Davis J.M. et Neale D.B., 2008.** Association genetics in *Pinus taeda* L. II. Carbon isotope discrimination. *Heredity*. 101, 19-26.
- Goué N., Lesage-Descauses M.C., Mellerowicz E.J., Magel E., Label P. et Sundberg B., 2008.** Microgenomic analysis reveals cell type-specific gene expression patterns between ray and fusiform initials within the cambial meristem of *Populus*. *New phytol*. 180, 45-56.

- Granier C.H, Inzé D. et Tardieu F., 2000.** Spatial distribution cell division rate can be deduced from that of P34^{cdc2} kinase activity in maize leaves grown in contrasting conditions of temperature and water status. *Plant Physiol.* 124, 1393-1402.
- Guehl J.M., Nguyen-Queyrens A., Loustau D. et Ferhi A., 1995.** Genetic and environmental determinants of water use efficiency and carbon isotope discrimination in forest trees. Eds Sander-mann H. et Bonnet-Masimbert M., In *EURO-SILVA Contribution to Forest Tree Physiology* pp. 297-321, INRA, Paris, France.
- Gupta P.K., Rustgi S. et Kulwal P.L., 2005.** Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: present status and future prospects. *Plant Mol. Biol.* 57, 461-485.
- Hajheidari M., Abdollahian-Noghabi M., Askari H., Heidari M., Sadeghian S.Y., Ober E.S. et Salekdeh G.H., 2005.** Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. *Proteomics.* 5, 950-960.
- Hajheidari M., Eivazi A., Buchanan B.B., Wong J.H., Majidi I. et Salekdeh G.H., 2007.** Proteomics uncovers a role for redox in drought tolerance in wheat. *J. Proteome Res.* 6, 1451-1460.
- Hall E., Richards R.A., Condon A.G., Wright G.C. et Farquhar G.D., 1994.** Carbon isotope discrimination and plant breeding. *Plant Breed.* 12, 81-113.
- Hall N.M., Griffiths H., Corlett J.A., Jones H.G., Lynn J. et King G.J., 2005.** Relationships between water-use traits and photosynthesis in *Brassica oleracea* L. resolved by quantitative genetic analysis. *Plant Breed.* 124, 557-564.
- Hanba Y.T., Shibasaka M., Hayashi Y., Hayakawa T., Kasamo K., Terashima I. et Katsuhara M., 2004.** Overexpression of the barley aquaporin HvPIP2;1 increases internal CO₂ conductance and CO₂ assimilation in the leaves of transgenic rice plants. *Plant Cell Physiol.* 45, 521-529.
- Handley L.L., Nevo E., Raven J.A., Martinez-Carrasco R., Scrimgeour C.M., Pakniyat H. et Forster B.P., 1994.** Chromosome 4 controls potential water-use efficiency ($\delta^{13}\text{C}$) in barley. *J. Exp. Bot.* 45, 1661-1663.
- Hartung W., Sauter A. et Hose E., 2002.** Absciscic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? *J. Exp. Bot.* 53, 27-32.

- Hausler R.E., Hirsh H.J, Kreuzaler F. et Peterhansel C., 2002.** Overexpression of C4-cycle enzymes in transgenic C3 plants: a biotechnological approach to improve C3-photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 53, 591-607.
- Hayashi H., Alia, Mustardy L., Deshniem P., Ida M. et Murata N., 1997.** Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase: Accumulation of glycine betaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *Plant J.* 12, 133-142.
- He C., Zhang J., Duan A., Zheng S., Sun H. et Fu L., 2008.** Proteins responding to drought and high-temperature stress in *Populus x euramericana* cv. '74/76'. *Trees.* 22, 803-813.
- Hervé D., Fabre F., Berrios E.F., Leroux N., Al Chaarani G., Planchon C., Sarrafi A. et Gentzbittel L., 2001.** QTL analysis of photosynthesis and water status traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under greenhouse conditions. *J. Exp. Bot.* 52, 1857-1864.
- Hirschhorn J.N. et Daly M.J., 2005.** Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat. Rev. Genet.* 6, 95–108.
- Hubick K.T., Shorter R. et Farquhar G.D., 1988.** Heritability and genotype × environment interactions of carbon isotope discrimination and transpiration efficiency in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Austr. J. Plant Physiol.* 15, 799-813.
- Hubick K.T. et Farquhar G.D., 1989.** Carbon isotope discrimination and the ratio of carbon gained to water lost in barley cultivars. *Plant Cell Environ.* 12, 795-804.
- Hukin D., Cochard H., Dreyer E., Le Thiec D. et Bogeat-Triboulot M.B., 2005.** Cavitation vulnerability in roots and shoots: does *Populus euphratica* Oliv., a poplar from arid areas of Central Asia, differ from other poplar species? *J. Exp. Bot.* 56, 2003-2010.
- Ibrahim L., Proe M.F. et Cameron A.D., 1997.** Main effects of nitrogen supply and drought stress upon whole-plant carbon allocation in poplar. *Can. J. Forest Res.* 27, 1412-1419.
- Ismail A.M. et Hall A.E., 1993.** Inheritance of CID and WUE in cowpea. *Crop Sci.* 33, 498-503.

- Jeanneau M., Gerentes D., Foueillassar X., Zivy M., Vidal J., Toppan A. et Perez P., 2002a.** Improvement of drought tolerance in maize: towards the functional validation of the Zm-Asr1 gene and increase of water use efficiency by over-expressing C4PEPC. *Biochimie*. 84, 1127-1135.
- Jeanneau M., Vidal J., Gousset-Dupont A., Lebouteiller B., Hodges M., Gerentes D. et Perez P., 2002b.** Manipulating PEPC levels in plants. *J. Exp. Bot.* 53, 1837-1845.
- Johnsson H., 1942.** Cytological studies of triploid progenies of *Populus tremula*. *Hereditas* 28, 306-312.
- Jones H.G., 1992.** Drought and drought tolerance. Ed Jones H.G., *Plants and Microclimate: A Quantitative Approach to Environmental Plant Physiology* pp. 212-237, Cambridge University Press, UK.
- Jones H.G., 2004.** What is water use efficiency? Eds Bacon M.A. et Roberts J.A., *Water Use Efficiency in Plant Biology*, pp.27-41. Blackwell Publishing, CRC Press, Oxford, UK.
- Jorge I., Navarro R.M., Lenz C., Ariza D. et Jorrín J., 2006.** Variation in the holm oak leaf proteome at different plant developmental stages, between provenances and in response to drought stress. *Proteomics*. 6, 207-214.
- Jorrín J.V., Maldonado A.M. et Castillejo M.A., 2007.** Plant proteome analysis: a 2006 update. *Proteomics*. 7, 2947-2962.
- Juenger T.E., McKay J.K., Hausmann N., Keurentjes J.B., Sen S., Stowe K.A., Dawson T.E., Simms E.L. et Richards J.H., 2005.** Identification and characterization of QTL underlying whole-plant physiology in *Arabidopsis thaliana*: $\delta^{13}\text{C}$, stomatal conductance and transpiration efficiency. *Plant Cell Environ.* 28, 697-708.
- Karaba A., 2007.** Improvement of water use efficiency in rice and tomato using *Arabidopsis* wax biosynthetic genes and transcription factors. Thèse de Doctorat, 160 p., Wageningen University, The Netherlands.
- Karaba A., Dixit S., Greco R., Aharoni A., Trijatmiko K.R., Marsch-Martinez N., Krishnan A., Nataraja K.N., Udayakumar M. et Pereira A. 2007.** Improvement of water use efficiency in rice by expression of HARDY, an

- Arabidopsis* drought and salt tolerance gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 104, 15270-15275.
- Kieffer P., Dommes J., Hoffmann L., Hausman J.F. et Renaut J., 2008.** Quantitative changes in protein expression of cadmium-exposed poplar plants. Proteomics. 8, 2514-2530.
- Kieffer P., Planchon S., Oufir M., Ziebel J., Dommes J., Hoffmann L., Hausman J.F. et Renaut J., 2009.** Combining proteomics and metabolite analyses to unravel cadmium stress-response in poplar leaves. J. Proteome Res. 8, 400-417.
- Kirst M., Myburg A.A., de Leon J.P.G., Kirst M.E., Scott J. et Sederoff R., 2004.** Coordinated genetic regulation of growth and lignin revealed by quantitative trait locus analysis of cDNA microarray data in an interspecific backcross of eucalyptus. Plant Physiol. 135, 2368-2378.
- Kishor P.B.K., Hong Z., Miao G.H., Hu C.A.A. et Verma D.P.S., 1995.** Overexpression of Δ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. Plant Physiol. 108, 1387-1394.
- Klein M., Perfus-Barbeoch L., Frelet A., Gaedeke N., Reinhart D., Mueller-Roeber B., Martinoia E. et Forestier C., 2003.** The plant multidrug resistance ABC transporter AtMRP5 is involved in guard cell hormonal signalling and water use. Plant J. 33, 119-129.
- Klose J., 1975.** Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in animals. Humangenetik 26, 231-243.
- Ku M.S.B., Kano-Murakami Y. et Matsuoka M., 1996.** Evolution and expression of C4 photosynthesis genes. Plant Physiol. 111, 949-957.
- Ku M.S.B., Agarie S., Nomura M., Fukayama H., Tsuchida H., Ono K., Hirose S., Tki S., Miyao M. et Matsuoka M., 1999.** High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants. Nature Biotech. 17, 76-80.
- Laird N.M. et Lange C., 2006.** Family-based designs in the age of large-scale gene-association studies. Nat. Rev. Genet. 7, 385-394.

- Lal S., Gulyani V. et Khurana P., 2008.** Overexpression of *HVA1* gene from barley generates tolerance to salinity and water stress in transgenic mulberry (*Morus indica*). *Transgenic Res.* 17, 651-663.
- Laporte M.M., Shen B. et Tarczynski M.C., 2002.** Engineering for drought avoidance: expression of maize NAPD-malic enzyme in tobacco results in altered stomatal function. *J. Exp. Bot.* 53, 699-705.
- Lauteri M., Scartazza A., Guido M.C. et Brugnoli E., 1997.** Genetic variation in photosynthetic capacity, carbon isotope discrimination and mesophyll conductance in provenances of *Castanea sativa* adapted to different environments. *Funct. Ecol.* 11, 675-683.
- Lawlor D.W. et Cornic G., 2002.** Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ.* 25, 275-294.
- Lebreton C., Lazic-Jancic V., Steed A., Pekic S. et Quarrie S.A., 1995.** Identification of QTL for drought responses of maize and their use in testing causal relationships between traits. *J. Exp. Bot.* 46, 853-865.
- Leymarie J., Damerval C., Marcotte L., Combs V. et Vartanian N., 1996.** Two-dimensional protein patterns of *Arabidopsis* wild-type and auxin insensitive mutants, *axrl*, *axr2*, reveal interactions between drought and hormonal responses. *Plant Cell Physiol.* 37, 966-975.
- Liu Z. et Dickmann D.I., 1992.** Responses of two hybrid *Populus* clones to flooding, drought, and nitrogen availability. I. Growth and morphology. *Can. J. Bot.* 70, 2265-2270.
- Liu Y.F., Xiao Z.Q., Li M.X., Li M.Y., Zhang P.F., Li C., Li F., Chen Y.H., Yi H., Yao H.X. et Chen Z.C., 2009.** Quantitative proteome analysis reveals annexin A3 as a novel biomarker in lung adenocarcinoma. *J. Pathol.* 217, 54-64.
- Loustau D., Bosc A., Colin A., Ogée J., Davi H., François C., Dulreue E., Déqué M., Cloppet E., Arronays D., Le Bas C., Saby N., Pignard G., Hamza N., Granier A., Bréda N., Ciais P., Viovy N. et Delage F., 2005.** Modeling climate change effects on the potential production of French plains forests at the sub-regional level. *Tree Physiol.* 25, 813-823.

- Luan S., 2002.** Signalling drought in guard cells. *Plant Cell Environ.* 25, 229-237.
- Luu D.T. et Maurel C., 2005.** Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. *Plant Cell Environ.* 28, 85-96.
- Manchester S.R., Dilcher D.L. et Tidwell W.D., 1986.** Interconnected reproductive and vegetative remains of *Populus* (Salicaceae) from the middle Eocene Green River Formation, northeastern Utah. *Amer. J. Bot.* 73, 156-160.
- Marron N., Delay D., Petit J.M., Dreyer E., Kahlem G., Delmotte F.M. et Brignolas F., 2002.** Physiological traits of two *Populus x euramericana* clones, Luisa Avanzo and Dorskamp, during a water stress and re-watering cycle. *Tree Physiol.* 22, 849-858.
- Marron N., Dreyer E., Boudouresque E., Delay D., Petit J.M., Delmotte F.M. et Brignolas F., 2003.** Impact of successive drought and re-watering cycles on growth and specific leaf area of two *Populus x canadensis* (Moench) clones, 'Dorskamp' and 'Luisa_Avanzo'. *Tree Physiol.* 23, 1225-1235.
- Marron N., Villar M., Dreyer E., Delay D., Boudouresque E., Petit J.M., Delmotte F.M., Guehl J.M. et Brignolas F., 2005.** Diversity of leaf traits related to productivity in 31 *Populus deltoides* x *Populus nigra* clones. *Tree Physiol.* 25, 425-435.
- Marron N., Gielen B., Brignolas F., Jian G., Johnson J.D., Karnosky D.F., Polle A., Scarascia-Mugnozza G., Schroeder W.R. et Ceulemans R., 2008.** Abiotic stresses (Chapter 7). Eds. Isebrands J.G. et Richardson J., *Poplars and Willows in the World: meeting the needs of society and the environment*, FAO/IPC (Food and Agricultural Organization of the United States / International Poplar Commission). Rome, Italy.
- 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 pennellii*, and the F1 hybrid. *Plant Physiol.* 88, 213-217.
- Martin B., Nienhuis J., King G. et Schaefer A., 1989.** Restriction fragment length polymorphisms associated with water use efficiency in tomato. *Science.* 243, 1725-1728.

- Martre P., Morillon R., Barrieu F., North G.B., Nobel P.S. et Chrispeels M.J., 2002.** Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. *Plant Physiol.* 130, 1-10.
- Masle J., Gilmore S.R. et Farquhar G.D., 2005.** The ERECTA gene regulates plant transpiration efficiency in *Arabidopsis*. *Nature.* 436, 866-870.
- Matsuoka M., Furbank R.T., Fukayama H. et Miyao M., 2001.** Molecular Engineering of C4 photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 297-314.
- Maurel C. et Chrispeels M.J., 2001.** Aquaporins: a molecular entry into plant water relations. *Plant Physiol.* 125, 135-138.
- Maurel C., 2007.** Plant aquaporins: Novel functions and regulation properties. *FEBS Lett.* 581, 2227-2236.
- McKay J.K., Bishop J.G., Lin J.-Z., Sala A., Richards J.H. et Mitchell-Olds T., 2001.** Local adaptation across a climatic gradient despite small effective population size in the rare sapphire rockcress. *Proc. Royal Soc. London, Biol. Sci.* 268, 1715-1721.
- Mian M.A.R., Bailey M.A., Ashley D.A., Wells R., Carter T.J., Parrott W.A. et Boerma H.R., 1996.** Molecular markers associated with water use efficiency and leaf area in soybean. *Crop Sci.* 36, 1252-1257.
- Mian M.A.R., Ashley D.A. et Boerma H.R., 1998.** An additional QTL for water use efficiency in soybean. *Crop Sci.* 38, 390-393.
- Millar A.A., Clemens S., Zachgo S., Giblin E.M., Taylor D.C. et Kunst L., 1999.** CUT1, an *Arabidopsis* gene required for cuticular wax biosynthesis and pollen fertility, encodes a very-long-chain fatty acid condensing enzyme. *Plant Cell.* 11, 825-838.
- Miyao M., 2003.** Molecular evolution and genetic engineering of C4 photosynthetic enzymes. *J. Exp. Bot.* 54, 179-189.
- Miyazawa S.I., Yoshimura S., Shinzaki Y., Maeshima M. et Miyake C., 2008.** Relationship between mesophyll conductance to CO₂ diffusion and contents of aquaporin localized at plasma membrane in tobacco plants grown under drought

- conditions. Eds Allen F., Gantt E., Golbeck J.H. et Osmond B., Photosynthesis. Energy from the Sun: 14th International Congress on Photosynthesis, pp. 805-808. Springer, USA.
- Mohammady D.S., Moore K., Ollerenshaw J. et Shiran B., 2005.** Backcross reciprocal monosomic analysis of leaf relative water content, stomatal resistance, and carbon isotope discrimination in wheat under pre-anthesis water-stress conditions. *Aust. J. Agric. Res.* 56, 1069-1077.
- Monclus R., Dreyer E., Delmotte F.M., Villar M., Delay D., Boudouresque E., Petit J.M., Marron N., Bréchet C. et Brignolas F., 2005.** Productivity, leaf traits and carbon isotope discrimination in 29 *Populus deltoides* x *P. nigra* clones. *New Phytol.* 167, 53-62.
- Monclus R., 2006.** Efficience d'utilisation de l'eau et tolérance à la sécheresse chez le peuplier. Thèse de doctorat, 136 p., Université d'Orléans. France.
- Monclus R., Dreyer E., Villar M., Delmotte F.M., Delay D., Petit J.M., Barbaroux C., Le Thiec D., Bréchet C. et Brignolas F., 2006.** Impact of drought on productivity and water-use efficiency in 29 genotypes of *Populus deltoides* Bartr. Ex Marsh. x *P. nigra* L.. *New Phytol.* 169, 765-777.
- Monti A., Amaducci M.T., Pritoni G. et Venturi G., 2006.** Variation in carbon isotope discrimination during growth and at different organs in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Field Crop Res.* 98, 157-163.
- Morabito D., Jolivet Y., Prat D. et Dizengremel P., 1996.** Differences in the physiological responses of two clones of *Eucalyptus microtheca* selected for their salt tolerance. *Plant sci.* 114, 129-139.
- Mustafa D., Kros J.M. et Luider T., 2008.** Combining laser capture microdissection and proteomics techniques. *Meth. Mol. Biol.* 428, 159-178.
- Neale D.B. et Savolainen O., 2004.** Association genetics of complex traits in conifers. *Trends Plant Sci.* 9, 325-330.
- Nguyen-Queyrens A., Ferhi A., Loustau D. et Guehl J.M., 1998.** Within-ring $\delta^{13}\text{C}$ spatial variability and interannual variation in wood cellulose of two contrasting provenances of *Pinus pinaster*. *Can. J. For. Res.* 28, 766-773.

- Nienhuis J.G., Sills R., Martin B. et King G., 1994.** Variance for water-use efficiency among ecotypes and recombinant inbred lines of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Amer. J. Bot.* 81, 943-947.
- O'Farrell P.H., 1975.** High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021.
- O'Leary M.H., 1981.** Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry*. 20, 553-567.
- Paillassa E., 2001.** Où trouver les cultivars de peuplier pour les plantations 2001-2002 ? *Forêt-entreprise*. 141, 5-9.
- Passioura J.B., 2002.** Environmental biology and crop improvement. *Funct. Plant Biol.* 29, 537-546.
- Pelah D., Shoseyov O. et Altman A., 1995.** Characterization of BspA, a major boiling-stable, water-stress-responsive protein in aspen (*Populus tremula*). *Tree Physiol.* 15, 673-678.
- Pelah D., Wang W., Altman A., Shoseyov O. et Bartels D., 1997.** Differential accumulation of water stress-related proteins, sucrose synthase and soluble sugars in *Populus* species that differ in their water stress response. *Physiol. Plant.* 99, 153-159.
- Pinon J. et Frey P., 1997.** Structure of *Melampsora larici-populina* populations on wild and cultivated poplar. *Eur. J. Plant Pathol.* 103, 159-173.
- Pionneau C., Dubos C., Costa P., Lalanne C., Madur D., Gion J.M., Bahrman N. et Plomion C., 1998.** Electrophorèse des protéines, protocole utilisé à l'INRA de Pierroton (www.pierroton.inra.fr).
- Pita P., Soria F., Canas I., Toval G. et Pardos J.A., 2001.** Carbon isotope discrimination and its relationship to drought under field conditions in genotypes of *Eucalyptus globulus* Labill.. *For. Ecol. Manag.* 141, 211-221.
- Plomion C., Lalanne C., Claverol S., Meddour H., Kohler A., Bogeat-Triboulot M.B., Barre A., Le Provost G., Dumazet H., Jacob D., Bastien C., Dreyer E., de Daruvar A., Guehl J.M., Schmitter J.M., Martin F. et Bonneu M., 2006.**

- Mapping the proteome of poplar and application to the discovery of drought-stress responsive proteins. *Proteomics*. 6, 6509-6527.
- Plomion C., Vincent D., Bedon F., Joets J., Bonhomme L., Morabito D., Duplessis S., Nilsson R., Wingsle G., Larsson C., Jolivet Y., Renaut J., Pechanova O. et Yuceer C., 2009.** Poplar proteomics: update and future challenges. Eds Joshi S. et DiFazio S., *Genomics of Poplars*, Science Publishers, Enfield, New Hampshire, USA. *In press*.
- Ponton S., Dupouey J.L., Breda N., Feuillat F., Bodénès C. et Dreyer E., 2001.** Carbon isotope discrimination and wood anatomy variations in mixed stands of *Quercus robur* and *Quercus petraea*. *Plant Cell Environ.* 24, 861-868.
- Ponton S., Dupouey J.L., Bréda N. et Dreyer E., 2002.** Comparison of water-use efficiency of seedlings from two sympatric oak species: genotype x environment interactions. *Tree Physiol.* 22, 413-422.
- Price A.H., Young E. et Tomos A., 1997.** Quantitative trait loci associated with stomatal conductance, leaf rolling and heading date mapped in upland rice (*Oryza sativa*). *New Phytol.* 137, 83-91.
- Price A.H., Cairns J.E., Horton P., Jone H.G. et Griffiths H., 2002.** Linking drought-resistance mechanisms to drought avoidance in upland rice using a QTL approach: progress and new opportunities to integrate stomatal and mesophyll responses. *J. Exp. Bot.* 53, 989-1004.
- Quisenberry J.E. et McMichael B.L., 1991.** Genetic variation among cotton germplasm for water-use efficiency. *Environ. Exp. Bot.* 31, 433-460.
- Rae A.M., Robinson K.M., Street N.R. et Taylor G., 2004.** Morphological and physiological traits influencing biomass productivity in short-rotation coppice poplar. *Can. J. For. Res.* 34, 1488-1498.
- Ralph S., Oddy C., Cooper D., Yueh H., Jancsik S., Kolosova N., Philippe R.N., Aeschliman D., White R., Huber D., Ritland C.E, Benoit F., Rigby T., Nantel A., Butterfield Y.S.N., Kirkpatrick R., Chun E., Liu J., Palmquist D., Wynhoven B., Stott J., Yang G., Barber S., Holt R.A., Siddiqui A., Jones S.J.M., Marra M.A., Ellis B., Douglas C.J., Ritland K. et Bohlmann J., 2006.** Genomics of hybrid poplar (*Populus trichocarpa* × *deltoides*) interacting with

- forest tent caterpillars (*Malacosoma disstria*): normalized and full-length cDNA libraries, expressed sequence tags, and a cDNA microarray for the study of insect-induced defences in poplar. *Mol. Ecol.* 15, 1275-1297.
- Rebetzke G.J., Condon A.G., Richard R.A. et Farquhar G.D., 2002.** Selection for reduced carbon isotope discrimination increase aerial biomass and grain yield of rainfed bread wheat. *Crop Sci.* 42, 739-745.
- Rebetzke G.J., Condon A.G., Farquhar G.D., Appels R. et Richards R.A., 2008.** Quantitative trait loci for carbon isotope discrimination are repeatable across environments and wheat mapping populations. *Theor. Appl. Genet.* 118, 123-137.
- Renaut J., Lutts S., Hoffmann L. et Hausman J.F., 2004.** Responses of poplar to chilling temperatures: Proteomic and physiological aspects. *Plant Biol.* 6, 81-90.
- Reymond M., Muller B., Leonardi A., Charcosset A. et Tardieu F., 2003.** Combining quantitative trait loci analysis and an ecophysiological model to analyse the genetic variability of the responses of maize leaf growth to temperature and water deficit. *Plant Physiol.* 131, 664-675.
- Riccardi F., Gazeau P., de Vienne D. et Zivy M., 1998.** Protein changes in response to progressive water deficit in maize. Quantitative variation and polypeptide identification. *Plant Physiol.* 117, 1253-1263.
- Riccardi F., Gazeau P., Jacquemot M.P., Vincent D. et Zivy M., 2004.** Deciphering genetic variations of proteome responses to water deficit in maize leaves. *Plant Physiol. Biochem.* 42, 1003-1011.
- Roden J., Van Volkenburgh E. et Hinckley T.M., 1990.** Cellular basis for limitation of poplar leaf growth by water deficit. *Tree Physiol.* 6, 211-219.
- Rossignol M., Peltier J.B., Mock H.P., Matros A., Maldonado A.M. et Jorrín J.V., 2006.** Plant proteome analysis: a 2004–2006 update. *Proteomics.* 6, 5529-5548.
- Roupsard O., Joly H.I. et Dreyer E., 1998.** Variability of initial growth, water-use efficiency and carbon discrimination in seedlings of *Faidherbia albida* (Del.) A. Chev., a multipurpose tree of semi-arid Africa. Provenance and drought effects. *Ann. For. Sci.* 55, 329-348.

- Saab I.N., Sharp R.E. et Pritchard J., 1990.** Increased endogenous abscisic acid maintains primary root growth and inhibits shoot growth of maize seedlings at low water potentials. *Plant Physiol.* 93, 1329-1336.
- Salekdeh G.H., Siopongco J., Wade L.J., Ghareyazie B. et Bennett J., 2002.** Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics.* 2, 1131-1145.
- Shen B., Jensen R.G. et Bohnert H.J., 1997.** Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiol.* 113, 1177-1183.
- Siefritz F., Tyree M.T., Lovisolo C., Schubert A. et Kaldenhoff R., 2002.** PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to function in plants. *Plant Cell.* 14, 869-876.
- Sivamani E., Bahieldin A., Wraith J.M., Al-Niemi T., Dyer W.E., Ho T.H.D. et Qu R.D., 2000.** Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene. *Plant Sci.* 155, 1-9.
- Sterky F., Bhalerao R.R., Unneberg P., Segerman B., Nilsson P., Brunner A.M., Campaa L., Jonsson Lindvall J., Tandré K., Strauss S.H., Sundberg B., Gustafsson P., Uhlen M., Bhalerao R.P., Nilsson O., Sandberg G., Karlsson J., Lundeberg J. et Jansson S., 2004.** A *Populus* EST resource for plant functional genomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 13951-13956.
- Stettler R.F., Koster R. et Steenackers V., 1980.** Interspecific crossability studies in poplars. *Theor. Appl. Genet.* 58, 273-282.
- Stockinger E.J., Gilmour S.J. et Thomashow M.F., 1997.** *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 1035-1040.
- Tardieu F., Zhang J., Katerji N., Bethenod O., Palmer S. et Davies W.J., 1992.** Xylem ABA controls the stomatal conductance of field-grown maize subjected to soil compaction or soil drying. *Plant Cell Environ.* 15, 193-197.

- Tardieu F. et Davies W.J., 1993.** Integration of hydraulic and chemical signalling in the control of stomatal conductance and water status of droughted plants. *Plant Cell Environ.* 16, 341-349.
- Tardieu F., Gowing D. et Davies W.J., 1993.** A model of stomatal control by both ABA concentration in the xylem sap and leaf water status: test of the model and of alternative mechanisms for droughted and ABA-fed field-grown maize. *Plant Cell Environ.* 16, 413-420.
- Tardieu F., Cruiziat P., Durand J.L., Triboï E. et Zivy M., 2007.** ESCo « sécheresse et agriculture », Rapport d'expertise réalisé par l'INRA à la demande du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, pp 242-257.
- Teulat B., Merah O., Sirault X., Borries C., Waugh R. et This D., 2002.** QTLs for grain carbon isotope discrimination in field-grown barley. *Theor. Appl. Genet.* 106, 118-126.
- Thiellement H., Bahrman N., Damerval C., Plomion C., Rossignol M., Santoni V., de Vienne, D. et Zivy M., 1999.** Proteomics for genetical and physiological studies in plants. *Electrophoresis.* 20, 2013-2026.
- Thiellement H., Zivy M. et Plomion C., 2002.** Combining proteomic and genetic studies in plants. *J. Chromatogr. B.* 782, 137-149.
- Thivolle-Cazat A., 2003.** Disponibilité en bois de peuplier en France de 2002 à 2020. Fiche n°662, 6p., AFOCEL.
- Thompson A.J., Andrews J., Mulholland B.J., McKee J.M.T., Hilton H.W., Horridge J.S., Farquhar G.D., Smeeton R.C., Smillie I.R.A., Black C.R. et Taylor I.B., 2007.** Overproduction of abscisic acid in tomato increases transpiration efficiency and root hydraulic conductivity and influences leaf expansion. *Plant Physiol.* 143, 1905-1917.
- Thumma B.R., Naidu B.P., Chandra A., Cameron D., Banisch L. et Liu C.J., 2001.** Identification of causal relationship among traits related to drought resistance in *Stylosanthes scabra* using QTL analysis. *J. Exp. Bot.* 52, 203-214.
- Tschaplinski T.J., Tuskan G.A., Gebre G.M. et Todd D.E., 1998.** Drought resistance of two hybrid *Populus* clones grown in a large-scale plantation. *Tree Physiol.* 18, 653-658.

- Tuberosa R., Sanguinetti M.C., Landi P., Salvi S., Casarini E. et Conti S., 1998.** RFLP mapping of quantitative trait loci controlling abscisic acid concentration in leaves of drought-stressed maize (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Genet.* 97, 744-755.
- Tuberosa R., Salvi S., Sanguinetti M.C., Landi P., Maccafferri M. et Conti S., 2002.** Mappings QTLs regulating morpho-physiological traits and yield: case studies, shortcomings and perspectives in drought-stressed maize. *Ann. Bot.* 89, 941-963.
- Tuskan G.A., DiFazio S., Jansson S., Bohlmann J., Grigoriev I., Hellsten U., Putnam N., Ralph S., Rombauts S., Salamov A., Schein J., Sterck L., Aerts A., Bhalerao R.R., Bhalerao R.P., Blaudez D., Boerjan W., Brun A., Brunner A., Busov V., Campbell M., Carlson J., Chalot M., Chapman J., Chen G.L., Cooper D., Coutinho P.M., Couturier J., Covert S., Cronk Q., Cunningham R., Davis J., Degroove S., Déjardin A., de Pamphilis C., Detter J., Dirks B., Dubchak I., Duplessis S., Ehlting J., Ellis B., Gendler K., Goodstein D., Gribskov M., Grimwood J., Groover A., Gunter L., Hamberger B., Heinze B., Helariutta Y., Henrissat B., Holligan D., Holt R., Huang W., Islam-Faridi N., Jones S., Jones-Rhoades M., Jorgensen R., Joshi C., Kangasjärvi J., Karlsson J., Kelleher C., Kirkpatrick R., Kirst M., Kohler A., Kalluri U., Larimer F., Leebens-Mack J., Leplé J.C., Locascio P., Lou Y., Lucas S., Martin F., Montanini B., Napoli C., Nelson D.R., Nelson C., Nieminen K., Nilsson O., Pereda V., Peter G., Philippe R., Pilate G., Poliakov A., Razumovskaya J., Richardson P., Rinaldi C., Ritland K., Rouzé P., Ryaboy D., Schmutz J., Schrader J., Segerman B., Shin H., Siddiqui A., Sterky F., Terry A., Tsai C.J., Uberbacher E., Unneberg P., Vahala J., Wall K., Wessler S., Yang G., Yin T., Douglas C., Marra M., Sandberg G., Van de Peer Y. et Rokhsar D., 2006.** The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*. 313, 1596-1604.
- Tyerman S., Niemietz C. et Bramley H., 2002.** Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell Environ.* 25, 173-194.
- Uehlein N., Lovisolo C., Siefritz F. et Kaldenhoff R., 2003.** The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature*. 425, 734-737.

- Uesono Y. et Toh E.A., 2002.** Transient inhibition of translation initiation by osmotic stress. *J. Biol. Chem.* 277, 13848-13855.
- Ulloa M., Cantrell R.G., Percy R.G., Zeiger E. et Lu Z.M., 2000.** QTL analysis of stomatal conductance and relationship to lint yield in an interspecific cotton. *J. Cotton Sci.* 4, 10-18.
- Umezawa T., Fujita M., Fujita Y., Yamaguchi-Shinozaki K. et Shinozaki K., 2006.** Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Curr. Opin. Biotech.* 17, 113-122.
- Valcu C.M., Lalanne C., Müller-Starck G., Plomion C. et Schlink K., 2008.** Protein polymorphism between 2 *Picea abies* populations revealed by 2-dimensional gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. *J. Heredity* 99, 364-375.
- Van den Boogard R., Alewijnse D., Veneklaas E.J. et Lambers H., 1997.** Growth and water-use efficiency of 10 *Triticum aestivum* cultivars at different water availability in relation to allocation of biomass. *Plant Cell Environ.* 20, 200-210.
- Vander Mijnsbrugge K., Meyermans H., Van Montagu M., Bauw G. et Boerjan W., 2000.** Wood formation in poplar: identification, characterization, and seasonal variation of xylem proteins. *Planta*. 210, 589-598.
- Vincent D., Lapierre C., Pollet B., Cornic G., Negroni L. et Zivy M., 2005.** Water deficits affect caffeate O-methyltransferase, lignification, and related enzymes in maize leaves. A proteomic investigation. *Plant Physiol.* 137, 949-960.
- Vincent D., Ergül A., Bohlman M., Tattersall A., Tillett R., Wheatley M., Woolsey R., Quilici D., Joets J., Schlauch K., Schooley D., Cushman J. et Cramer G. 2007.** Proteomic analysis reveals differences between *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay and cv. Cabernet Sauvignon and their responses to water deficit and salinity. *J. Exp. Bot.* 58, 1873-1892.
- Vincent D. et Zivy M., 2007.** Proteomics upon drought and abiotic stress. Eds Šamaj J. et Thelen J., *Plant proteomics*, pp. 386-94, Springer, Heidelberg, Germany.
- Voltas J., Lopez-Corcoles H. et Borrás G., 2005.** Use of biplot analysis and factorial regression for the investigation of superior genotypes in multi-environment trials. *Eur. J. Agron.* 22, 309-324.

- Voltas J., Serrano L., Hernandez M. et Peman J., 2006.** Carbon isotope discrimination, gas exchange and stem growth of four Euramerican hybrid poplars under different watering regimes. *New For.* 31, 435-451.
- Wang Z., Han J. et Schey K.L., 2008.** Spatial differences in an integral membrane proteome detected in laser capture microdissected samples. *J. Proteome Res.* 7, 2696-2702.
- Wasinger V.C., Cordwell S.J., Cerpa-Poljak A., Yan J.X., Gooley A.A., Wilkins M.R., Duncan M.W., Harris R., Williams K.L. et Humphery-Smith I., 1995.** Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis.* 16, 1090-1094.
- Westgate M.E. et Boyer J.S., 1985.** Osmotic adjustment and the inhibition of leaf, root, stem and silk growth at low water potentials in maize. *Planta.* 164, 540-549.
- Wilkinson S. et Davies W.J., 1997.** Xylem sap pH increase: a drought signal received at the apoplastic face of guard cell that involves the suppression of saturable abscisic acid uptake by epidermal symplast. *Plant Physiol.* 113, 559-573.
- Wright G.C., Rao N. et Farquhar G.D., 1994.** Water-use efficiency and carbon isotope discrimination in peanut under water deficit conditions. *Crop Sci.* 34, 92-97.
- Xin Z. et Browse J., 1998.** Eskimo1 mutants of *Arabidopsis* are constitutively freezing-tolerant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 7799-7804.
- Xu X., Martin B., Comstock J.P., Vision T.J., Tauer C.G., Zhao B., Pausch R.C. et Knapp S., 2008.** Fine mapping a QTL for carbon isotope composition in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 117, 221-233.
- Xue G.P., McIntyre C.L., Chapman S., Bower N.I., Way H., Reverter A., Clarke B. et Shorter R., 2006.** Differential gene expression of wheat progeny with contrasting levels of transpiration efficiency. *Plant Mol. Biol.* 61, 863-881.
- Yuan K., Zhang B., Zhang Y., Cheng Q., Wang W. et Huang M., 2008.** Identification of differentially expressed proteins in poplar leaves induced by *Marssonina brunnea* f. sp. *Multigermtubi*. *J. Genet. Genom.* 35, 49-60.

- Zhang J.W., Marshall J.D. et Jaquish B.C., 1993.** Genetic differentiation in carbon isotope discrimination and gas exchange in *Pseudotsuga menziesii*: a common garden experiment. *Oecologia*. 93, 80-87.
- Zhang J., Nguyen H.T. et Blum A., 1999.** Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. *J. Exp. Bot.* 50, 291-302.
- Zhang X., Zang R. et Li C., 2004.** Population differences in physiological and morphological adaptations of *Populus davidiana* seedlings in response to progressive drought stress. *Plant Sci.* 166, 791-797.
- Zhu Y., Lin K.R., Huang Y., Tauer C.G. et Martin B., 1998.** A cDNA from tomato (*Lycopersicon pennellii*) encoding ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase (Accession No. AF037361) (PRG98-0053). *Plant Physiol.* 116, 1603.
- Zhu C., Schraut D., Hartung W. et Schaffner A.R., 2005.** Differential responses of maize MIP genes to salt stress and ABA. *J. Exp. Bot.* 56, 2971-2981.
- Zivy M., Thiellement H., de Vienne D. et Hofmann J.P., 1983.** Study on nuclear and cytoplasmic genome expression in wheat by two-dimensional gel electrophoresis. 1. First results on 18 alloplasmic lines. *Theor. Appl. Genet.* 66, 1-7.
- Zivy M., Thiellement H., de Vienne D. et Hofmann J.P., 1984.** Study on nuclear and cytoplasmic genome expression in wheat by two-dimensional gel electrophoresis. 2. Genetic differences between two lines and two groups of cytoplasms at five developmental stages or organs. *Theor. Appl. Genet.* 68, 335-345.
- Zivy M., 1987.** Genetic variability for heat shock proteins in common wheat. *Theor. Appl. Genet.* 74, 209-213.
- Zivy M. et de Vienne D., 2000.** Proteomics: a link between genomics, genetics and physiology. *Plant Mol. Biol.* 44, 575-580.
- Zsuffa L., 1973.** A summary review of inter-specific breeding in the genus *Populus* L. Proceedings of the 14th Meeting of the Committee on Forest Tree Breeding in Canada. pp. 107-123.

Valorisation des résultats

~

Publication dans des revues scientifiques internationales à comité de lecture :

- [1] **L. Bonhomme**, R. Monclus, D. Vincent, S. Carpin, A.-M. Lomenech, C. Plomion, F. Brignolas and D. Morabito. 2009. Leaf proteome analysis of eight *Populus ×euramericana* genotypes: genetic variation in drought response and in water-use efficiency involves photosynthesis-related proteins. *Proteomics. In press.*
- [2] **L. Bonhomme**, R. Monclus, D. Vincent, S. Carpin, S. Claverol, A.-M. Lomenech, V. Labas, C. Plomion, F. Brignolas and D. Morabito. 2009. Genetic variation and drought response in two *Populus × euramericana* genotypes through 2-DE proteomic analysis of leaves from field and glasshouse cultivated plants. *Phytochemistry. In press.*
- [3] **L. Bonhomme**, C. Barbaroux, R. Monclus, D. Morabito, A. Berthelot, M. Villar, E. Dreyer and F. Brignolas. 2008. Genetic variation in productivity, leaf traits and carbon isotope discrimination in hybrid poplars cultivated on contrasting sites. *Annals of Forest Science.* 65 5-503.

Publication dans des chapitres d'ouvrages scientifiques :

- [1] C. Plomion, D. Vincent, F. Bedon, J. Joets, **L. Bonhomme**, D. Morabito, S. Duplessis, R. Nilsson, G. Wingsle, C. Larsson, Y. Jolivet, J. Renaut, O. Pechanova, C. Yuceer. 2009. Poplar proteomics : update and future challenges. In: *Genomics of Poplars*, eds S. Joshi and S. DiFazio. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, USA. *In press.*

Communications orales à des Congrès :

- [1] **L. Bonhomme**, V. Labas, D. Vincent, C. Plomion, F. Brignolas et D. Morabito. 2008. Comparaison du protéome foliaire de deux hybrides de peuplier (*Populus deltoides* x *P. nigra*) soumis à un déficit hydrique en serre et en pépinière. X^{èmes} Journées de Biologie Moléculaire des Ligneux, Nancy (France), 5-7 mai.
- [2] **L. Bonhomme**, C. Barbaroux, R. Monclus, D. Morabito, M. Villar, E. Dreyer and F. Brignolas. 2008. Variation génétique de la productivité, de caractères foliaires et de la discrimination isotopique vis-à-vis du carbone chez des hybrides de peuplier cultivés sur des sites contrastés. Journées Jeunes Chercheurs du département 'Génétique et Amélioration des Plantes' et du département 'Écologie des Forêts, Prairies et milieux Aquatiques' de l'INRA, Orléans (France), 11-12 mars.
- [3] **L. Bonhomme**, C. Barbaroux, R. Monclus, D. Morabito, M. Villar, E. Dreyer et F. Brignolas. 2007. Diversité de l'efficacité de l'utilisation de l'eau chez le peuplier. 20^{ème} Colloque BioTechnoCentre, Seillac (France), 25-26 octobre.
- [4] **L. Bonhomme**. 2007. Variabilité de l'efficacité d'utilisation de l'eau chez le peuplier. Sciences en Sologne, Orléans (France), 23-24 mai.

- [5] **L. Bonhomme**, F. Brignolas et D. Morabito. 2006. Effet d'une sécheresse édaphique estivale sur les profils protéiques de deux génotypes de peuplier contrastés pour leur discrimination isotopique vis-à-vis du carbone. 19^{ème} Colloque BioTechnoCentre, Seillac (France), 9-10 novembre.
- [6] **L. Bonhomme**, R. Monclus, F. Brignolas, F.M. Delmotte et D. Morabito. 2006. Impact d'une sécheresse sur les profils protéiques de 2 génotypes de peuplier contrastés pour leur efficacité d'utilisation de l'eau. IX^{èmes} Journées de Biologie Moléculaire des Ligneux, Orléans (France), 21-23 mars.

Communications orales sur invitation :

- [1] **L. Bonhomme** et F. Brignolas. 2007. Les peupliers face à la sécheresse. Assemblée générale de l'association *Peupliers du Centre – Val de Loire*, Beuxes, 22 juin.

Séminaires :

- [1] **L. Bonhomme**, D. Morabito et F. Brignolas. 2008. Relations entre profils protéiques foliaires, efficacité d'utilisation de l'eau et tolérance à la sécheresse chez les peupliers euraméricains. Séminaire inter-équipes LBLGC (Université d'Orléans) – UAGPF (INRA Orléans) – EEF (INRA Nancy), Université d'Orléans, 8 janvier.
- [2] **L. Bonhomme**, R. Monclus, F. Brignolas et D. Morabito. 2006. Modulation des profils protéiques foliaires par la sécheresse: le cas de 2 génotypes de peupliers euraméricains contrastés pour leur efficacité d'utilisation de l'eau. Séminaire inter-équipes LBLGC (Université d'Orléans) – UAGPF (INRA Orléans) – EEF (INRA Nancy), INRA d'Orléans, 27 juin.
- [3] **L. Bonhomme**, C. Barbaroux, M. Villar, D. Meese, R. Monclus, Morabito D. et F. Brignolas. 2006. Variabilité génétique de la discrimination isotopique vis-à-vis du carbone chez des peupliers cultivés en peupleraie. Séminaire inter-équipes LBLGC (Université d'Orléans) – UAGPF (INRA Orléans) – EEF (INRA Nancy), INRA d'Orléans, 27 juin.
- [4] **L. Bonhomme**, R. Monclus, F. Brignolas et D. Morabito. 2005. Analyse des profils d'expression protéiques de deux clones de peupliers contrastés pour leur efficacité à utiliser l'eau : Avancée des travaux, Séminaire inter-équipes LBLGC (Université d'Orléans) – UAGPF (INRA Orléans) – EEF (INRA Nancy), INRA d'Orléans, 18 mai.

Communications par affiches à des congrès ayant donné lieu à publication d'un résumé:

- [1] C. Barbaroux, **L. Bonhomme**, R. Monclus, N. Marron, S. Chamaillard, R. Fichot, E. Dreyer and F. Brignolas. 2008. Genetic variability of water-use efficiency in poplar: a review. Joint European Stable Isotope User Meeting, Hyères (France), 31 août - 5 septembre.
- [2] **L. Bonhomme**, V. Labas, D. Vincent, C. Plomion, F. Brignolas and D. Morabito. 2008. Impact of water deficit on the leaf proteome of 2 *Populus deltoides* x *P. nigra* grown in glasshouse or in nursery. XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB), Tampere (Finlande), 17-22 août.
- [3] **L. Bonhomme**, C. Barbaroux, R. Monclus, D. Morabito, M. Villar, E. Dreyer and F. Brignolas. 2008. Variation génétique de la productivité, de caractères foliaires et de la

discrimination isotopique vis-à-vis du carbone chez des hybrides de peuplier cultivés sur des sites contrastés. Journées Jeunes Chercheurs du département 'Génétique et Amélioration des Plantes' et du département 'Écologie des Forêts, Prairies et milieux Aquatiques' de l'INRA, Orléans (France), 11-12 mars.

- [4] **L. Bonhomme**, C. Barbaroux, R. Monclus, D. Morabito, M. Villar, E. Dreyer et F. Brignolas. 2007. Diversité génotypique de la productivité et de l'efficacité d'utilisation de l'eau chez les principaux hybrides de peuplier cultivés en peupleraie. 20^{ème} Colloque BioTechnoCentre, Seillac (France), 25-26 octobre.
- [5] C. Teyssier, C. Grondin, **L. Bonhomme**, D. Morabito, M. Vallance, P. Label and M.-A. Lelu-Walter. 2007. Towards a better understanding of conifer somatic embryo development by proteomic analysis. Tree Biotechnology 2007, Ponta Delgada (Portugal), 3-8 juin.
- [6] **L. Bonhomme**, F. Brignolas et D. Morabito. 2006. Effet d'une sécheresse édaphique estivale sur les profils protéiques de deux génotypes de peuplier contrastés pour leur discrimination isotopique vis-à-vis du carbone. 19^{ème} Colloque BioTechnoCentre, Seillac (France), 9-10 novembre.
- [7] **L. Bonhomme**, F. Brignolas and D. Morabito. 2006. Impact of droughts on the protein expression patterns of 2 hybrid poplars contrasted for their leaf carbon isotope discrimination. Congrès de la Société Française d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique, Saint-Malo (France), 16-18 octobre.
- [8] **L. Bonhomme**, F. Brignolas and D. Morabito. 2006. Impact of droughts on the protein expression patterns of 2 hybrid poplars contrasted for their leaf carbon isotope discrimination. PROTEOMLUX, Luxembourg-Kirchberg (Luxembourg), 11-14 octobre.
- [9] **L. Bonhomme**, R. Monclus, F. Brignolas, M. Villar, M. Krsnik-Rasol et D. Morabito. 2005. Impact de la sécheresse sur les profils d'expression protéique de deux génotypes de peupliers contrastés pour leur efficacité d'utilisation de l'eau. 18^{ème} Colloque BioTechnoCentre, Fondjouan (France), 3-4 Novembre.
- [10] F. Brignolas, N. Marron, R. Monclus, **L. Bonhomme**, M. Villar, E. Dreyer, D. Meese, D. Morabito et C. Barbaroux. 2005. Diversité de l'efficacité de l'utilisation de l'eau chez les peupliers euraméricains. 18^{ème} Colloque BioTechnoCentre, Seillac (France), 3-4 novembre.

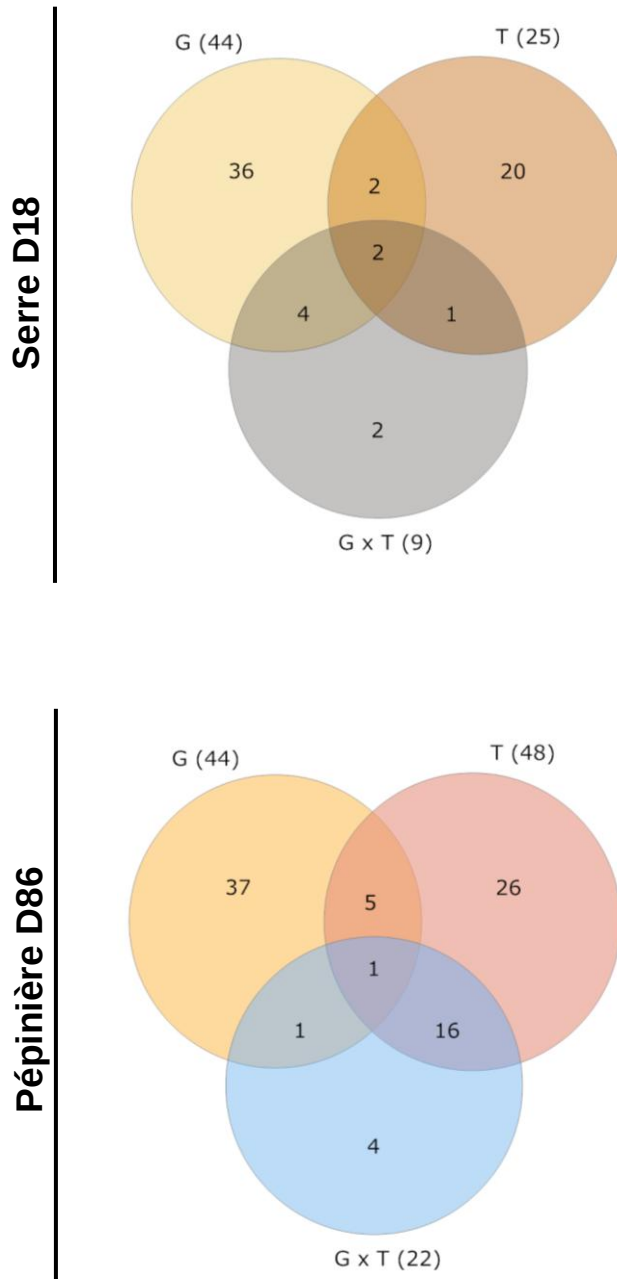
Prix :

- [1] **1^{er} prix** de vulgarisation scientifique. Sciences en Sologne 2007, Orléans (France), 23-24 mai 2007.

Annexes

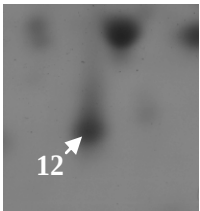
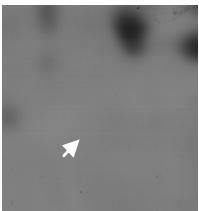
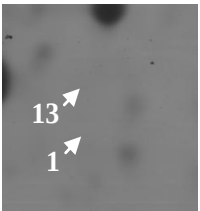
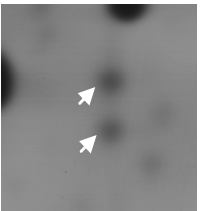
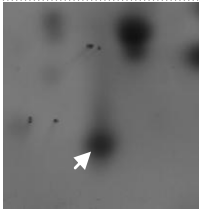
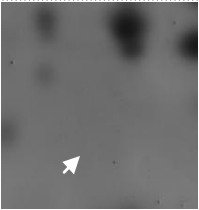
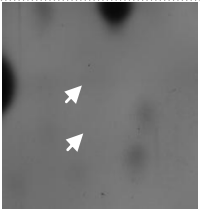
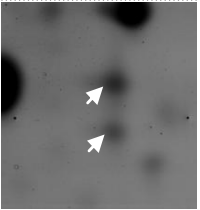
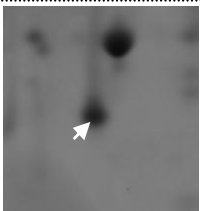
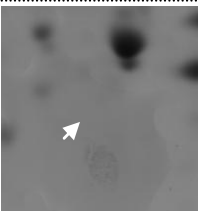
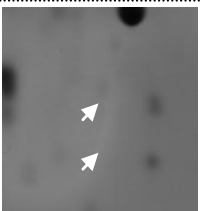
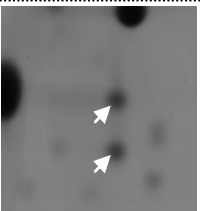
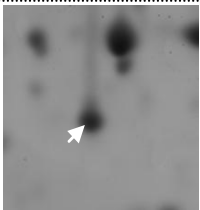
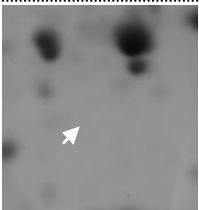
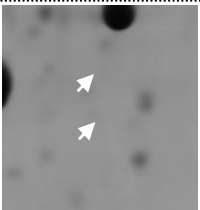
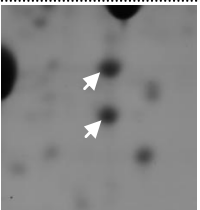
~

Annexe 1.



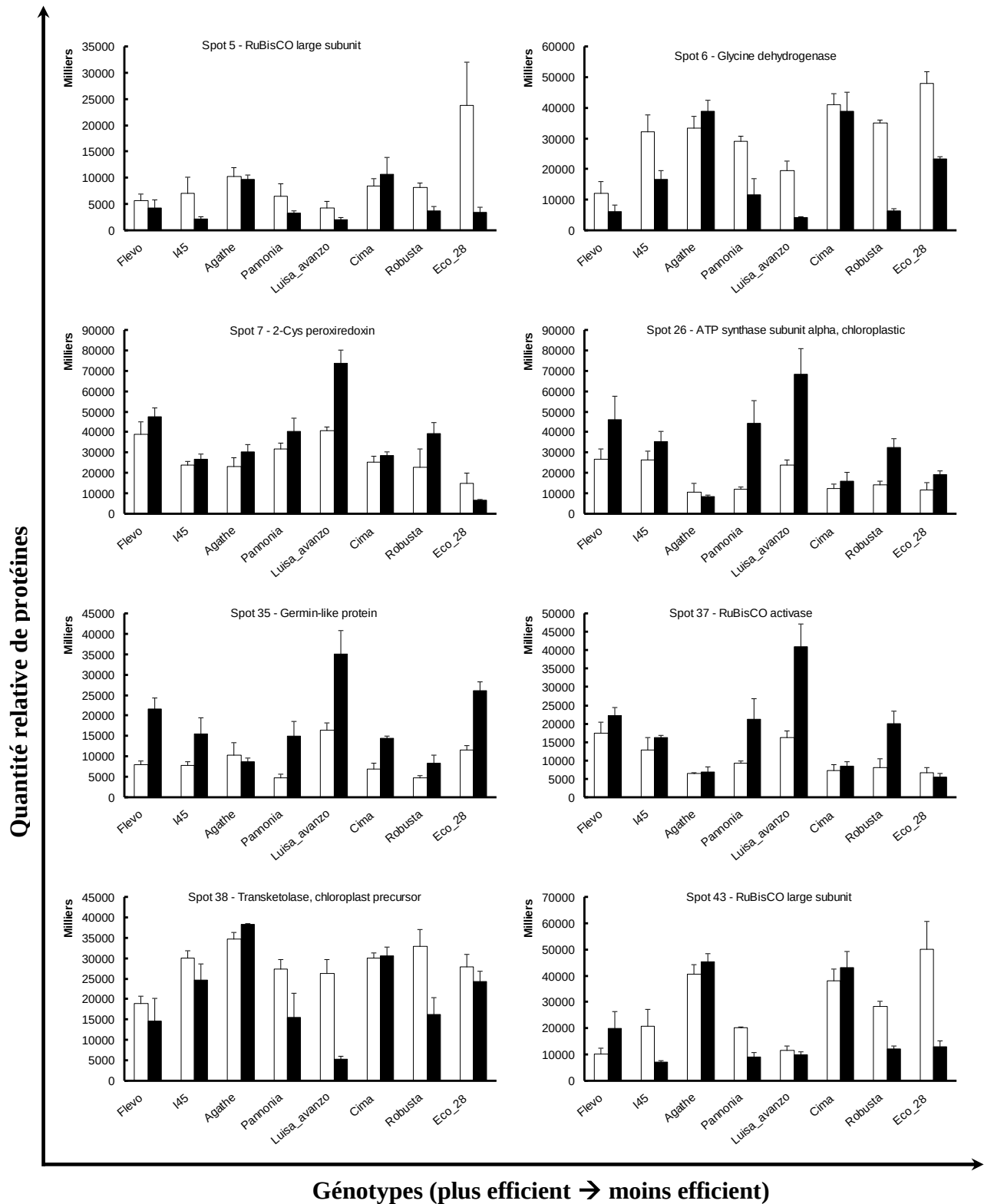
Annexe 1. Diagrammes de Venn représentant le nombre de spots significatifs pour chaque effet de l'ANOVA à deux facteurs croisés [*i.e.*, effet Genotype (G, 'Agathe_F' vs. 'Cima'), Traitement (T, témoin vs. déficit hydrique) et interaction Génotype × Traitement] en serre après un déficit hydrique de 18 jours (D18) et en pépinière après un déficit hydrique de 86 jours (D86). Le nombre de spots présentant un effet G est limité aux 44 spots distinguant systématiquement 'Agathe_F' de 'Cima' quelle que soit la comparaison.

Annexe 2.

		'Agathe_F'	'Cima'			'Agathe_F'	'Cima'
Glasshouse WW	D18						
	D28						
Open field WW	D50						
	D86						

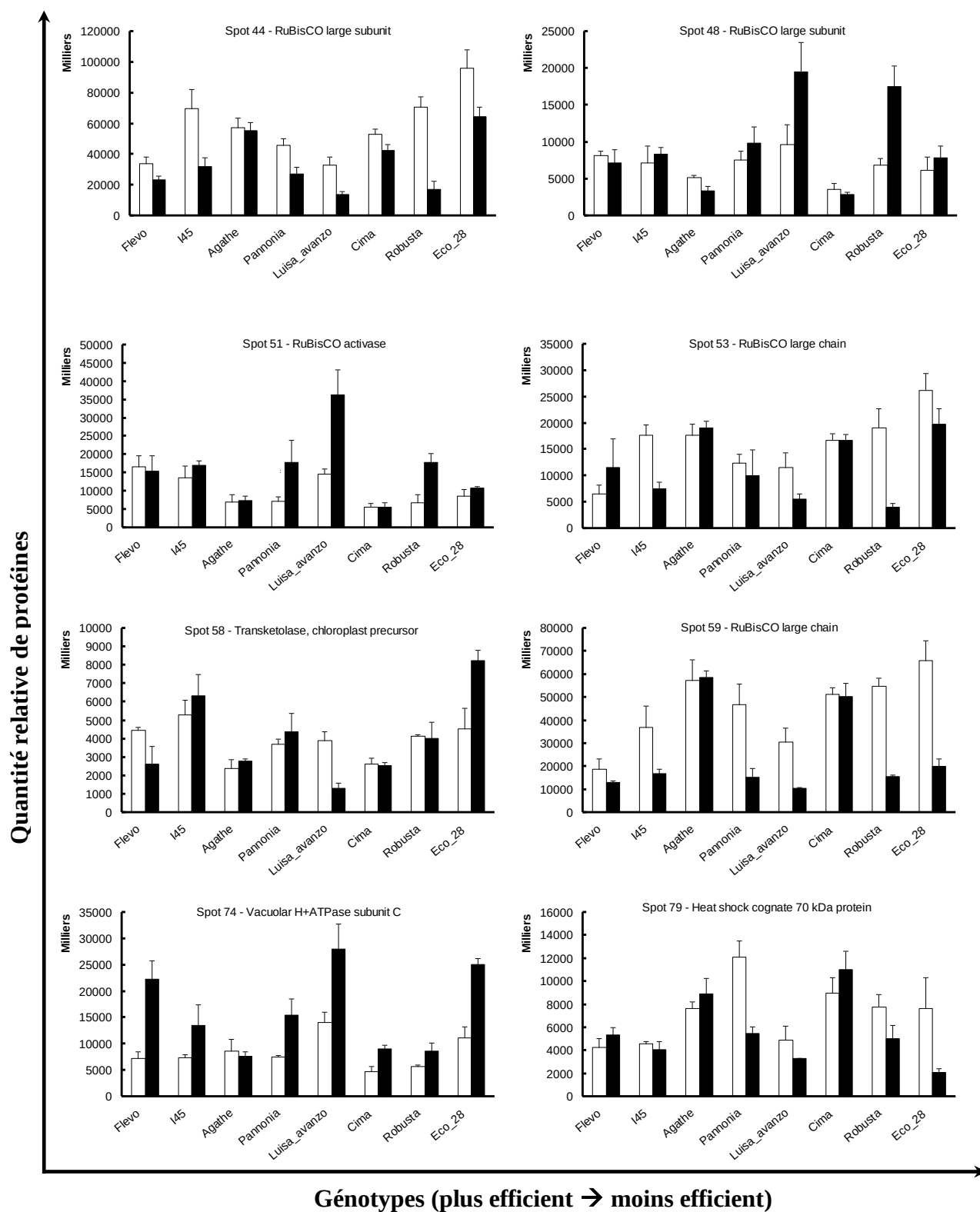
Annexe 2. Exemples de variations génétiques de l'abondance de protéines foliaires observées entre les génotypes 'Agathe_F' et 'Cima' cultivés en serre (aux jours 18 et 28 ; D18 et D28) et en pépinière (aux jours 50 et 86 ; D50 et D86) en condition hydrique non limitante (WW). Trois isoformes d'une *oxygen-evolving enhancer protein 2* ont été assignées aux spots n° 1, 12 et 13, le spot n° 12 présentait une plus forte abondance chez 'Agathe_F' alors que les spots n° 1 et 13 présentaient des abondances plus importantes chez 'Cima'.

Annexe 3.



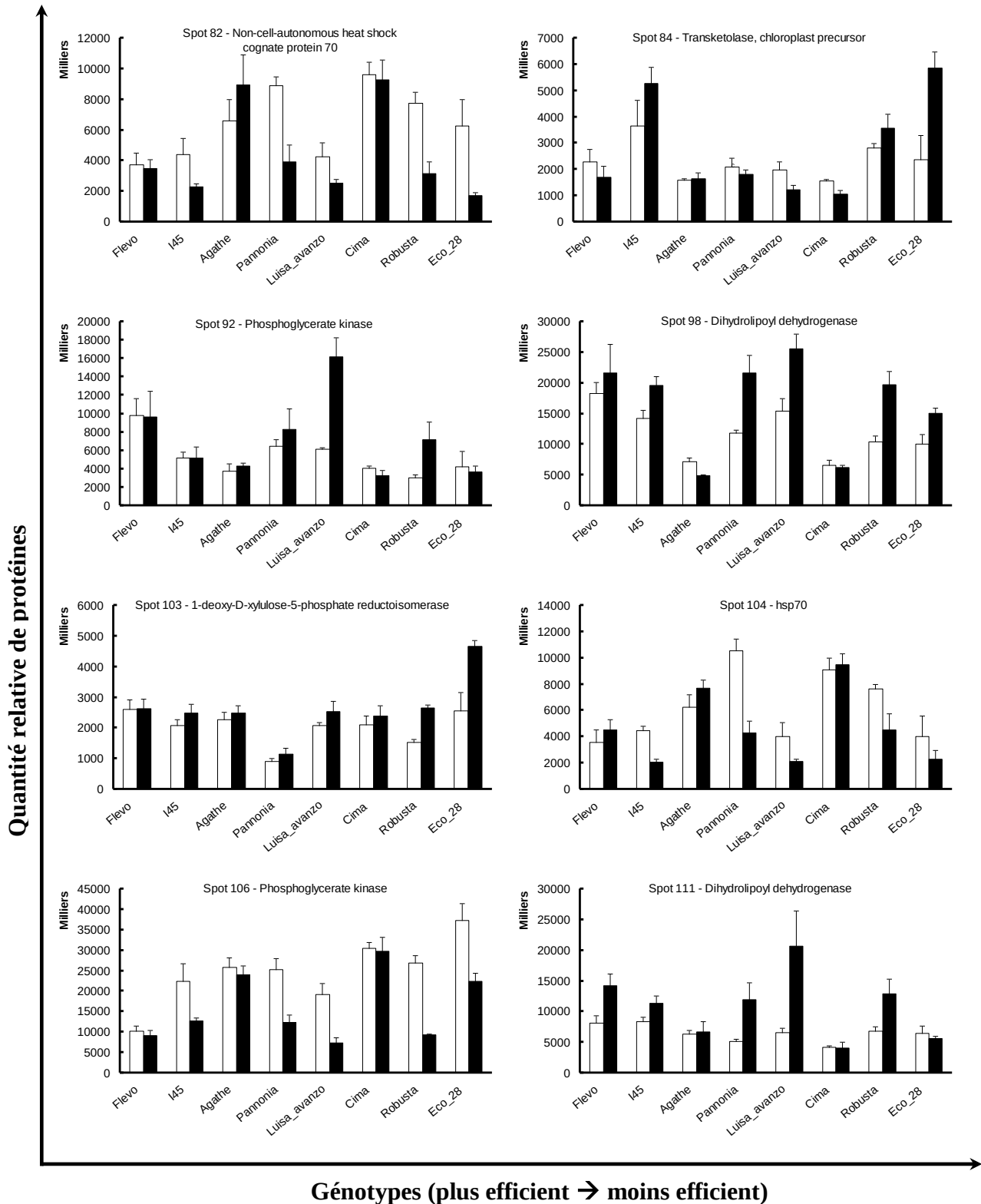
Annexe 3. Profils d'expression des 62 protéines identifiées présentant un effet significatif de l'interaction Génotype × Traitement du modèle d'ANOVA à deux facteurs croisés. Les histogrammes illustrent les quantités relatives de protéines des huit génotypes de peuplier contrastés pour Δ , les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne.

Annexe 3 (suite).



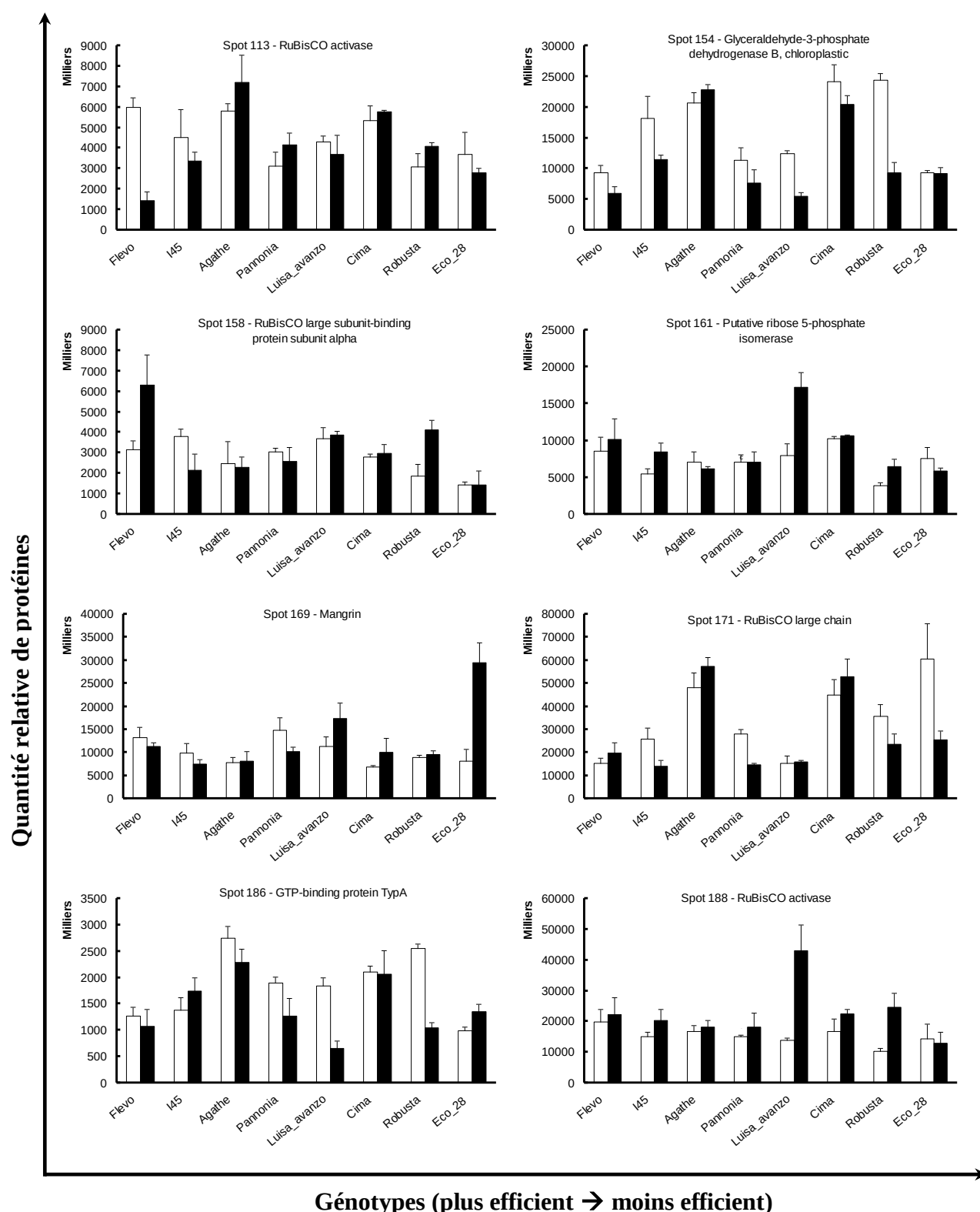
Annexe 3 (suite). Profils d'expression des 62 protéines identifiées présentant un effet significatif de l'interaction Génotype × Traitement du modèle d'ANOVA à deux facteurs croisés. Les histogrammes illustrent les quantités relatives de protéines des huit génotypes de peuplier contrastés pour Δ , les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne.

Annexe 3 (suite).



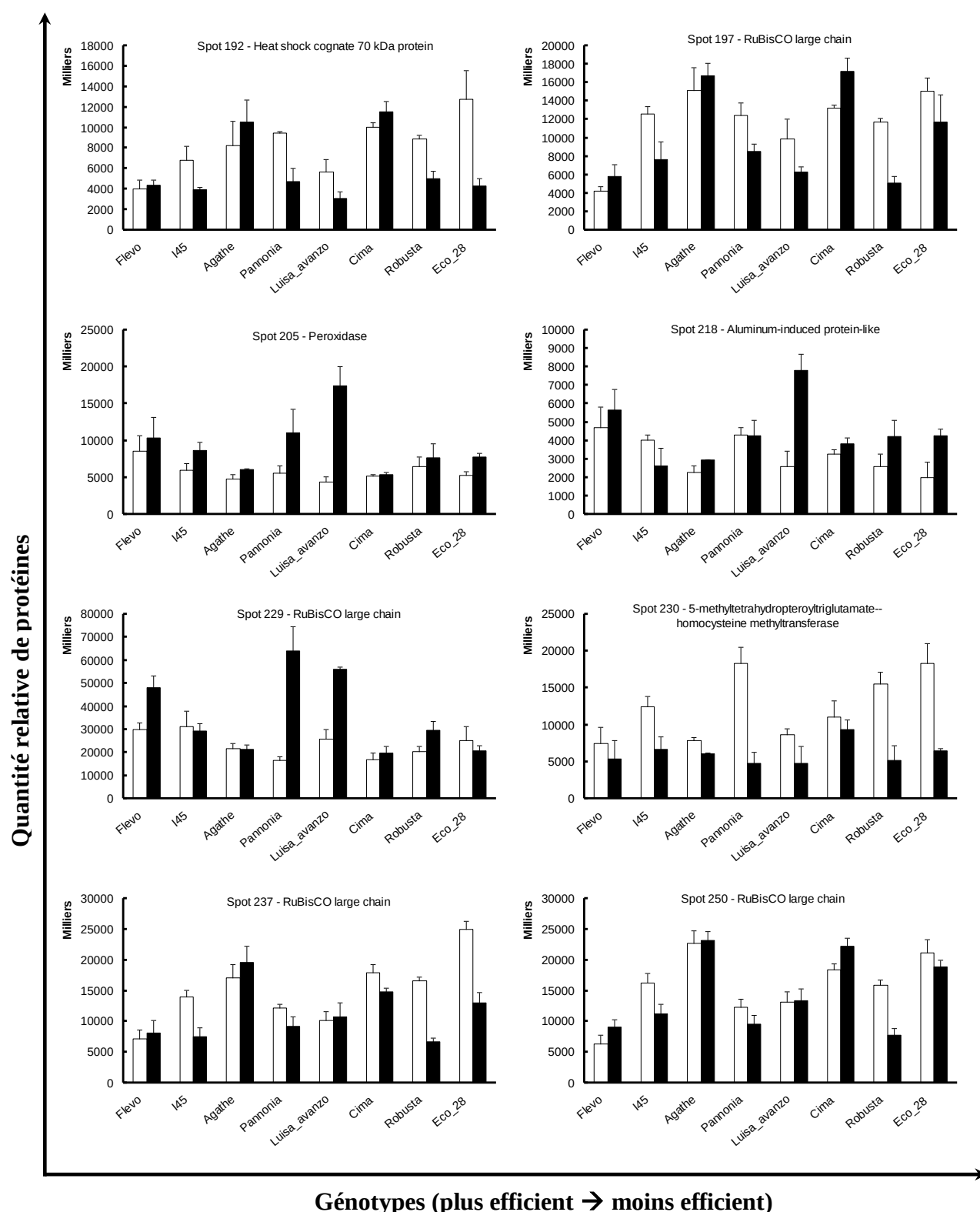
Annexe 3 (suite). Profils d'expression des 62 protéines identifiées présentant un effet significatif de l'interaction Génotype × Traitement du modèle d'ANOVA à deux facteurs croisés. Les histogrammes illustrent les quantités relatives de protéines des huit génotypes de peuplier contrastés pour Δ , les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne.

Annexe 3 (suite).



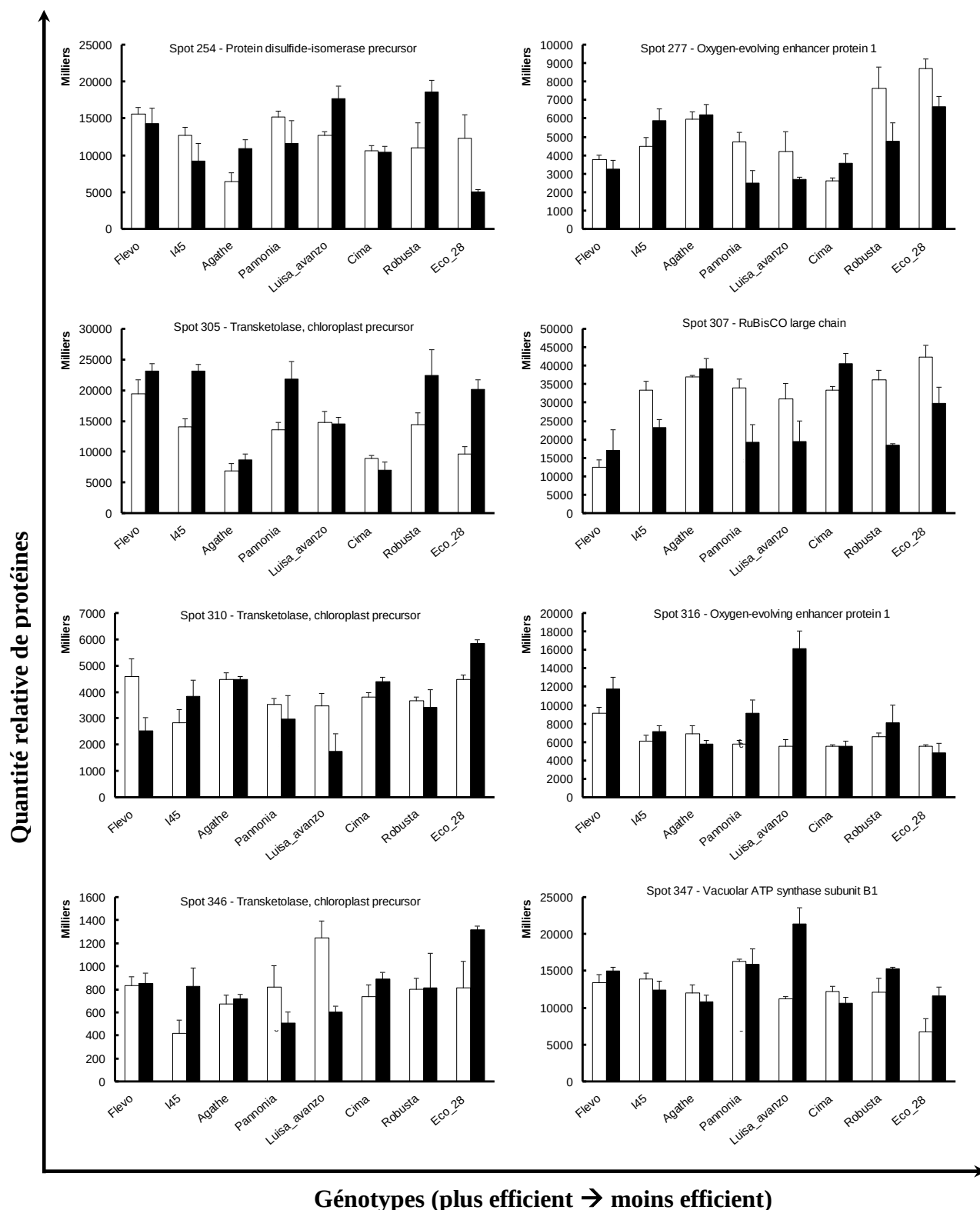
Annexe 3 (suite). Profils d'expression des 62 protéines identifiées présentant un effet significatif de l'interaction Génotype × Traitement du modèle d'ANOVA à deux facteurs croisés. Les histogrammes illustrent les quantités relatives de protéines des huit génotypes de peuplier contrastés pour Δ , les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne.

Annexe 3 (suite).



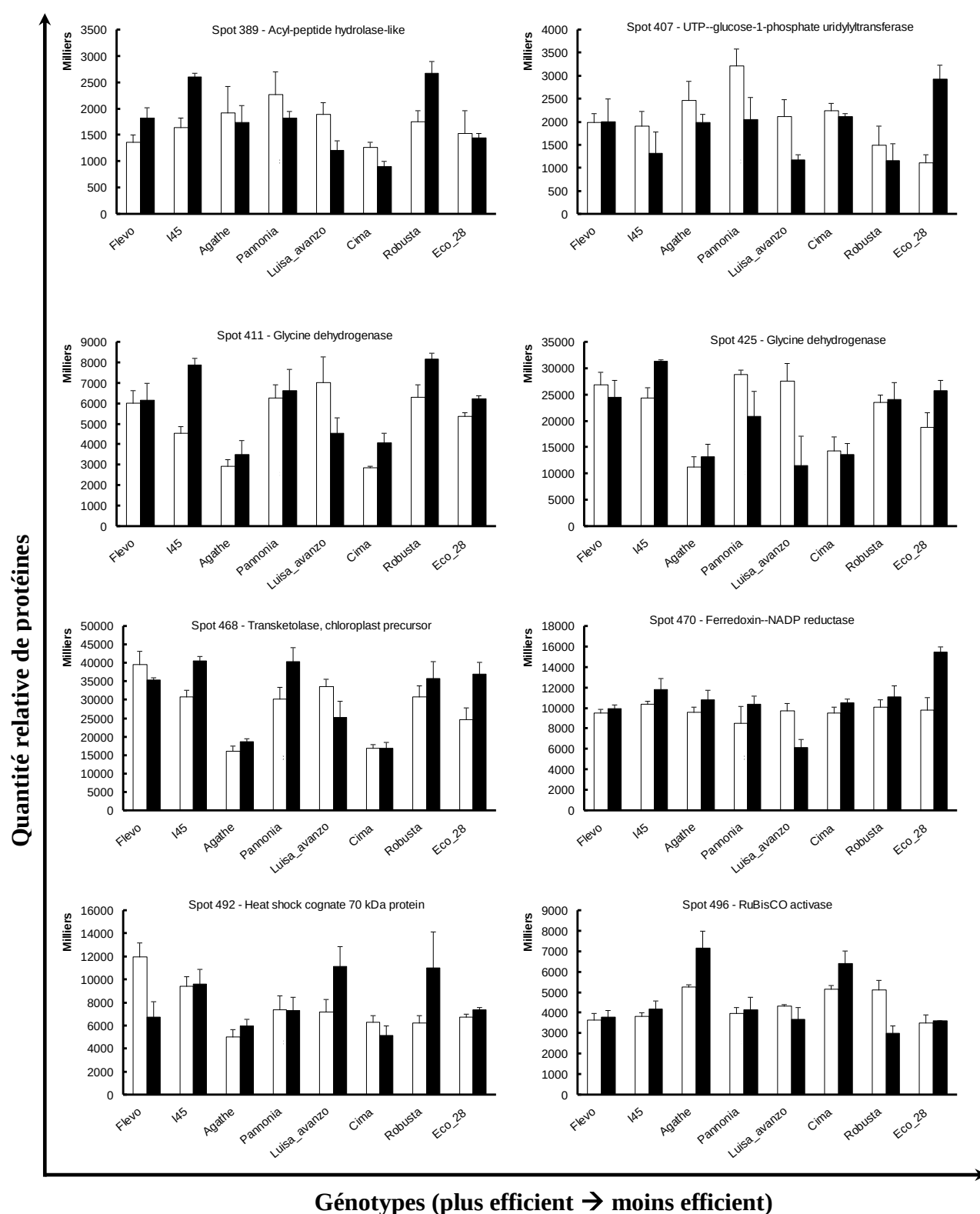
Annexe 3 (suite). Profils d'expression des 62 protéines identifiées présentant un effet significatif de l'interaction Génotype × Traitement du modèle d'ANOVA à deux facteurs croisés. Les histogrammes illustrent les quantités relatives de protéines des huit génotypes de peuplier contrastés pour Δ , les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne.

Annexe 3 (suite).



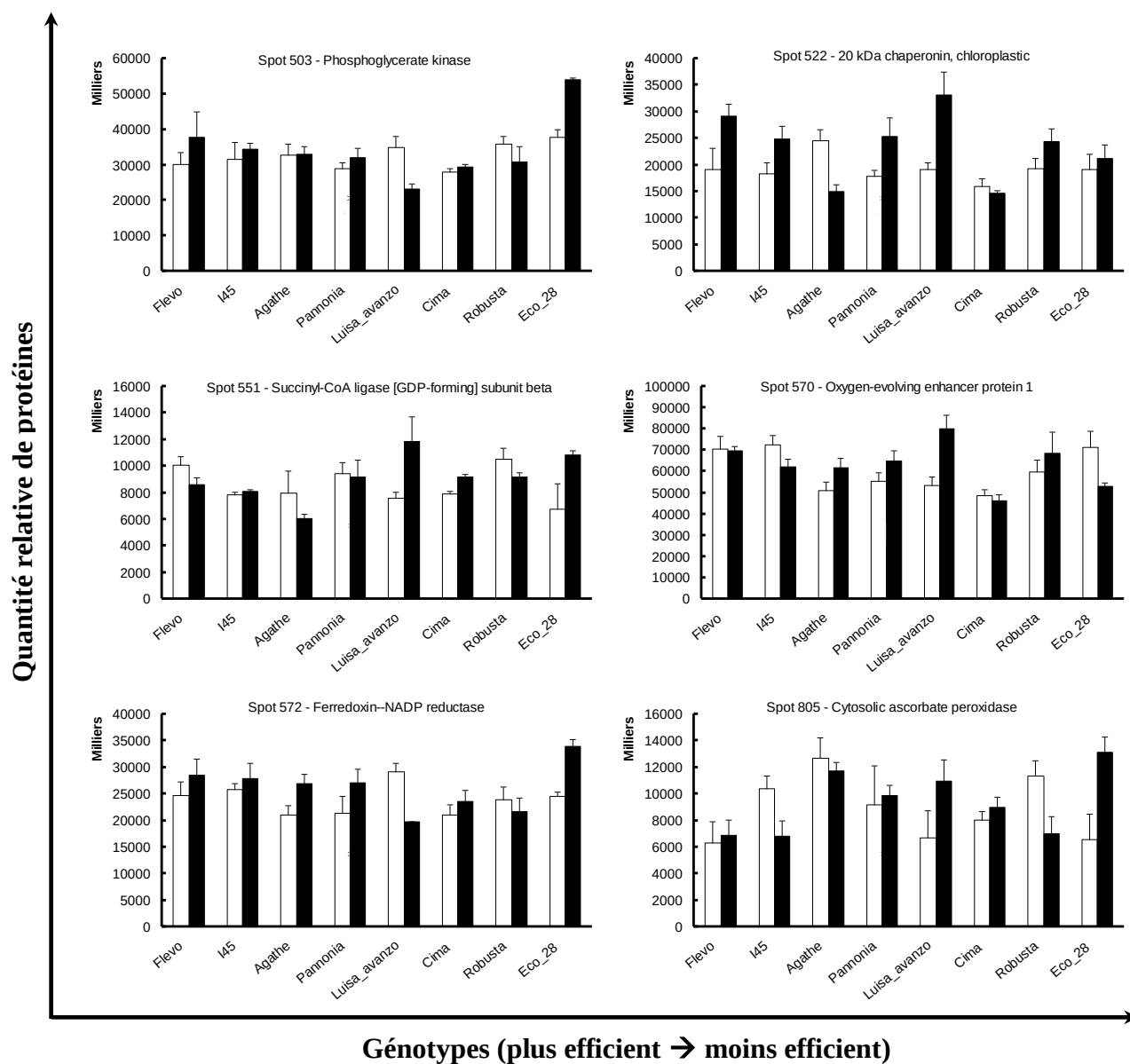
Annexe 3 (suite). Profils d'expression des 62 protéines identifiées présentant un effet significatif de l'interaction Génotype × Traitement du modèle d'ANOVA à deux facteurs croisés. Les histogrammes illustrent les quantités relatives de protéines des huit génotypes de peuplier contrastés pour Δ , les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne.

Annexe 3 (suite).



Annexe 3 (suite). Profils d'expression des 62 protéines identifiées présentant un effet significatif de l'interaction Génotype × Traitement du modèle d'ANOVA à deux facteurs croisés. Les histogrammes illustrent les quantités relatives de protéines des huit génotypes de peuplier contrastés pour Δ , les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne.

Annexe 3 (suite).



Annexe 3 (suite). Profils d'expression des 62 protéines identifiées présentant un effet significatif de l'interaction Génotype × Traitement du modèle d'ANOVA à deux facteurs croisés. Les histogrammes illustrent les quantités relatives de protéines des huit génotypes de peuplier contrastés pour Δ , les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne.

Protéome Foliaire et Efficience d'Utilisation de l'Eau chez le Peuplier

Dans le contexte du changement climatique global, il apparaît essentiel de prendre en compte l'adaptabilité des variétés cultivées à la modification de l'environnement. Dans le cas du peuplier, la sélection de ressources génétiques capables de produire du bois à moindre coût en eau devient alors un critère de choix qui peut être apprécié par l'efficience d'utilisation de l'eau (WUE). De façon à évaluer l'intérêt de développer un programme de sélection sur WUE, il convenait de juger si les variations génétiques de WUE observées sur de jeunes boutures, s'exprimaient encore sur des arbres cultivés en peupleraie sur des sols contrastés. Par ailleurs, afin d'initier une étude du déterminisme moléculaire de WUE, nous avons évalué le degré de variation génétique des protéomes foliaires de huit génotypes de peupliers contrastés pour leur WUE et cultivés dans des conditions d'alimentation en eau variées.

Nos travaux ont permis de valider l'existence d'importantes variations génétiques de WUE chez des peupliers cultivés en peupleraie. Toutefois, le type de sol modifiait considérablement le classement des génotypes alors que celui établi sur les sols les plus propices à la populiculture était comparable au classement décrit précédemment en serre. Nos expériences ont également validé la possibilité de distinguer des génotypes contrastés pour WUE à partir de leur protéome foliaire. Nous avons montré que le protéome foliaire de huit génotypes différant par leur WUE présentait d'importantes variations génétiques en réponse à la sécheresse et qu'il existait des liens entre abondances de protéines foliaires et variations génétiques de WUE.

Mots-clés : Peuplier, efficience d'utilisation de l'eau, discrimination isotopique vis-à-vis du carbone, variation génétique, sécheresse, protéome, électrophorèse bidimensionnelle, plasticité moléculaire, assimilation nette de CO₂, conductance stomatique, RuBisCO

Leaf Proteome and Water-Use Efficiency in Poplar

In the actual climate change context, the cultivated varieties will have to cope with the expected environmental modifications. In poplar, the breeding of genetic resources able to grow with lower water costs becomes therefore, an essential criterion that can be evaluated from water-use efficiency (WUE). In order to assess the interest to develop a breeding program based on WUE, it was agreed to judge if the genetic variation of WUE observed on young cuttings, were still expressed on trees cultivated in poplar plantation on contrasted soils. In addition, in order to initiate a study of the molecular determinism of WUE, we evaluated the degree of genetic variation in the leaf proteome of eight poplar genotypes contrasted for their WUE and cultivated under varied water supply.

Our work evidenced consistent genetic variations of WUE in poplars cultivated in a commercial plantation. However, the type of cultivated soil modified considerably the genotypic ranking, whereas ranking established on the most favourable soils for poplar growth, remained comparable with the one described previously in greenhouse. Our experiments also validated the possibility of distinguishing genotypes contrasted for WUE from their leaf proteome. We showed that leaf proteome of eight poplar genotypes differing by their WUE displayed consistent genetic variations in their drought response and that there were relationships between leaf protein abundances and genetic variations of WUE.

Keywords: Poplar, water-use efficiency, carbon isotope discrimination, genetic variation, drought, leaf proteome, two-dimensional electrophoresis, molecular plasticity, net CO₂ assimilation, stomatal conductance, RuBisCO