



**HAL**  
open science

# Caractérisations biologique, physiologique et moléculaire de la déshydratation des embryons somatiques et zygotiques de mélèze. Analyse des conséquences en termes de la qualité des graines.

Parisa Savane

## ► To cite this version:

Parisa Savane. Caractérisations biologique, physiologique et moléculaire de la déshydratation des embryons somatiques et zygotiques de mélèze. Analyse des conséquences en termes de la qualité des graines.. Sciences agricoles. Université d'Orléans, 2023. Français. NNT : 2023ORLE1029 . tel-04412252

**HAL Id: tel-04412252**

**<https://theses.hal.science/tel-04412252>**

Submitted on 23 Jan 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

**ÉCOLE DOCTORALE SANTE, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT**

**INRAE Centre Val de Loire**

**Unité Biologie intégrée pour la valorisation de la diversité des arbres et de la forêt**

**THÈSE** présentée par :

**Parisa SAVANE**

soutenue le : **19 octobre 2023**

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

Discipline/ Spécialité : **Biologie**

**Caractérisations biologique,  
physiologique et moléculaire de la  
déshydratation des embryons  
somatiques et zygotiques de mélèze.  
Analyse des conséquences en termes  
de la qualité des graines.**

**THÈSE dirigée par :**

**Marie-Anne LELU-WALTER**

Directrice de Recherches, INRAE Orléans

**THÈSE co-dirigée par :**

**Caroline TEYSSIER**

Chargée de Recherches (HDR), INRAE Orléans

**RAPPORTEURS :**

**Philippe LABEL**

**Olivier LEPRINCE**

Directeur de Recherches, INRAE Clermont-Ferrand

Professeur à l'Institut Agro Rennes-Angers, IRHS Angers

**JURY :**

**David BRETON**

**Eric LATRILLE**

**Stéphane MAURY**

Manager de Recherche, Centre R&D Nestlé Notre Dame d'Oé

Ingénieur de Recherche, INRAE Narbonne

Professeur des Universités, Université d'Orléans, président du jury



# Remerciements

Je remercie la Région Centre Val-de-Loire pour le financement de cette thèse.

Je remercie le département ECODIV et mon unité BioForA pour m'avoir alloué une aide pour la récupération des mois de thèse perdus suite à la Covid.

Je remercie Marc Villar et Leopoldo Sanchez-Rodriguez pour m'avoir accueillie au sein de BioForA.

Je remercie les membres de mon jury qui m'ont apporté un nouveau regard sur mon travail et qui m'ont permis de parfaire cette thèse.

Un grand merci à Marie-Anne Lelu-Walter qui a su me transmettre sa passion pour l'embryogenèse somatique, mais aussi sa rigueur dans l'exécution de son travail. Merci pour votre grand cœur et toutes les attentions que vous m'avez portés. Les mots ne sont pas suffisants pour exprimer ma reconnaissance. Le destin a décidé que nos chemins se croiseraient et notre collaboration a été plus que riche et fructueuse.

Merci à Caroline Teyssier, ton soutien et ta bienveillance tout au long de mon parcours ont été des biens très précieux. Tu as été une source de nouvelles connaissances tant au niveau scientifique qu'au niveau artistique et culinaire. Cette année 2023, tu as obtenu ton HDR et sans nul doute que ton futur étudiant gardera de bons souvenirs de ta formation et de ta personne comme cela est le cas pour moi.

Merci à l'IEB en République Tchèque, en particulier Kateřina Eliášová et Martin Vágner, qui m'ont accueilli durant mon séjour de 2 semaines. Merci pour leur expertise et leur aide précieuse. Merci également à toutes les personnes qui ont rendu ce séjour possible. Ce séjour a été riche scientifiquement et m'a appris à connaître les richesses du pays et du cœur de ces citoyens. Děkuji

Merci à Nassim, Nathalie, Armelle de la plateforme Phénobois, votre aide m'a été précieuse. Nos discussions m'ont toujours donné le sourire. Beaucoup de choses m'ont marqué chez vous, mais si je devais choisir, Nassim, tu représentes le partage et le dévouement, Nathalie à la fois douce et pétillante, tu es le professionnalisme et la ténacité, et enfin Armelle, tu as toujours veillé à ma sécurité et à mon bien-être, merci à vous !

Merci à Céline, ta douceur et ton calme sont vraiment des qualités que j'ai beaucoup appréciées. Tu as été présente pour me former, mais aussi pour me soutenir. Ta gentillesse me manquera beaucoup.

Je remercie également Patricia, tu as été présente depuis mon arrivée. Tu m'as fait rire, mais tu m'as également touché. Tu as toujours été un soutien et tu as pris soin de moi comme l'aurait fait un membre de ma famille. Je ne te l'ai jamais dit, mais je te l'écris à présent, Patricia, tu auras à jamais une place dans mon petit cœur.

Merci à ma famille, mon père, ma mère, qui m'ont toujours soutenu et aidé dans chacun des moments de ma vie. Vous m'avez toujours poussé à croire en moi et à repousser mes limites.



Merci à Orlane, ma copine, ma confidente. Tu m'as apporté beaucoup de joie durant ces années de thèse et j'espère que notre amitié perdurera malgré le temps, malgré la distance, malgré le silence. Nos discussions ont été joyeuses, rigolotes, remplies de rêves et d'espoir, mais aussi parfois tristes. Néanmoins, nous nous sommes toujours épaulées l'une l'autre et je te remercie d'avoir été présente dans les moments importants et difficiles.

Merci à Alexis, nous avons partagé beaucoup, des rires, des larmes, des repas, des parties de jeux-vidéos et j'en passe... Tu as été un soutien précieux durant cette thèse en particulier dans les moments critiques. Tu m'as toujours aidé sans même que j'ai à te le demander. Cela ne semble pas être grand-chose, mais tu as réussi à rendre mes journées plus sereines. Merci. Et que ça dure !

Je remercie aussi mes amis, mes collègues qui m'ont soutenu, aidé aussi bien scientifiquement, administrativement et moralement. Je tiens à citer, Karine, Thibault, Véronique mes collègues doctorants et post-doctorants, mes collègues de GBFOR, de l'ONF.

Merci à toutes les personnes qui ont tout au long de ma vie, ma scolarité, ma formation professionnelle, fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

Enfin merci à toi Raven, mon inconditionnelle partenaire.

# Table des matières

Table des matières .....	0
Abréviations.....	1
Introduction générale.....	3
Chapitre I – Etat de l’art.....	5
I.1. Le mélèze .....	5
I.1.1. Classification phylogénétique, espèces, hybrides .....	5
I.1.2. Distribution et habitat du mélèze .....	5
I.1.3. Caractéristiques botaniques et utilisations du mélèze .....	7
I.2. Reproduction sexuée chez les gymnospermes : comparaison des évènements de fécondation entre gymnospermes et angiospermes.....	10
I.2.1. Appareils reproducteurs .....	11
I.2.2. Pollinisation .....	11
I.2.3. Fécondation.....	11
I.3. Evènements physiologiques au cours du développement de la graine de conifère .....	13
I.3.1. Embryogenèse <i>sensu stricto</i> .....	13
I.3.1.1. La proembryogenèse .....	13
I.3.1.2. L’embryogenèse précoce.....	14
I.3.1.3. L’embryogenèse tardive.....	15
I.3.2. Maturation .....	15
I.3.2.1. Accumulation des réserves .....	15
I.3.2.1.1. Lipides .....	16
I.3.2.1.2. Protéines .....	16
I.3.2.1.3 Glucides .....	17
I.3.2.2. Déshydratation des graines orthodoxes.....	17
I.3.2.3. Acquisition de la tolérance à la déshydratation .....	18
I.4. Programme d’amélioration du mélèze.....	20
I.4.1. Amélioration du mélèze par approche intraspécifique .....	20
I.4.2. Amélioration du mélèze par hybridation interspécifique .....	20
I.4.3. Vergers à graines de mélèze.....	21

---

I.4.4. Reproduction asexuée chez le mélèze : les méthodes de multiplication végétative .....	22
IV.4.1. Le bouturage horticole .....	22
IV.4.2. L'embryogenèse somatique.....	23
IV.4.2.1. Initiation (Figure I.14-A).....	26
IV.4.2.2. Multiplication des masses embryogènes (Figure I.14-B).....	26
IV.4.2.3. Cryoconservation des masses embryogènes .....	26
IV.4.2.4. Maturation des embryons somatiques (Figure I.14-D) .....	27
IV.4.2.5. Déshydratation des embryons somatiques .....	27
IV.4.2.6. Germination des embryons somatiques et développement en plant (Figure I.14-E) .....	32
IV.4.2.7. Acclimatation et transfert sur le terrain (Figure I.14-F).....	32
IV.4.2.8. Place de l'embryogenèse somatique dans les programmes d'amélioration du mélèze (Figure I.13).....	32
I.5. Méthodologies employées dans la thèse .....	34
I.5.1. Etude histologique chez les ES de conifères.....	34
I.5.2. Etude du profil des phytohormones chez les ES de conifères.....	35
I.5.3. Protéomique en ES et graines de conifères .....	35
I.5.4. Développement de modèles de prédiction en spectrométrie infrarouge pour la caractérisation des ES et des graines .....	36
I.6. Problématique et objectifs de la thèse .....	38
Références.....	40
Chapitre II – Caractérisations biologique et biochimique de la maturation des embryons somatiques de mélèze hybride .....	50
II.1. Publication .....	52
II.2. Caractérisation biologique des ES cotylédonaire de mélèze hybride au cours de leur maturation .....	70
II.2.1. Résultats complémentaires .....	70
II.2.2. Discussion .....	73
Conclusions du chapitre II.....	74
Références.....	76
Chapitre III – Comparaison des embryons somatiques <i>versus</i> embryons zygotiques en regard de leurs réserves. Essais de traitements pour améliorer l'accumulation des RFO.....	81

---

III.1. Comparaison des réserves des ES de 8 semaines par rapport aux EZ issus de graines récoltés à différents stades de maturité.....	84
III.1.1. Résultats .....	84
III.1.2. Discussion .....	86
III.2. Essai d'amélioration de l'accumulation des RFO des ES de 8 semaines par renouvellement du milieu de culture .....	89
III.2.1. Résultats .....	89
III.2.2. Discussion .....	93
III.3. Essai d'amélioration de l'accumulation des RFO par traitement des ES à basse température.....	96
III.3.1. Résultats .....	96
III.3.2. Discussion .....	101
Conclusion du chapitre III.....	103
Références.....	104
Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride <i>Larix x eurolepis</i> .....	109
IV.1. Etude des effets de la température de déshydratation sous forte humidité relative .....	112
IV.1.1. Résultats complémentaires .....	112
IV.1.2. Discussion.....	115
IV.2. Publication .....	118
Summary.....	118
Abbreviations .....	119
Introduction .....	119
Material and methods.....	121
Plant material .....	121
Desiccation treatment.....	122
Germination and plantlet obtention.....	122
Water content .....	122
Histological analysis .....	122
Carbohydrates and starch .....	123
Phytohormone analysis .....	124
Proteomic analyses .....	124
Statistical analyses .....	124

---

Results .....	125
Biological characteristics of SE after desiccation treatments.....	125
Histological observations.....	128
Carbohydrates profiles of SE after the application of desiccation treatments..	132
Phytohormones analyses .....	134
ABA and its derivatives .....	134
Phenolics - PAA and PAAM, SA, BzA.....	137
Auxins .....	139
Cytokinins .....	141
Proteomic .....	144
Discussion.....	147
Desiccation under different percentage of RH reduce the level of water content and affect germination and plant conversion in hybrid larch SE. ....	147
Desiccation of hybrid larch SE triggers desiccation tolerance by inducing changes in carbohydrate profile .....	148
Modifications of phytohormone profile .....	150
Desiccated SE showed differential regulation of protein expression depending on the treatment RH .....	152
References.....	227
Conclusions du chapitre IV .....	234
Références.....	236
Chapitre V – Caractérisation de la maturation des graines de mélèze en vue d’une récolte précoce .....	244
Publication .....	247
Abbreviations .....	247
Introduction .....	247
Materials and methods.....	249
Plant material .....	249
Dry weight, water content and water activity measurement ( $A_w$ ) .....	250
Determination of soluble carbohydrates, starch, total protein and total lipid contents.....	250
Proteomic study.....	251
Multivariate analysis of spectral data.....	252
Gene Ontology (GO) analysis .....	252

---

Germination trial and measurement of growth.....	252
Spectral acquisition .....	252
Spectral pre-processing.....	253
Correlation between climatic variables and biochemical data .....	253
Statistical analyses.....	253
Results.....	253
Question 1: What happens during the end of seed maturation, before or after drying?.....	253
Question 2: What are the biochemical and molecular changes in response to the drying of seeds? .....	263
Question 3: What is the optimal harvest date? .....	264
Question 4: What impacts of weather on seed maturity? .....	268
Discussion.....	269
Question 1: What happens during the end of seed maturation, before or after drying?.....	269
Question 2: What are the biochemical and molecular changes in response to the drying of seeds? .....	270
Question 3: What is the optimum seed harvest date? and how to define it? ...	271
Question 4: What impacts of weather on seed maturity? .....	274
Author Contributions .....	274
Acknowledgments.....	274
Data availability statement .....	275
Mid-IR data supporting the findings of this study are available from the corresponding author on request. ....	275
References.....	275
Conclusions du chapitre 4.....	300
Références.....	301
Chapitre VI – Perspectives .....	307
VI.1. La déshydratation des ES : analyses complémentaires pour une meilleure compréhension du processus et pour un développement optimal des plants .....	307
VI.2. La transcriptomique pour compléter la protéomique : une approche holistique vers une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la déshydratation .....	308

---

VI.3. La spectrométrie infrarouge : un outil performant de caractérisation aux multiples utilisations .....	309
VI.3.1. Pour la caractérisation des graines forestières sur le terrain .....	309
VI.3.2. Pour un tri rapide et précis des ES produits en bioréacteur .....	310
VI.4. Étude du développement des plants <i>ex vitro</i> : analyse de l'impact des traitements de déshydratation et comparaison avec des semis.....	311
Références.....	313
Références .....	316
Annexes.....	341
Annexe 1. Milieux de culture en embryogenèse somatique du mélèze hybride..	341
Annexe 2. Poster: Graines et réserves, pour le meilleur et pour le SPIR.....	343

---

## Abréviations

2,4-D – Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique  
μM – Micromolaire  
7OH-ABA – 7-hydroxy-ABA  
9OH-ABA – 9-hydroxy-ABA  
ABA – Acide Absissique (Abscisic acid)  
ABA-GE – ABA-glucosylester  
ACP (PCA) – Analyse en composantes principales (Principal component analysis)  
AG – Acide gras  
AIB – Acide Indole Butyrique  
ANOVA – Analysis of variance  
RNA – Ribonucleic acid  
Aw – Activity of water  
BA – 6-Benzylaminopurine  
BP – Biological process  
BzA – Benzoic acid  
CK(s) – Cytokinin(s)  
DPA – Dihydrophaseic acid  
ERC – Embryonal root cap  
ES (SE) – Embryon(s) somatique(s) (Somatic embyo(s))  
EZ (ZE) – Embryon(s) zygotique(s) (Zygotic embryo(s))  
FCBA – Institut technologique chargé de la Forêt, de la Cellulose, du Bois-construction et de l'Ameublement.  
GO – Gene Ontology  
HPLC – High performance liquid chromatography  
HSP – Heat shock protein  
HR (RH) – Humidité relative (Relative humidity)  
IAA – Acide indole 3-acétique  
INRAE – Institut National de Recherche Agronomique pour l'Agriculture, l'alimentation et l'Environnement  
IR – Infrarouge (Infrared)  
IRSTEA – Institut national de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture  
kBP – Keyword of GO biological process  
KNN – K-Nearest Neighbour  
LC-MS/MS – Liquid chromatography-tandem mass spectrometry  
LEA – Late embryogenesis abundant protein  
LVs – Latent variables  
LW – Located weight  
MAAPRAT – Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche, de la Ruralité et de l'Aménagement du Territoire  
MEs – Masses embryogènes  
MF (FW) – Masse fraîche (Fresh weight)  
MM – Masse Moléculaire  
MS (DW) – Masse sèche (Dry weight)  
MSC – Multiplicative Scatter Correction



NADH – Nicotinamide adenine dinucleotide  
ONF – Office national des forêts  
PA – Phaseic acid  
PAA – Phenylacetic acid  
PAAM – Phenylacetamide  
PLS-DA – Partial least squares regression discriminant analysis  
PLS-R – Partial least squares regression  
PSV – Protein storage vacuoles  
PVPP – poly(vinylpyrrolidone)  
RAM – Root apical meristem  
RC – Récolte commerciale  
RFO – Raffinose family oligosacharides  
RMSECV – Root mean square error of cross validation  
RMSEP – Root mean square error of prediction  
ROS – Reactive oxygen species  
RuBisCo – Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase  
SA – Salicylic acid  
SAM – Shoot apical meristem  
SNV – Standard normal variate  
SDS – Dodécylsulfate de sodium  
SDS-PAGE – Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis  
TG – Triglycéride  
Wc – Water content

# Introduction générale

Parmi les conifères, le mélèze est l'une des essences la plus abondante dans l'hémisphère nord. Actuellement, il existe une dizaine d'espèces connues du genre *Larix* tels que *Larix decidua*, le mélèze d'Europe et *Larix kaempferi*, le mélèze du Japon. Le croisement interspécifique entre ces deux espèces est possible et donne lieu au mélèze hybride *Larix x eurolepis*. La variété REVE-VERT issue du croisement entre une mère européenne et un mélange de pollens issus de 12 pères japonais a été développée à l'INRAE. Cette variété a démontré des caractéristiques avantageuses (qualité du bois, croissance rapide, résistance au chancre) et représente de fait une variété particulièrement intéressante pour les améliorateurs. Cependant l'obtention de graines en grande quantité de l'hybride REVE-VERT et de mélèze en général est difficile (environ 3 à 10 graines pleines par cône, Kosiński 1987 ; Shearer, 1989 ; Owens et al., 1994). Par ailleurs, les variations de l'environnement (température, sécheresse) actuellement observées impactent négativement la reproduction des arbres en entraînant une baisse de leur fructification et une réduction de la qualité des graines récoltées (Lebourgeois et al., 2010). Tout cela limite, par voie de conséquences, l'obtention de plants. Pour y faire face et répondre au besoin en plants de mélèze, deux options sont envisagées (1) la multiplication végétative *in vitro* par embryogenèse somatique et (2) l'optimisation de la récolte des graines en respectant leur état de maturité. Pour mettre en œuvre ces alternatives, il est indispensable de s'intéresser à l'étape finale du développement de l'embryon à savoir la maturation, la déshydratation. Ces dernières jouent un rôle crucial sur la qualité finale et la germination des embryons somatiques (ES) et des graines. Ainsi, l'objectif de mon travail de thèse a été d'étudier la déshydratation chez le mélèze à travers 2 principaux axes de recherche :

- 1) La caractérisation biologique, biochimique et moléculaire de la réponse des ES à une déshydratation

Pour pallier au manque de graines et par conséquent au manque de plants, la multiplication végétative se révèle être une alternative intéressante. Parmi les méthodes de multiplication végétative, l'embryogénèse somatique permet une multiplication particulièrement performante des génotypes (Lelu-Walter et Pâques, 2009). En effet, cette méthode offre la possibilité de produire de manière illimitée des embryons. L'embryogenèse somatique chez le mélèze hybride a été réalisée avec succès depuis les années 90 (Klimaszewska, 1989 ; Lelu et al., 1994a, b) et a été depuis optimisée pour produire des ES de qualité (Lelu-Walter et Pâques, 2009). La qualité de l'ES peut être selon sa ressemblance avec l'embryon zygotique (EZ) et sa capacité à produire des plants. Ainsi, la morphologie et l'anatomie des ES de mélèze est identique à celle des EZ (von Aderkas et al., 2015). La qualité peut aussi être évaluée selon des critères biochimiques. Concernant les réserves protéiques, les ES de mélèze sont très proches des EZ (Teyssier et al., 2014). Néanmoins, une différence notable a été rapportée en regard de la teneur en eau qui est environ 25 plus élevée chez les ES comparativement aux EZ matures et déshydratés (Lelu et al., 1995). Pour permettre aux ES de se rapprocher des caractéristiques des EZ, il convient de trouver

une méthode de déshydratation adéquate. Par ailleurs, la déshydratation des ES permettrait d'améliorer la synchronisation, le taux de germination et le taux de conversion en plante (Roberts et al., 1990; Lelu et al., 1995). Pour déshydrater les ES sans conséquences néfastes sur leur survie et leur capacité germinative, il est nécessaire d'induire par un traitement adéquat, un stimulus permettant la synthèse de réserves spécifiques et nécessaires à la survie de l'embryon dans un état déshydraté. Ainsi, il a été question dans cette thèse d'étudier la réponse des ES à différents traitements de déshydratation par une approche d'analyse multi-échelle.

## 2) La caractérisation de graines récoltées à différents stades de maturité, avant et après séchage, en vue d'une récolte précoce des graines

L'avancée du printemps observée ces dernières années entraîne un murissement précoce des cônes et donc des graines de mélèze (Maity et al., 2023). Malgré cela, la date de récolte commerciale est fixée selon des contraintes logistiques et ne tient pas compte de ce facteur déterminant pour obtenir une récolte de graines de qualité en grande quantité. Des graines de qualité correspondent à des graines ayant suffisamment de réserves pour conduire à une capacité germinative élevée et l'obtention de plants vigoureux (Hampton, 2002). Pour contribuer à ce résultat, il convient de s'adapter aux variations de l'environnement s'opérant. Une récolte précoce pourrait permettre d'anticiper et limiter les dommages causés par des conditions climatiques extrêmes ou des ravageurs, qui entraînent des pertes de graines importantes avant la récolte commerciale (Poncet, 2009). Pour cet objectif, l'enjeu est d'obtenir des graines de qualité au moins équivalente aux graines récoltées actuellement, tant au niveau de leurs réserves qu'au niveau de leur capacité germinative, et ce malgré une récolte précoce. Par ailleurs, durant la période de stockage post-récolte des cônes, un séchage des graines se produit. Durant ce processus des modifications au niveau des réserves, qui influencent la qualité des graines, sont mises en place. Les connaissances précises concernant la phase finale de maturation et les effets d'un séchage, au cours duquel les graines subissent une déshydratation, demeurent limitées en particulier chez les conifères. Ainsi, l'objectif a été de caractériser les modifications au cours de la maturation et du séchage des graines en regard de leur composition biochimique et leur qualité. La comparaison des caractéristiques des graines récoltées précocement, par rapport à des graines récoltées à la date de récolte commerciale actuelle, a permis de définir les conditions de récolte à respecter pour garantir cette qualité. Pour cette partie, l'étude a été réalisée chez des lots de graines de mélèze d'Europe et de mélèze hybride REVEVERT qui ont été récoltées à différents stades de maturité, avant ou après séchage durant 8 années consécutives.

Ces deux approches sont originales et innovantes par les analyses multi-échelles proposées, et par les techniques performantes mises en œuvre. Ce travail a permis une meilleure connaissance fondamentale des mécanismes biochimiques et moléculaires liés à la déshydratation des ES et des graines et nous a aidé à progresser vers l'obtention de matériel de qualité. Par ailleurs, grâce au travail réalisé dans cette étude, nous avons été capables de proposer de nouveaux outils pour la caractérisation rapide de matériel forestiers (Savane et al., 2023).

# Chapitre I – Etat de l’art

## I.1. Le mélèze

### I.1.1. Classification phylogénétique, espèces, hybrides

Le mélèze est une gymnosperme faisant parti de l’ordre des Pinales et de la famille des Pinacées (Figure I.1) (Cole et al., 2022). Les Pinacées comprennent 12 genres différents dont le genre *Larix* auquel appartient le mélèze. Il existe une dizaine d’espèces connues du genre *Larix*. Plusieurs croisements naturels et artificiels entre différentes espèces du genre *Larix* ont été signalés dans le monde (Wright, 1976 ; MacGillivray, 1967). L’hybridation interspécifique entre le mélèze d’Europe (*Larix decidua*) et le mélèze du Japon (*Larix kaempferi*) constitue le croisement le plus important au niveau économique et le plus utilisé dans les programmes d’amélioration (Pâques, 1989). L’hybride résultant de ce croisement (*Larix x eurolepis*) a été décrit pour la première fois par Henry et Flood en 1919 (Henry et Flood, 1919).

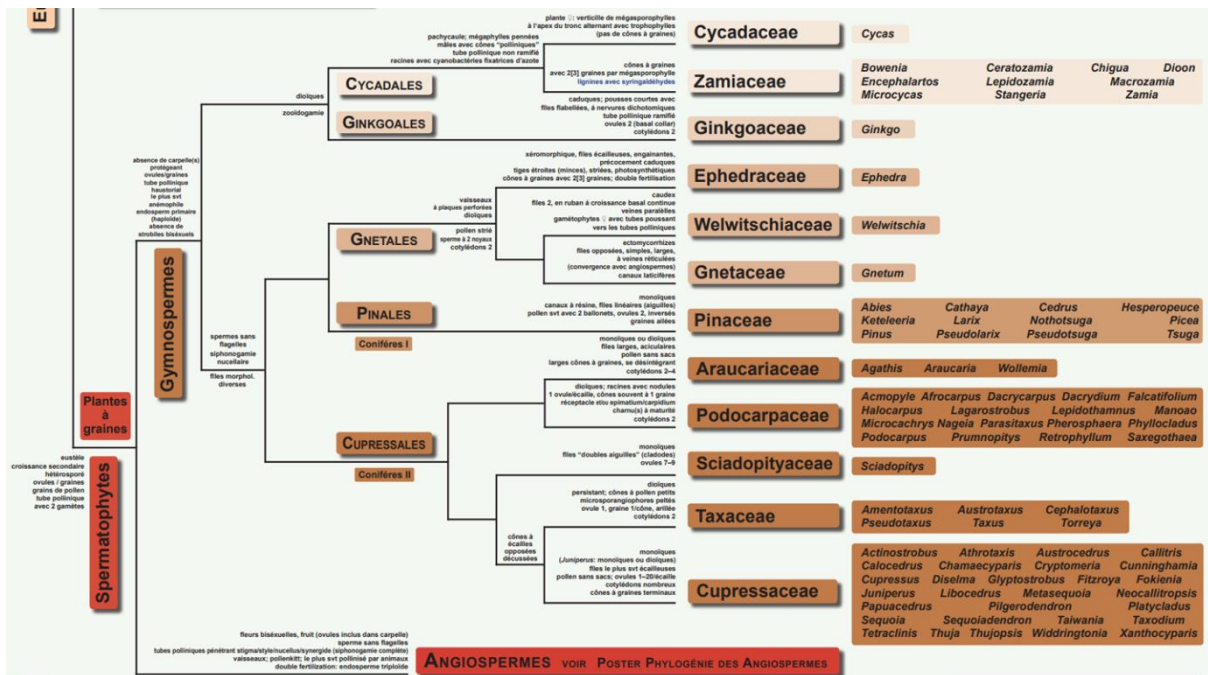


Figure I.1. Arbre phylogénétique des spermatophytes, adapté de Cole et al. (2022).

### I.1.2. Distribution et habitat du mélèze

Parmi les conifères, le mélèze est l’une des essences la plus abondante dans l’hémisphère nord. Son aire de répartition s’étend sur 3 continents : l’Europe, l’Asie et l’Amérique (Figure I.2). Par ailleurs, l’aire du mélèze a été largement étendue grâce à la plantation et la culture de cette essence dans des zones en dehors de son aire de distribution naturelle, produisant ainsi 900 000 hectares supplémentaires de mélèzin. Au total, la surface couverte par les mélèzes représente environ 1,5 à 1,6 millions d’hectares (4% de la surface totale couverte par les conifères soit 1% de l’aire

forestière totale d'Europe). Le mélèze est une espèce de montagne poussant à des altitudes comprises entre 1200 et 2400 mètres. C'est une espèce pionnière ayant besoin de croître sur un sol profond, bien drainé et aéré et qui se plaît dans des aires ensoleillées. En Europe, une seule espèce indigène a été décrite c'est *L. decidua* qui est distribuée naturellement dans les chaînes de montagne des Alpes, des Sudètes et des Carpathes avec une prédominance dans les Alpes (Figure I.3). Cette espèce *L. decidua* est principalement utilisée pour le reboisement en Europe (Pâques et al., 2013). Néanmoins d'autres espèces de mélèze sont aussi exploitées comme *L. kaempferi* qui est appréciée dans des zones au climat plus océanique tandis que *L. sibirica* plus résistant aux basses températures est principalement planté en Scandinavie (Pâques et al., 2013). L'hybride interspécifique *Larix x eurolepis* a été introduit avec succès dans le nord-ouest de l'Europe (Pâques et al., 2013).



Fig 2.1 Natural area of distribution of the ten species:  
 1=*L. laricina*, 2=*L. occidentalis*, 3=*L. decidua*, 4=*L. sibirica*, 5=*L. gmelinii*,  
 6=*L. potanii*, 7=*L. griffithiana*, 8=*L. kaempferi*, 9=*L. mastersiana*, 10=*L. lyallii*

Figure I.2. Aire de répartition naturelle de dix espèces de mélèze (Bergstedt et Lyck, 2007).

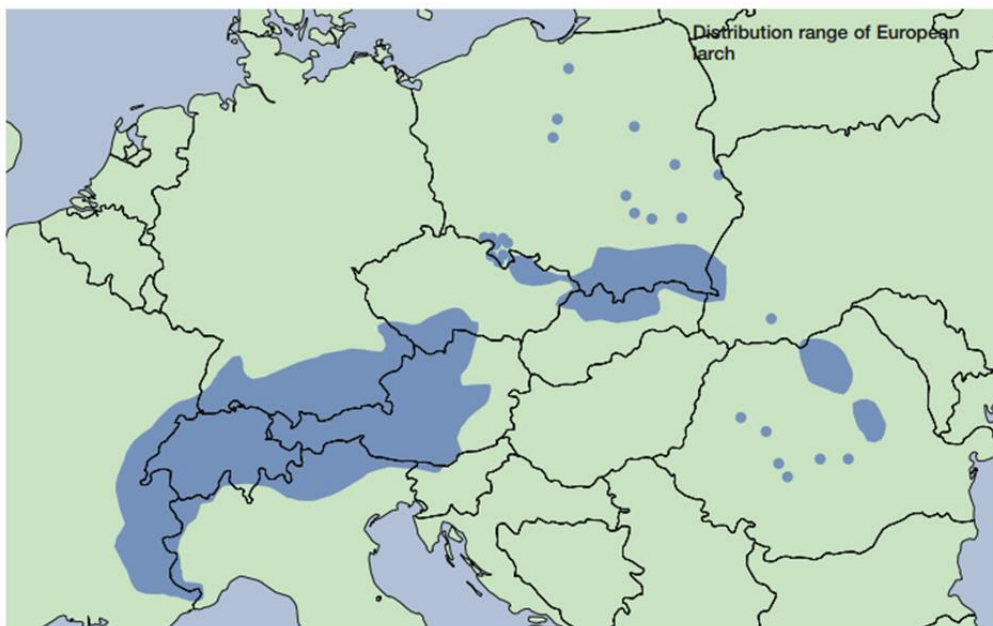


Figure I.3. Aire de répartition naturelle (bleu) du mélèze d'Europe en Europe. (EUFORGEN, 2008).

### I.1.3. Caractéristiques botaniques et utilisations du mélèze

Pouvant atteindre jusqu'à 40 mètres de hauteur et 1,5 mètre de diamètre, le mélèze a une longévité moyenne de 300 à 400 ans. Il atteint le stade de maturité sexuelle vers l'âge de 10-15 ans. Sa croissance est rapide les premières années puis lente les années suivantes. Le mélèze porte des rameaux tombants sur lesquels des aiguilles souples de couleur vert clair sont regroupées en bouquet de 20 à 40 aiguilles. Une particularité du mélèze est qu'il perd ses aiguilles chaque année à la fin de l'automne à la différence de la majorité des conifères (Figure I.4). Le tronc du mélèze est droit avec une écorce de couleur grisâtre à brune tirant sur le rouge sombre (Figure I.5-A). A l'état juvénile l'écorce du mélèze est lisse, puis au fur et à mesure de sa croissance elle se fend formant des plaques épaisses. Le mélèze bénéficie d'un des bois aux propriétés les plus estimées. En termes de densité, de dureté et de durabilité, le bois de mélèze surpasse les caractéristiques mécaniques des bois issus d'autres conifères (Bergstedt et Lyck, 2007). La partie la plus précieuse du bois de mélèze est le duramen qui est formé précocement et présent en grande quantité dès le stade juvénile. En plus de ses propriétés mécaniques avantageuses, la couleur rougeâtre du duramen, en raison de la présence d'une forte concentration de tanins et de composés phénoliques (Bergstedt et Lyck, 2007), fait de ce bois un des plus décoratifs et esthétiques (Figure I.5-B). Au niveau morphologique, les graines matures déshydratées de mélèze sont triangulaires et grisâtres (Figure I.6-A). Munie d'une aile membraneuse (Figure I.6-A et B) la dissémination de la graine par le vent en est facilitée. Une graine est constituée d'un embryon droit entouré par le tissu de réserve l'endosperme (Figure I.6-C), lui-même recouvert de plusieurs couches de tissus morts d'origine maternelle (nucelle et téguments) (Figure I.6-D).

Le mélèze est cultivé pour son bois qui est utilisé pour la construction de structures intérieures et extérieures en raison de son imputrescibilité (lambris pour murs ou sols, poteaux, ponts, toitures, bateaux, traverses de chemin de fer...). La résine de mélèze est utile pour le renforcement des structures dans la construction. Les industries tirent également profit des composés foliaires du mélèze. La manne de Briançon ou la térébenthine de Venise, extraites à partir des aiguilles de mélèzes, sont souvent utilisées comme liant et plastifiant pour des vernis. Dans le domaine pharmaceutique, les extraits d'aiguilles de mélèze sont utilisés en association avec l'eucalyptus en tant que baume, révulsif, expectorant et antiseptique. Bien que profitant à des domaines divers et variés, l'intérêt pour le mélèze se manifeste de manière régionale dans les zones montagneuses où cette essence est fortement présente dans l'économie locale. Dans le marché du plant forestier en France, le mélèze d'Europe se place en 10<sup>ème</sup> position des ventes avec 879 409 plants vendus en 2019, vient ensuite le mélèze hybride *Larix x eurolepis* en 13<sup>ème</sup> position avec 661 315 plants vendus et enfin le mélèze du Japon en 40<sup>ème</sup> position avec 31 386 plants vendus (Tableau I.1).



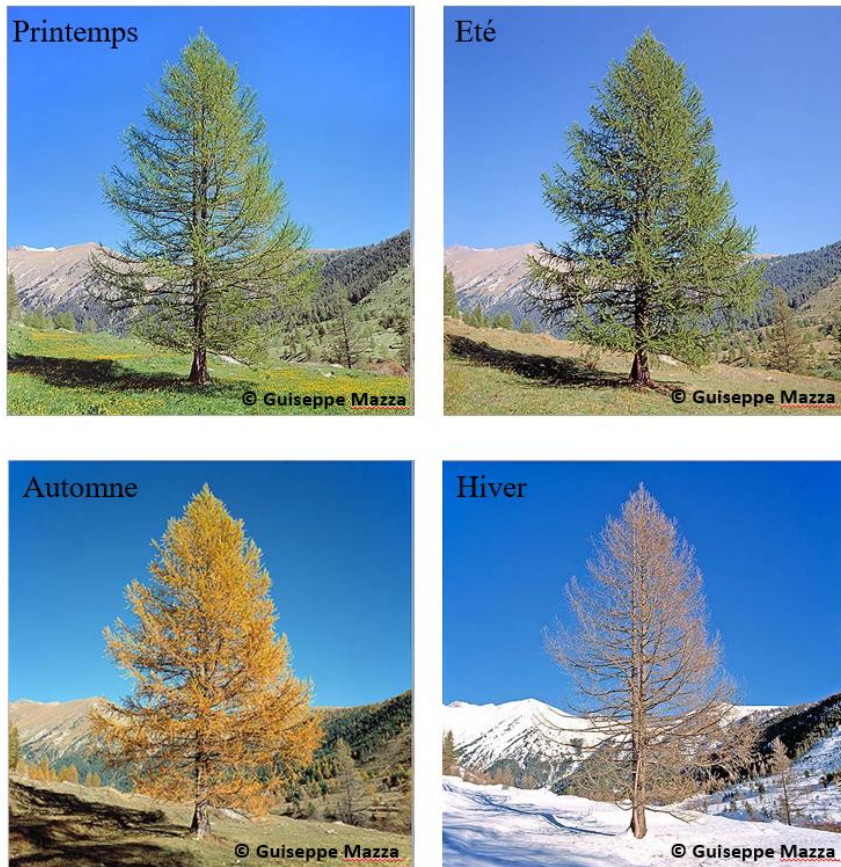


Figure I.4. Feuillage du mélèze au cours des saisons.



Figure I.5. Caractéristiques botaniques du mélèze. A : écorce ; B : section de tronc.

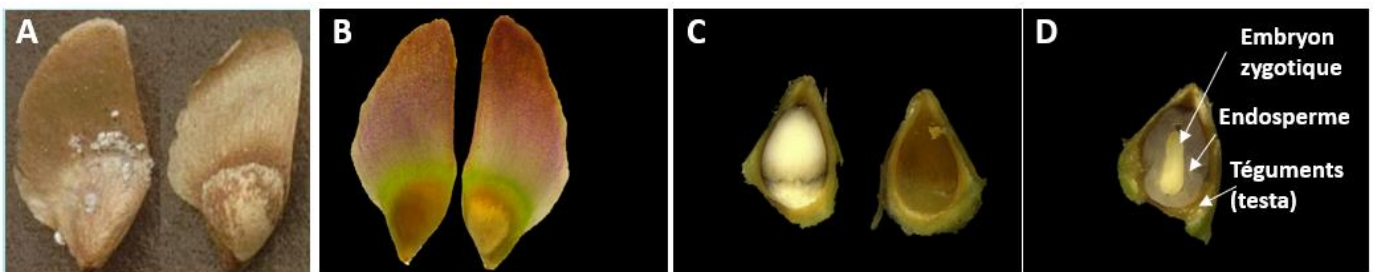


Figure I.6. Graine de mélèze mature déshydratée (A) et fraîche (B, C et D). C : Endosperme ; D : Anatomie de la graine.

Tableau I.1. Classement des espèces forestières les plus vendues en nombre de plants. Extrait des résultats de l'enquête statistique annuelle MAAPRAT/IRSTEA pour la campagne de 2019-2020.

Rang 2019-2020	Espèces les plus vendues (hors matériels destinés aux TCR)	Ventes en France 2019-2020	Rappel Ventes en France 2018-2019	Variation France	Export 2019-2020	Rappel Export 2018-2019	Variation Export	TOTAL ventes (France+Export) 2019-2020
1	Pinus pinaster	25 307 515	36 827 665	-31%	346 945	217 457	+60%	25 654 460
2	Pseudotsuga menziesii	11 950 465	11 256 840	6%	828 932	788 883	+5%	12 779 397
3	Quercus petraea	3 817 461	3 664 222	4%	19 587	10 444	+88%	3 837 048
4	Picea sitchensis	1 271 018	1 135 752	12%	285 100	642 275	-56%	1 556 118
5	Picea abies	1 165 077	2 020 352	-42%	93 350	85 124	+10%	1 258 427
6	Pinus taeda	1 072 888	2 148 726	-50%	0	12 787	-100%	1 072 888
7	Abies nordmanniana	991 633	1 176 621	-16%	219 275	378 982	-42%	1 210 908
8	Pinus nigra var. corsicana	948 724	822 635	15%	20 090	38 073	-47%	968 814
9	Peupliers clones( plancons)	929 727	912 559	2%	2 000	1 820	+10%	931 727
10	Larix decidua	863 829	846 353	2%	15 580	868	+1695%	879 409
11	Cedrus atlantica	767 901	528 928	45%	37 225	14 528	+156%	805 126
12	Robinia pseudoacacia	692 021	622 867	11%	2 600	19 998	-87%	694 621
13	Larix x eurolepis	646 289	1 044 562	-38%	15 026	128 600	-88%	661 315
14	Pinus sylvestris	543 073	530 588	2%	24 050	32 891	-27%	567 123
15	Quercus robur	479 133	458 274	5%	258 502	216 825	+19%	737 635



## I.2. Reproduction sexuée chez les gymnospermes : comparaison des évènements de fécondation entre gymnospermes et angiospermes

Le cycle de reproduction du mélèze se déroule sur une année et demi, en commençant au printemps de l'année  $n$  pour se terminer au printemps ou à l'automne de l'année  $n+1$  (Figure I.7). Des inflorescences mâles et femelles appelées strobiles sont présentes sur un même individu ce qui fait du mélèze une espèce monoïque. Les strobiles apparaissent dès la fin de l'hiver et vont grossir pour former des strobiles au début du printemps. Les fleurs mâles relarguent le pollen qui sera distribué aux fleurs femelles par l'action du vent. A l'issue de la fécondation, les fleurs femelles se développent en conelet. Une fois la maturité des cônes atteinte, leurs écailles s'écartent pour libérer les graines durant l'automne.

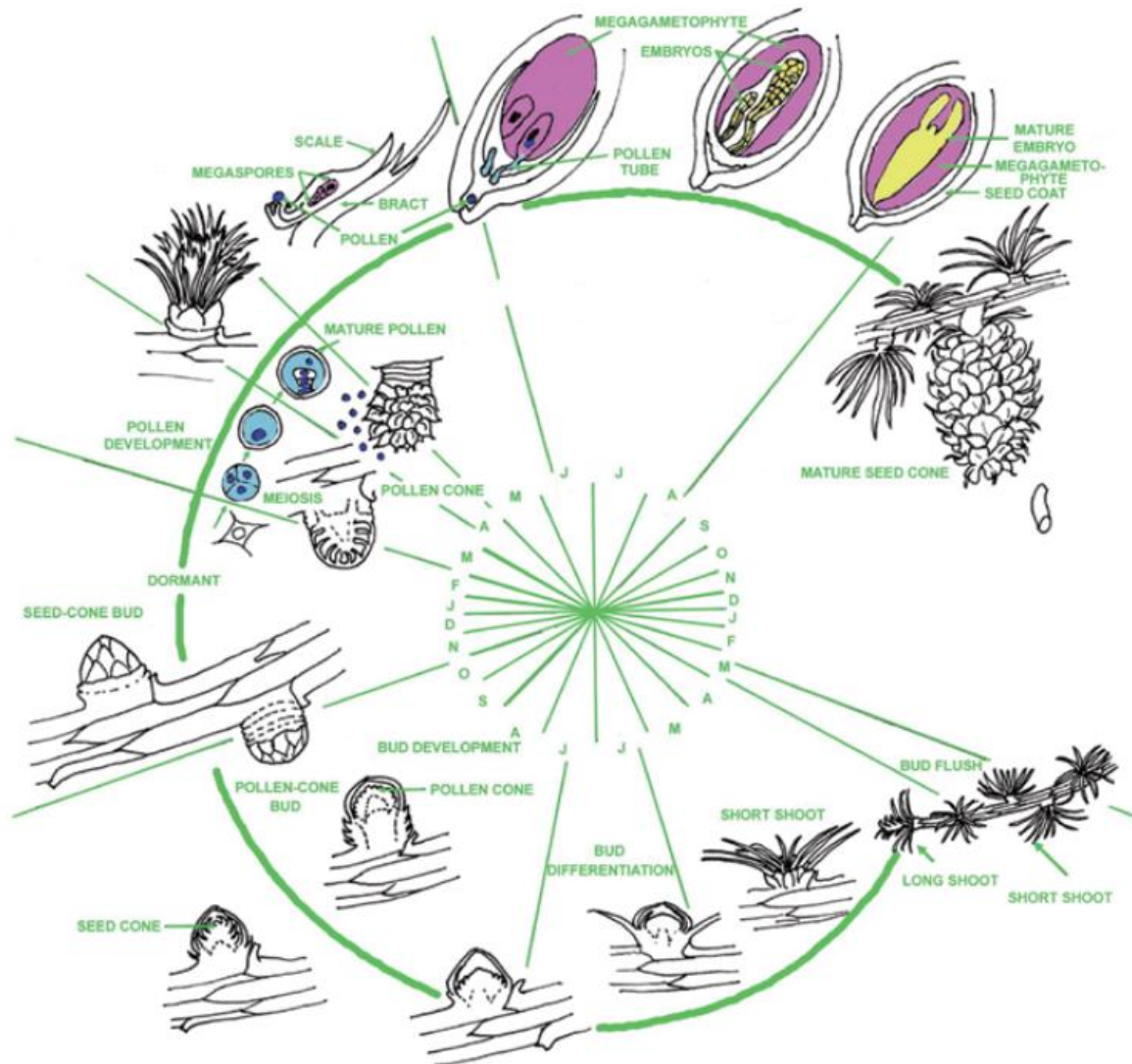


Figure I.7. Cycle de reproduction sexuée du mélèze (Owens, 2008).

### I.2.1. Appareils reproducteurs

Les fleurs constituent les appareils reproducteurs chez les angiospermes et les gymnospermes. Chez le mélèze une distinction morphologique peut être faite entre les fleurs mâles et les fleurs femelles (Figure I.8). Les fleurs mâles du mélèze sont de couleur jaunâtre, de petite taille (5-10 mm) et souvent pendantes au-dessous des rameaux de l'arbre. Chaque fleur est composée d'écailles serrées les unes aux autres et chaque écaille porte sur sa face inférieure des sacs polliniques contenant des microspores à l'origine des grains de pollen (Philippe et al., 2006). Les fleurs femelles du mélèze sont rouge carmin chez le mélèze d'Europe et blanchâtre/rosâtre chez le mélèze du Japon. Elles mesurent jusqu'à 2 cm et sont souvent dressées au-dessus des rameaux de l'arbre.

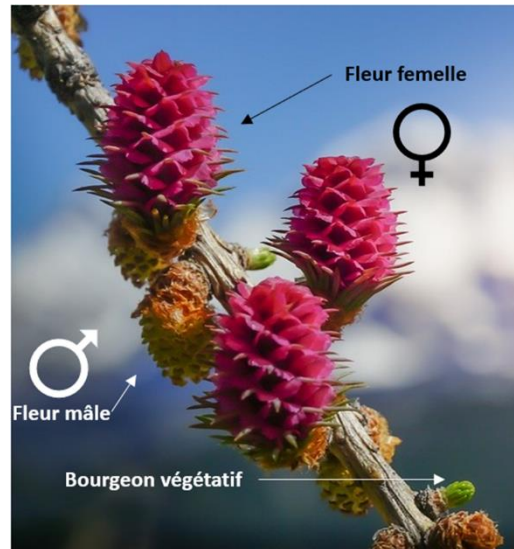


Figure I.8. Fleurs de mélèze d'Europe.

Les fleurs femelles sont constituées d'écailles ovulifères imbriquées les unes aux autres avec des bractées à leur extrémité. Chaque écaille ovulifère porte deux ovules nus (non enclos dans un ovaire), appelés oosphères, et deux cellules mères des mégaspores dont l'une formera quatre autres mégaspores haploïdes. L'oosphère évoluera en embryon après fécondation et l'un des quatre mégaspores se développera en endosperme, le tissu de réserve haploïde de la graine nommé megagametophyte en anglais.

### I.2.2. Pollinisation

Les conifères sont majoritairement anémophiles, autrement dit leur pollen est principalement disséminé par le vent. Naturellement, lorsque que les sacs polliniques des fleurs mâles sont arrivés à maturité, les sacs déhiscent s'ouvrent et relarguent les grains de pollen qui seront distribués vers les fleurs femelles (Koski, 1991). La période de réceptivité des fleurs femelles est brève et dépend des facteurs environnementaux (Said et al., 1991). La date de pollinisation est variable selon les espèces mais aussi en fonction du lieu, des années et des conditions météorologiques. Dans les vergers à graines français, la pollinisation des mélèzes se déroule à la fin de l'hiver, de février à mars. La pollinisation peut se faire naturellement, elle est alors désignée comme étant une pollinisation « ouverte ». Le second type de pollinisation, appelé pollinisation « contrôlée », nécessite obligatoirement une intervention humaine. La supplémentation pollinique effectuée manuellement ou mécaniquement permet de maximiser les chances de contact entre les grains de pollen et les fleurs femelles. Elle est indispensable en particulier pour l'obtention de graines de mélèzes hybrides étant donné le décalage phénologique de floraison entre le mélèze d'Europe et le mélèze Japonais.

### I.2.3. Fécondation

Chez le mélèze, la fécondation se déroule comme suit. Les gamètes mâles se séparent et l'un des deux migre pour fusionner avec l'oosphère et former le zygote tandis que l'autre gamète mâle va dégénérer (Owens et Molder, 1979). Par ailleurs,

chez les Pinacées il est commun d'observer de la polyembryonie simple (Philippe et al., 2006). Ce phénomène se manifeste quand plusieurs oosphères d'une même graine sont fécondées. D'abord, les proembryons qui sont génétiquement différents, car issus de différents événements de fécondation, se développent et cohabitent ensemble. Ensuite, l'un des embryons prend le dessus sur les autres qui à terme dégèrent. En parallèle le tissu de réserve de la graine, l'endosperme, continue de se développer. Ce tissu d'origine maternelle est haploïde. Chez le mélèze, dans le cas où aucune oosphère n'est fécondée, l'endosperme continue de se développer malgré l'absence de fécondation et cela résulte en une graine vide dont l'aspect morphologique ne diffère pas d'une graine pleine (Philippe et al., 2006). Pour les mélèzes, un à deux mois sont nécessaires entre la pollinisation et la fécondation (Owens et Molder, 1979) (Figure 9).

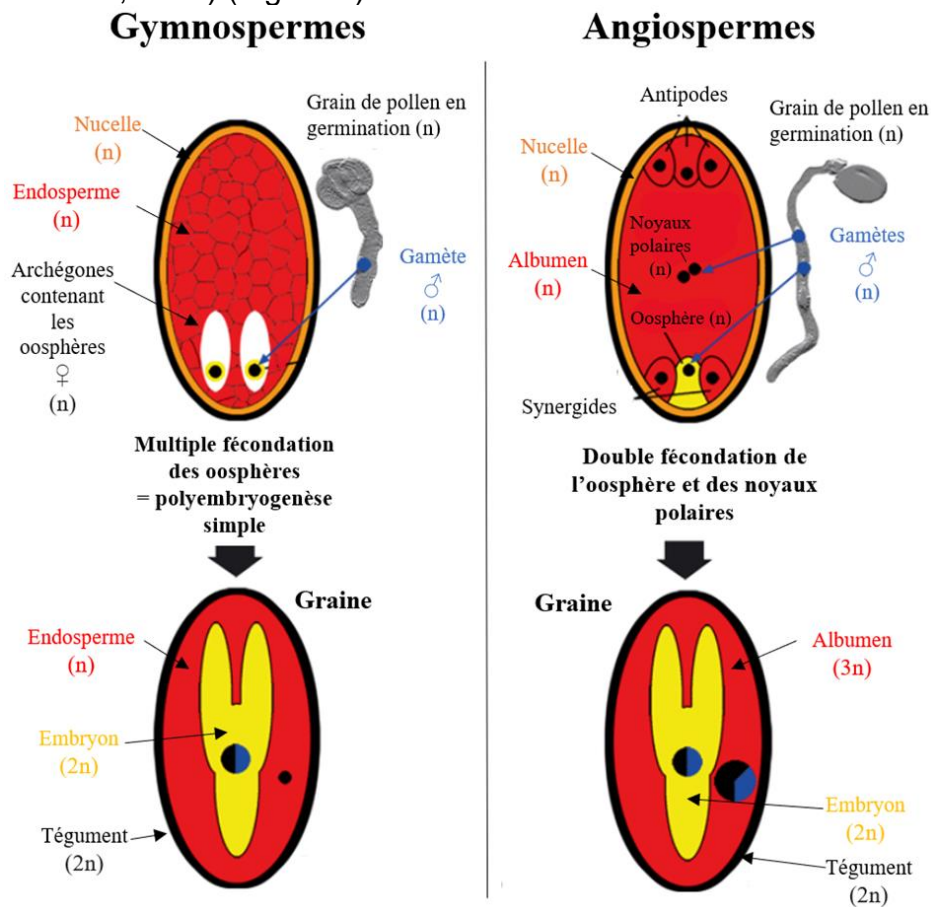


Figure I.9. Comparaison des événements de fécondation chez les gymnospermes et les angiospermes (Linkies et al., 2010)

### **I.3. Evènements physiologiques au cours du développement de la graine de conifère**

Le développement des graines comporte une succession d'étapes bien précises. Cela commence par l'embryogenèse *sensu stricto* qui consiste au développement de l'embryon par une série de divisions cellulaires. Ensuite la graine entre dans une phase de maturation caractérisée par l'accumulation de réserves (protéines, lipides, glucides). Cette phase prend fin lorsque l'embryon a accumulé toutes ses réserves et que son poids sec atteint son maximum. Ensuite, les graines orthodoxes se préparent à la phase de déshydratation en synthétisant des composés spécifiques pour permettre l'acquisition de la tolérance à la déshydratation. Cette phase de déshydratation est associée à une réduction importante de la teneur en eau préparant la graine à une période de quiescence. L'étape de déshydratation est une étape déterminante pour permettre la transition entre la maturation et la germination. Par ailleurs, il a été observé un pic d'acide abscissique (ABA) avant la déshydratation. Cette synthèse endogène pourrait jouer un rôle de signal pour initier l'acquisition de la tolérance à la déshydratation et ainsi permettre la déshydratation de la graine. Dans les paragraphes suivants, nous allons détailler ces différentes étapes principalement pour les graines de conifères.

#### **I.3.1. Embryogenèse *sensu stricto***

L'embryogenèse décrit le processus de développement et de différenciation de l'embryon depuis la fusion des gamètes jusqu'à l'acquisition de toutes ses cellules. Chez les gymnospermes le développement embryonnaire se déroule en 4 grandes phases (Singh, 1978):

- La proembryogenèse : étapes post-fécondation depuis la fusion des gamètes jusqu'à l'allongement du suspenseur.
- L'embryogenèse précoce : étapes pendant et suivant l'allongement du suspenseur mais avant établissement du méristème racinaire.
- L'embryogenèse tardive : mise en place des méristèmes racinaire et caulinaire, et développement de l'embryon jusqu'à la mise en place des cotylédons.
- La maturation : phase englobant l'accumulation des réserves jusqu'à la modification du métabolisme de l'embryon pour le préparer à la déshydratation et la germination.

##### **I.3.1.1. La proembryogenèse**

Suite à la fusion des gamètes, le zygote subit deux divisions successives donnant quatre noyaux libres. Ces noyaux vont ensuite migrer jusqu'à la base du proembryon pour former une couche unicellulaire (Figure I.10). Une division de chacun des quatre noyaux s'en suit pour former huit noyaux et former deux couches de cellules. Les deux couches de cellules formées se divisent et donnent quatre niveaux de cellules (von Aderkas et al., 1991) :

- le 1<sup>er</sup> niveau de cellules donnera l'embryon
- le 2<sup>ème</sup> niveau va donner la partie suspenseur. L'allongement du suspenseur marque la fin de la proembryogenèse.
- le 3<sup>ème</sup> niveau de cellules est dysfonctionnel chez le mélèze et va dégénérer. Chez d'autres gymnospermes c'est ce niveau de cellules qui formera le suspenseur primaire.



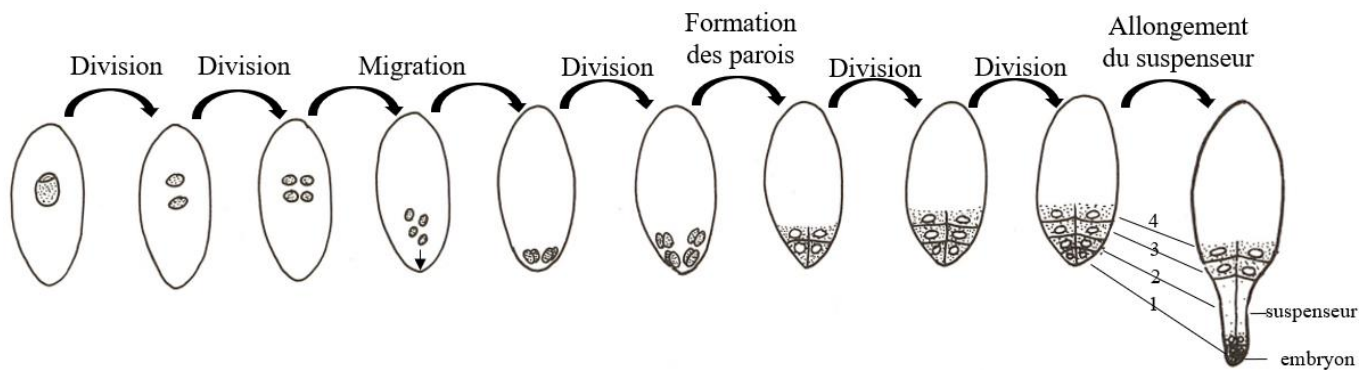


Figure I.10. Représentation schématique des étapes de la proembryogenèse chez le mélèze. 1 : 1<sup>er</sup> niveau de cellules (partie embryonnaire) ; 2 : 2<sup>ème</sup> niveau de cellules (partie embryonnaire qui va donner le suspenseur) ; 3 : 3<sup>ème</sup> niveau de cellules (suspenseur dysfonctionnel) ; 4 : 4<sup>ème</sup> niveau de cellules (partie supérieure secondaire) (adaptée de von Aderkas et al., 1991).

### I.3.1.2. L'embryogenèse précoce

L'embryogenèse précoce décrit les premières étapes de formation de l'embryon alors que le suspenseur s'allonge pour pousser l'embryon dans la cavité corrosive de l'endosperme. Par rapport au genre *Picea*, chez le genre *Pinus* les 4 cellules du premier niveau n'ont pas la même destinée. En effet, chacune de ces cellules se divise formant 4 embryons secondaires (Figure I.11-point 16). Ce processus est appelé polyembryogenèse de clivage (Dogra, 1978). Par la suite, l'un des 4 embryons devient dominant les 3 autres avortant (Figure I.11-point 18). Au stade dominant (Figure I.11-points 18, 22) l'embryon colonise la cavité corrosive où il continue son développement.

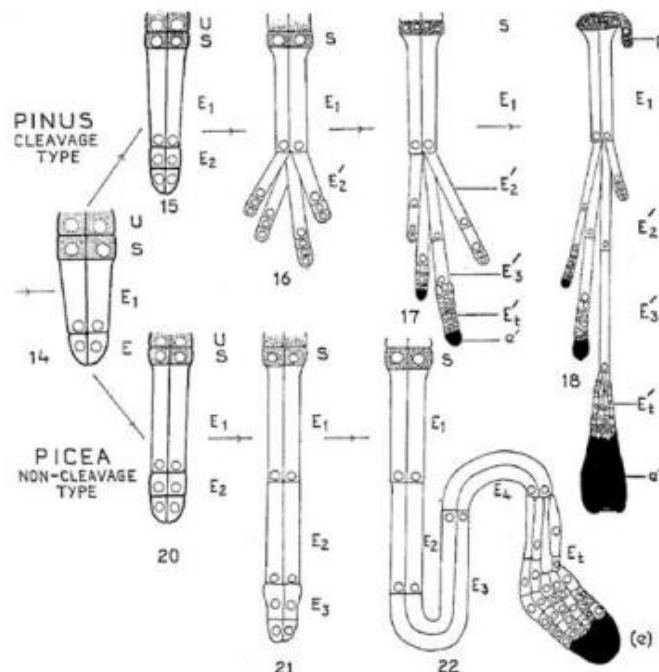


Figure I.11. Schéma montrant les étapes de l'embryogenèse précoce des conifères avec la polyembryogenèse de clivage (16-17) chez le genre *Pinus* et en absence de la polyembryogenèse de clivage chez le genre *Picea* (21-22) (Dogra 1978).

### **I.3.1.3. L'embryogenèse tardive**

L'embryogenèse tardive correspond à l'étape de mise en place des méristèmes apicaux. Le premier à se différencier est le méristème racinaire (von Aderkas et al., 1991). Il se forme à partir d'un primordium méristématique se trouvant dans la zone distale de la coiffe racinaire embryonnaire. Cette coiffe embryonnaire, qui sert de protection au méristème, est un organe spécifique des graines de conifères (embryonal root cap, von Aderkas et al., 2002b). Elle dégénère après la germination. Viens ensuite le développement du méristème caulinaire et la différenciation des cotylédons en couronne autour de ce dernier (Holloway et al., 2016). Chez les conifères, le nombre de cotylédons est variable pour une même espèce. Ainsi, chez le mélèze, l'embryon comporte de cinq à huit cotylédons.

### **I.3.2. Maturation**

La maturation des graines se caractérise par une succession d'étapes comprenant : l'accumulation des réserves, la synthèse de composés spécifiques à l'acquisition de la tolérance à la déshydratation, la déshydratation et éventuellement la mise en place de la dormance (Devic et Roscoe, 2016). Il existe deux types de graines : les graines orthodoxes, dont font parties les graines de mélèze, définies par leur capacité à tolérer une déshydratation à l'inverse des graines récalcitrantes (Finch-Savage, 2003). L'état déshydraté d'une graine lui permet de se conserver *in situ*.

#### **I.3.2.1. Accumulation des réserves**

La maturation *sensu stricto* des graines est définie par la phase d'accumulation des réserves. Cette étape est principalement sous le contrôle d'hormones végétales telles que l'ABA mais aussi de la teneur en eau (Coelho et Benedito, 2008). Cette phase est une période cruciale dans le développement d'une graine car elle conditionne la qualité de l'embryon et donc son développement ultérieur en plante. L'accumulation des réserves (protéines, lipides, glucides) se fait au niveau de l'endosperme (tissu nutritif) et des cotylédons de l'embryon (Coelho et Benedito, 2008). Chez le mélèze, les lipides et les protéines sont les principales réserves dans la graine ainsi que l'amidon retrouvé en grande quantité dans l'embryon. Les réserves déterminent en grande partie le poids de la graine qui est considéré comme un indicateur de la capacité germinative et par conséquent de la qualité de la graine (Gorian et al., 2007 ; Rajjou et al., 2012 ; Ghaffaripour et al., 2017). Durant la phase d'accumulation, le poids de la graine augmente progressivement jusqu'à atteindre son maximum puis la graine entre dans la phase de déshydratation (Figure I.12).

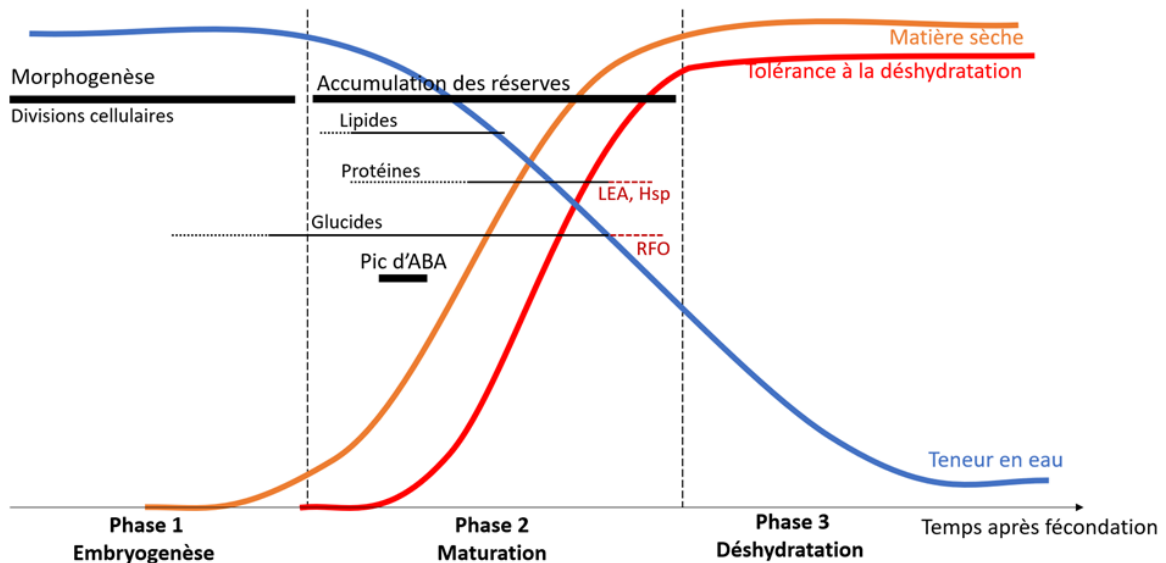


Figure I.12. Schéma des événements survenant pendant le développement des graines orthodoxes.

### I.3.2.1.1. Lipides

Les lipides de réserve, produits par glycolyse du saccharose, constituent une source importante de carbone et d'acides gras (AG) (Baud et al., 2008). Ils permettent la synthèse de glucides et sont nécessaires à la production d'énergie (Graham, 2008). Il existe différents types de lipides de réserve mais la majorité est sous forme de triglycérides (TG) (Baud, 2018). Les TG sont composés d'AG et permettent leur stockage. Ils s'accumulent au cours de la maturation (Voelker et Kinney, 2001) et contiennent plus de deux fois l'énergie contenue dans une masse équivalente de glucides ou de protéines (Xu et Shanklin, 2016). Les TG sont synthétisés *via* la voie Kennedy (Gurr, 1980) et s'accumulent dans le cytoplasme sous forme de gouttelettes lipidiques ou corps lipidiques. Ils sont généralement de petite taille (<1µm) et peuvent être retrouvés dans l'endosperme et l'embryon (Murphy, 1990). La teneur et le profil de lipides dans une graine sont variables en fonction des espèces. Chez les espèces du genre *Larix*, la teneur en lipides rapportée au poids des graines varie entre 30-50 % du poids sec (Grigová et al., 2007). Les compositions en AG de plusieurs espèces du genre *Larix* ont été bien décrites (Wolff et al. 2001). Dans ces études les différentes espèces du genre *Larix* présentent de grandes similitudes de la composition en AG mais avec des abondances différentes. Les AG majoritaires chez les espèces de *Larix* sont l'acide linoléique, l'acide pinolénique et l'acide oléique.

### I.3.2.1.2. Protéines

Les protéines de réserve dans la graine constituent une source majeure d'acides aminés et d'azote qui sont indispensables à la germination et aux premières étapes de développement de la plante. Chez *Pinus pinaster*, la teneur en protéines a été corrélée de manière positive à la capacité germinative des graines (Wahid et Bounoua, 2013). Chez les angiospermes, les protéines de réserves majeures identifiées sont les albumines et les globulines elles-mêmes subdivisées en 2 sous-catégories, les vicilines et les légumines (Fujiwara et al., 2002). Chez les gymnospermes, les globulines représentent la majorité des protéines de réserve (Hakman et al., 1990; Flinn et al., 1993; Lelu-Walter et al., 2008; Teyssier et al., 2011; Morel et al., 2014b). La proportion de ces différentes formes de protéines est variable en fonction des

espèces. Chez *Pinus pinea*, les globulines et les albumines constituent respectivement 75 % et 15 % des protéines totales de la graine alors que chez *Pinus pinaster*, les globulines représentent 26 % des protéines totales et les albumines 4 % (Allona et al., 1992 ; Nasri et Triki, 2007). Les protéines de réserve sont localisées dans des vacuoles de stockage appelées corps protéiques qui peuvent être retrouvés dans tout l'embryon et l'endosperme (Krasowski et Owens, 1993 ; Jolliffe et al., 2005).

### **I.3.2.1.3 Glucides**

Les glucides solubles peuvent être divisés en 2 principaux groupes, les oligosaccharides et les polysaccharides. Les oligosaccharides possèdent un nombre déterminé d'unités osidiques et sont des glucides solubles. Les polysaccharides sont composés d'un nombre indéterminé de monosaccharides, l'amidon fait partie de ce type de glucide. Les oligosaccharides les plus abondants dans la graine sont le saccharose, le fructose, le glucose et les RFO. Le saccharose est un disaccharide composé de 2 monosaccharides, le fructose et le glucose. Les glucides simples (glucose, fructose, galactose) sont accumulés pendant la maturation *sensu stricto* (Figure I.12), puis en allant vers la phase de déshydratation, ces glucides simples disparaissent progressivement tandis que la teneur en glucides complexes (saccharose, raffinose, stachyose) augmente (Lipavská et Konrádová, 2004 ; Smolikova et al., 2020).

Les glucides solubles sont d'importantes molécules possédant plusieurs rôles. Ils servent de source d'énergie et de squelettes carbonés immédiatement disponibles pour le métabolisme. Ils servent aussi à la régulation de la pression osmotique dans la cellule et à la régulation de l'expression des gènes. Durant la maturation des graines, ces glucides sont déterminants pour la protection contre les stress notamment lors de la tolérance à la déshydratation et au froid.

Parmi les polysaccharides l'amidon est une forme majoritaire de stockage des glucides dans les graines (Bewley et Black, 1994) et tient une place aussi importante que celle des glucides solubles. Il est composé d'unités de D-glucosyl reliées par des liaisons de type  $\alpha$ -(1,4) (Pérez et Bertoft, 2010). L'amidon, insoluble dans l'eau, est souvent retrouvé dans le cytoplasme sous forme de grains dont la taille et la forme diffèrent suivant les espèces, le stade de développement et le tissu dans lequel il est retrouvé (Jin et al., 2012). L'accumulation d'amidon se produit généralement à mesure que la graine atteint la fin de la période de croissance active et entre dans la phase de maturation. Chez *Ginkgo biloba* l'amidon s'accumule d'abord dans l'endosperme puis dans l'embryon (Jin et al., 2012). L'amidon sera par la suite hydrolysé pour être utilisé comme source de carbone et d'énergie pendant la germination et la croissance ultérieure de la plante (Cardemil et Reinerio, 1982 ; Tetlow, 2011).

### **I.3.2.2. Déshydratation des graines orthodoxes**

Lors de la déshydratation, de multiples changements se produisent pour préparer l'embryon à mieux supporter un état déshydraté, la réhydratation et pour la germination ultérieure. La déshydratation est caractérisée par une perte conséquente d'eau (jusqu'à 90% d'eau perdue) qui conduit l'embryon vers un état de quiescence (Kermode et Finch-Savage, 2002). Les graines déshydratées maintiennent un très faible niveau métabolique et de respiration qui préserve la viabilité de l'embryon ce qui permet une conservation de la graine jusqu'à de nombreuses années selon les espèces (Angelovici et al., 2010). Au fur et à mesure que la teneur en eau diminue, les cellules subissent des contraintes à la fois mécaniques et structurelles (Oliver et al., 2020). Les changements observés sont notamment la modification des structures des



membranes cellulaires, l'augmentation de la densité et de la viscosité du cytoplasme, des modifications dans l'organisation et la mobilité moléculaires ainsi que la modification de l'expression de gènes (Gonzalez-Morales et al., 2016 ; Kijak et Ratajczak, 2020). Dans le paragraphe suivant, les principaux événements aboutissant à la déshydratation de la graine seront présentés.

### **I.3.2.3. Acquisition de la tolérance à la déshydratation**

L'état fortement déshydraté de la graine orthodoxe nécessite que l'embryon soit préparé à subir ce changement physiologique drastique qui peut avoir des conséquences néfastes sur sa survie. Afin que l'embryon puisse se déshydrater, il doit préalablement acquérir une tolérance à la déshydratation (Angelovici et al., 2010). Celle-ci est acquise à l'aide de divers changements métaboliques et à de multiples processus cellulaires complexes comprenant l'accumulation de composés spécifiques, la protection des composants cellulaires contre les dommages liés à la déshydratation (Hoekstra et al., 2001a ; Oliver et al., 2001 ; Angelovici et al., 2010).

L'accumulation de glucides solubles permet la protection de la structure des membranes, des protéines et des autres structures cellulaires pendant la déshydratation de la graine (Koster et Leopold, 1988). Parmi les glucides complexes, le raffinose et le stachyose seraient responsables de la protection de l'intégrité des cellules. Les RFO, en association avec le saccharose, agissent en stabilisant les membranes cellulaires pendant la déshydratation. Le mode d'action de ces glucides spécifiques serait notamment le remplacement des molécules d'eau et la vitrification des fluides (Crowe et al., 1992 ; Leopold et al., 1994). Cet état de gel entraîne l'augmentation de la viscosité du cytoplasme résultant en la réduction de la mobilité des macromolécules (Buitink et Leprince, 2008). Par ailleurs, ce changement d'état va limiter la diffusion de l'oxygène et réduire considérablement les dommages oxydatifs. Les RFO et le saccharose auraient aussi un rôle dans la machinerie d'élimination des radicaux libres (Nishizawa et al., 2008).

Les modifications physiques et biochimiques dans la graine pendant la transition vers la déshydratation induisent la formation des ROS. Ces ROS peuvent interagir avec les composants cellulaires et peuvent notamment provoquer des dommages oxydatifs principalement des protéines et des lipides menant à une perte de fonction métabolique, un défaut au niveau de la membrane et parfois à la mort cellulaire (Gill et Tuteja, 2010). Pour pallier ces problèmes, il existe chez la graine différents systèmes d'action qui impliquent une multitude d'enzymes antioxydantes spécifiques et certains pigments antioxydants pour éviter la production accrue de ROS par la respiration cellulaire (Oliver et al., 2001 ; Bailly, 2004).

De grandes classes de protéines contribuent à la stabilisation et protection des composés cellulaires dans les graines sèches. Les LEA et les HSP comptent parmi celles qui sont les mieux décrites. Les LEA constituent une grande famille de protéines stables (Battaglia et al., 2008). Elles sont abondantes (4 % des protéines totales) et s'accumulent tardivement pendant la maturation et la déshydratation de la graine (Roberts et al. 1993). Après la germination, les LEA disparaissent. L'expression et l'accumulation des protéines LEA coïncident avec l'acquisition de la tolérance à la déshydratation (Oliver et al., 2001). Ces protéines en association avec d'autres composés assurent la stabilité moléculaire et cellulaire au sein du cytoplasme en inhibant la fusion des membranes, la dénaturation des protéines et l'effet des ROS (Oliver et al., 2001). Les HSP jouent également un rôle déterminant dans l'acquisition de la tolérance à la déshydratation (Berjak et Pammenter, 2007). Bien que souvent ubiquitaires, elles s'accumulent tardivement durant la maturation des graines

(Wehmeyer et al., 1996 ; Wehmeyer et Vierling, 2000) et sont présentes dans la graine sèche. Les HSP sont des protéines de réponse au stress et interviennent en agissant comme des "chaperons moléculaires", aidant au repliement des protéines. Par ailleurs, elles contribuent à la protection des protéines et complexes protéiques en formant un bouclier autour de ces derniers. Les protéines substrats des HSP sont alors stabilisées et protégées d'une dénaturation irréversible, des dommages oxydatifs et de l'agrégation des composés cellulaires. (Feder et Hofmann, 1999).

#### **I.4. Programme d'amélioration du mélèze**

C'est l'échec de l'implantation de mélèzes en dehors de leurs aires de répartition naturelles qui est à l'origine du développement des programmes d'amélioration au niveau national et dans presque tous les pays d'Europe. En effet, l'implantation de populations inadaptées a conduit au dépérissement des arbres qui n'a pu être observé que quelques dizaines d'années après leur plantation. Ces dépérissements ont été causés par certains parasites (*Lachnellula willkommii*, *Meria laricis*) et par les dommages engendrés par le gel ou la sécheresse. En France, les premières études ayant pour objectif l'amélioration génétique du mélèze ont débuté en 1957 lorsque les premiers résultats d'essais comparatifs de provenances ont été rendus disponibles. Les programmes d'amélioration ont pour buts principaux la production de bois et la création de matériels pour l'approvisionnement en graines. Chez le mélèze, les principaux traits étudiés et sélectionnés concernent l'architecture (rectitude, ramification), la production de bois ainsi que ses propriétés physiques et mécaniques (densité, rigidité, durabilité, contraction). D'autres critères de sélection sont également pris en compte comme par exemple la résistance aux parasites et l'adaptation à la sécheresse. L'amélioration du mélèze repose sur 2 principales stratégies : l'approche intraspécifique et l'approche par hybridation entre le mélèze d'Europe et le mélèze du Japon.

##### **I.4.1. Amélioration du mélèze par approche intraspécifique**

L'approche intraspécifique suit un cycle de sélection récurrente simple. L'objectif est d'améliorer la valeur génétique moyenne d'une population en sélectionnant les meilleurs individus de cette population de génération en génération (Kremer, 1986). Pour le mélèze, un cycle complet peut durer entre 40 et 50 ans. La première étape de la sélection récurrente simple consiste en la recombinaison d'individus issus d'une population d'amélioration sélectionnée à partir de différentes provenances. Les nouveaux individus obtenus sont testés et les meilleurs sont sélectionnés pour produire une sous-population qui constituera une nouvelle population de départ qui sera utilisée dans un nouveau cycle de sélection. Des individus considérés comme suffisamment améliorés pourront ensuite faire l'objet d'une sortie variétale. La limite de cette méthode de sélection est la conservation de la diversité génétique. Un risque étant de développer une dépression des individus de part des phénomènes de consanguinité (Kremer, 1986). Il est donc crucial de correctement constituer les populations d'amélioration de départ.

##### **I.4.2. Amélioration du mélèze par hybridation interspécifique**

L'approche par hybridation interspécifique est l'une des stratégies les plus importantes dans l'amélioration génétique du mélèze (Pâques et al., 2013). La découverte de l'hybridation entre le mélèze d'Europe et le mélèze du Japon a suscité un grand intérêt dans la création d'hybrides. L'hybridation entre *L. decidua* et *L. kaempferi* a été décrite pour la première fois par E.J. Elwes et A. Henry (Wright, 1976) au XX<sup>ème</sup> siècle en Ecosse. L'hybridation artificielle avec succès entre *L. decidua* et *L. kaempferi* a été réalisée en Pologne au début du XX<sup>ème</sup> siècle (Oleksyn, 1985). L'hybride obtenu *Larix x eurolepis* a révélé une croissance accélérée par comparaison avec celle de ces deux parents, démontrant ainsi un phénomène d'hétérosis qui a généré un enthousiasme croissant chez les forestiers et a encouragé les améliorateurs à travers l'Europe à créer de nouvelles variétés d'hybrides (Bastien et Keller, 1980). En France, la première introduction de mélèzes hybrides a été entreprise dans les années 50. Du fait des

caractéristiques et des performances de ces hybrides, un programme d'amélioration a été mis en place à l'INRAE en 1979. Les objectifs étaient la création et la diffusion de nouvelles variétés hybrides interspécifiques sélectionnées pour leur vigueur, leur rectitude, leur adaptabilité à diverses conditions environnementales mais aussi pour la qualité de leur bois et leur résistance au chancre.

Plusieurs centaines de variétés ont été développées au sein de INRAE par croisements contrôlés entre *L. decidua* et *L. kaempferi*. En 2005, a été obtenue la variété REVE-VERT, qui est un polycross issu du croisement entre une mère européenne avec un mélange de 12 pollens issus de 12 pères japonais d'origine géographique différente. Cette variété a été admise comme testée et est à présent inscrite en catalogue commercial. Cette variété a démontré sa vigueur hybride ainsi que des caractéristiques avantageuses en vue d'une diffusion large dans la foresterie et la sylviculture (Pâques, 1992). Néanmoins, un problème réside dans la production de graines hybrides. En effet, du fait d'un décalage de phénologie de la floraison entre le mélèze d'Europe et du Japon, la pollinisation nécessite l'intervention humaine. Cela a pour conséquence un surcoût de production qui entraîne un prix très élevé du kilo de graines de mélèze hybride (2000-4000 €/kg, Pâques L, communication personnelle). A titre de comparaison, le prix du kilo de graines de mélèze hybride est 4 fois plus élevé par rapport au prix d'un kilo de graines de pin maritime. Par ailleurs, une particularité du mélèze est la production d'une grande proportion de graines vides. L'origine de ce phénomène n'est pas encore clairement comprise mais constitue un frein pour une production abondante de graines (Kosiński, 1987 ; Slobodník et Guttenberger, 2005). L'ensemble de ces paramètres a pour conséquence la rareté et le prix élevé des graines. Les vergers à graines constituent un moyen efficace pour garantir en quantité et en qualité la production de matériel forestier de reproduction (MFR). Ainsi des vergers à graines de mélèze ont été installés, une distinction étant faite entre les vergers à graines d'espèces pures et les vergers d'hybridation.

#### **I.4.3. Vergers à graines de mélèze**

Pour le mélèze d'Europe, les vergers à graines d'espèces pures sont constitués d'arbres « Plus » qui ont été sélectionnés en milieu naturel (Figure I.13). En France, 3 vergers ont été mis en place dans le Lot. Un verger de mélèzes d'Europe d'origine *sudetica* est aujourd'hui commercialement exploité. Il s'agit du verger du Theil (46) qui est un verger à graines de 1<sup>ère</sup> génération constitué d'arbres sélectionnés sur une base phénotypique (vigueur, architecture). Ce verger est caractérisé par une grande diversité génétique et est isolé, ce qui garantit une absence de pollution pollinique et donc un moindre risque de diminution des gains génétiques.

Concernant les vergers d'hybridation, en France il en existe deux sortes : les vergers de 1<sup>ère</sup> génération constitués de clones de mélèzes d'Europe et du Japon et les vergers de 2<sup>ème</sup> génération composés de clones de mélèzes hybrides. Sont implantés en France 2 vergers de 1<sup>ère</sup> génération (domaine de Lavercantière (46), domaine des Barres (45)) et 2 vergers de 2<sup>ème</sup> génération (Carnoët (22), domaine des Barres (45)). Les vergers à graines hybrides ont besoin d'une gestion spécifique car la technique de production de graines hybrides peut se révéler difficile.

L'efficacité de production dans les vergers à graines, classique ou hybride, est fortement dépendante des conditions environnementales. Il a été observé ces 7 dernières années une baisse conséquente du nombre de graines pleines dans les cônes. Cette observation peut être expliquée par l'apparition de gelées tardives qui sont au détriment du bon développement des strobiles de mélèze, et par l'avancée du printemps qui favorise les cycles de reproduction des nuisibles. Cette pénurie de

graines rend le déploiement des variétés de mélèze, et en particulier des hybrides, difficile par voie générative. Pour pallier à ce manque de graines, des alternatives reposant sur des méthodes de multiplication végétative sont envisagées.

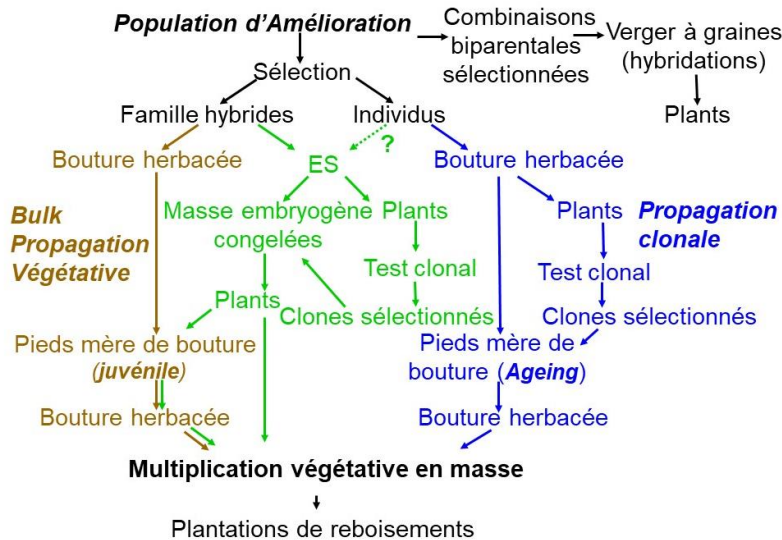


Figure I.13. Schéma du programme d'amélioration du mélèze hybride intégrant l'embryogenèse somatique. Les flèches marrons et bleues correspondent à la voie de multiplication par bouturage et les flèches vertes représentent la voie de multiplication par embryogenèse somatique (Lelu-Walter et Pâques, 2009).

#### I.4.4. Reproduction asexuée chez le mélèze : les méthodes de multiplication végétative

La production en masse de graines et de plants est essentielle aux programmes d'amélioration. En effet, ce matériel est nécessaire pour les tests clonaux et le déploiement de matériel élite issu de programmes d'amélioration. La multiplication végétative est un moyen de multiplication performant offrant le bénéfice de produire des clones en grande quantité c'est-à-dire des individus génétiquement identiques à la plante mère et donc uniformes. Pour le mélèze différentes méthodes de multiplication végétative ont été développées et comportent les méthodes horticoles traditionnelles (bouturage) et de propagation *in vitro* (embryogenèse somatique) que nous allons détailler ci-dessous.

##### IV.4.1. Le bouturage horticole

Le bouturage consiste au prélèvement d'un rameau végétatif, sa base étant plongée dans une solution d'hormones (auxines) pour induire son enracinement. Les boutures enracinées se développent en pleine terre jusqu'à l'obtention d'un arbre adulte. En général, le bouturage de résineux est une méthode simple mais dépendante de l'âge des pieds mères sur lesquels sont prélevés les rameaux. En effet, le vieillissement de ces pieds-mères entraîne une diminution de l'aptitude à l'enracinement et une croissance plagiotrope des boutures.

Chez le mélèze, il existe 2 stratégies de bouturage : le clonage d'individus élites sélectionnés par tests de descendances ou la multiplication dite en vrac («bulk») de jeunes semis issus de familles performantes sélectionnées donc plus performants à

l'enracinement (Verger et Pâques, 1993) (Figure I.13). La méthode de bouturage « en vrac » nécessite un nombre élevé de génotypes qui doivent être renouvelés tous les 2 à 3 ans entraînant un surcoût lié aux installations et soins apportés aux plants pour le bouturage. En conclusion, le bouturage pourrait être une alternative à la multiplication des mélèzes. Cependant, du fait des nombreuses limites de la méthode, elle ne semble pas être la plus adaptée à la multiplication à grande échelle de cette essence. Des méthodes de micropropagation ont été envisagées pour la production de plants génétiquement améliorés. Parmi les techniques de culture *in vitro*, l'embryogenèse somatique est potentiellement reconnue comme la méthode de régénération la plus performante pour la propagation clonale d'arbres forestiers.

#### IV.4.2. L'embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique permet la formation d'embryons à partir de cellules somatiques et non à partir de cellules germinales. Ainsi l'embryogenèse somatique est une reproduction asexuée car l'embryon se développe en l'absence de fusion gamétique. Par conséquent, les embryons somatiques (ES) sont les clones de l'individu à partir duquel ils ont été produits. Les ES sont une structure bipolaire dotée d'un méristème racinaire opposé à un méristème caulinaire. Les ES, par opposition aux bourgeons adventifs possèdent, leur propre système vasculaire sans connexion avec celui de la plante mère. A l'état naturel, l'embryogenèse somatique peut être observée chez le *Citrus* où des embryons sont directement formés à partir de cellules du nucelle (Tisserat et al, 1979). La fin des années 50 a marqué l'explosion des connaissances en culture *in vitro* avec la capacité de pouvoir maintenir en culture des cals et de suspensions cellulaires, mais aussi avec la découverte de l'importance des hormones. Des publications démontraient la possibilité de créer des ébauches d'embryons grâce à différents milieux de culture auxquels ont été ajoutés des hormones. En 1959 Reinert décrit la formation d'un embryon à partir d'explants de carotte en jouant sur la composition du milieu de culture. Le succès de sa méthode a ensuite permis d'adapter le protocole à diverses sources d'explants mais également à de nombreuses autres espèces comprenant angiospermes et gymnospermes (Yang et Zhang, 2010). Chez les conifères, l'embryogenèse somatique a été décrite pour la première fois en 1985 chez *Picea abies* (Hakman et al, 1985 ; Chalupa 1985) et depuis pour de nombreux conifères (Klimaszewska et al, 2016 ; Lelu-Walter et al, 2016). Chez le genre *Larix*, elle a été obtenue pour la première fois chez le mélèze hybride *Larix x eurolepis* (Klimaszewska (1989) pour être ensuite étendue à de nombreuses espèces de mélèze (Tableau I.2). L'embryogenèse somatique des conifères comporte plusieurs étapes allant de l'initiation des cultures embryogènes au développement d'un plant (Figure I.14), étapes que nous allons détailler ci-après spécifiquement pour le mélèze.

Tableau I.2. Premiers travaux réalisés en embryogenèse somatique chez le genre *Larix*.

Espèce	Référence	Initiation	Multiplication	Cryoconservation	Maturation	Germination/Plant
<i>Larix decidua</i>	Cornu et Geoffrion (1990)					
	von Aderkas <i>et al.</i> (1990)					
	Lelu <i>et al.</i> (1994c)					
<i>Larix gmelinii</i>	Tret'yakova et Barsukova (2012)					
<i>Larix kaempferi</i>	von Aderkas <i>et al.</i> (1990)					
	Kim <i>et al.</i> (1998)					
	Kim (2015)					
<i>Larix laricina</i>	Klimaszewska <i>et al.</i> (1997)					
<i>Larix occidentalis</i>	Thompson et von Aderkas (1992)					
<i>Larix olgensis</i>	Song <i>et al.</i> (2016)					
<i>Larix principis-rupprechtii</i>	Qi <i>et al.</i> (2000)					
<i>Larix sibirica</i>	Belousova et Tret'iakova (2008)					
<i>Larix sukaczewii</i>	Tret'yakova et Barsukova (2012)					
<i>Larix x eurolepis</i>	Klimaszewska (1989)					
	Klimaszewska <i>et al.</i> (1992)					
	Lelu <i>et al.</i> (1994c)					
	Lelu-Walter et Pâques (2009)					
<i>Larix x marshlinsii</i>	Lelu <i>et al.</i> (1994a)					
	Lelu <i>et al.</i> (1994b)					
	Lelu <i>et al.</i> (1994c)					
	Saly <i>et al.</i> (2002)					
	Lelu-Walter et Pâques (2009)					

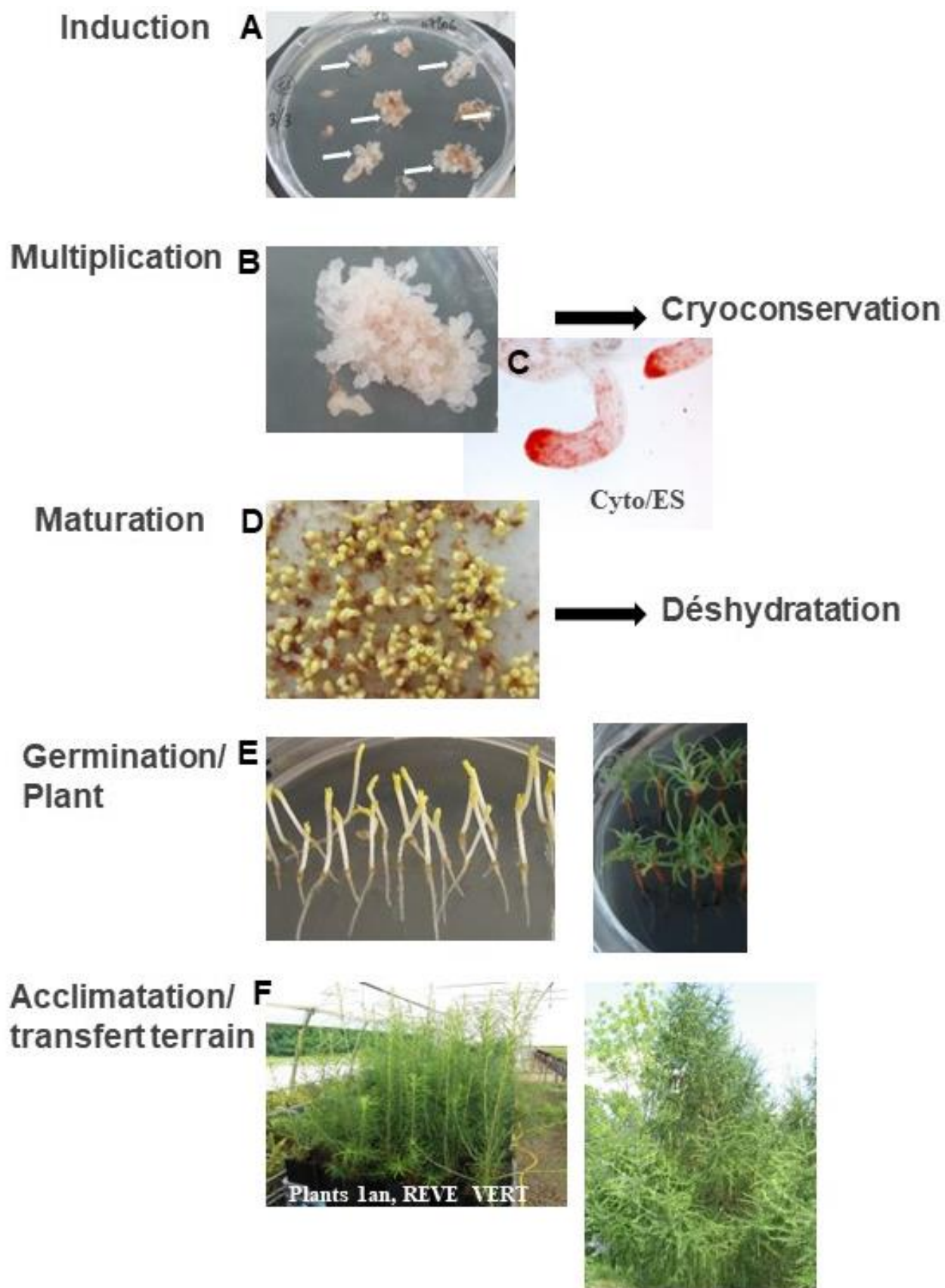


Figure I.14. Etapes de l'embryogenèse somatique du mélèze. (Photos : Marie-Anne Lelu-Walter ; Parisa Savane)



#### IV.4.2.1. Initiation (Figure I.14-A)

L'initiation est une étape qui vise à provoquer la dédifférenciation cellulaire, c'est-à-dire le retour des cellules à un état moins spécialisé, à partir d'explants. Les explants sont exposés à des conditions spécifiques de culture qui favorisent cette dédifférenciation. *In fine*, cela confère la capacité aux cellules de produire des ES. Sous l'effet des conditions de culture appropriées, les cellules se multiplient et forment des masses de cellules appelées masses embryogènes (MEs). Ce sont des amas filamenteux, de couleur blanche constitués d'un très grand nombre d'ES immatures. Chaque ES est une structure polarisée, dotée d'un suspenseur et d'une tête embryonnaire formée par des cellules méristématiques (Figure I.14-C) (von Aderkas et al., 1991). Les cultures embryogènes qui se développent, possèdent des caractéristiques morphologiques et cytologiques typiques aux conifères. L'initiation de l'embryogenèse somatique chez le mélèze peut être réalisée à partir de différents types d'explants (embryons zygotiques immatures ou matures, ES, aiguilles de plant somatique) (Lelu et al., 1994c ; Shmakov et Konstantinov, 2020). Cependant elle est initiée de manière la plus efficace à partir d'embryons zygotiques immatures au stade précotylédonaire (Lelu-Walter et al., 2016). Le choix précis du stade de développement est crucial pour obtenir le meilleur taux d'initiation. La fenêtre optimale pour la récolte des embryons zygotiques est réduite dans le temps et ne dure qu'une dizaine de jours. L'initiation de l'embryogenèse somatique se fait sur un milieu de culture (noté MSG, Lelu-Walter et Pâques 2009, Annexe 1) supplémenté d'une auxine (acide 2,4-dichlorophenoxyacétique, 2,4-D) et d'une cytokinine (benzyl adénine, BA), les boîtes de Petri mises à 23°C à l'obscurité.

#### IV.4.2.2. Multiplication des masses embryogènes (Figure I.14-B)

Une fois obtenues, les masses embryogènes (MEs) sont transférées sur un milieu de multiplication (Annexe 1) contenant une auxine (2,4-D) et une cytokinine (BA) afin d'entretenir la prolifération des ES immatures. Les MEs sous la forme d'amas (Figure I.14-B) doivent être repiquées toutes les 2 semaines sur milieu neuf, les boîtes étant placées en chambre de culture à 23°C, à l'obscurité. Par ailleurs, une méthode de multiplication très performante a été développée en termes de taux de multiplication. Les MEs sont dissociées en milieu liquide puis étalées sur filtre papier le tout transféré sur milieu de multiplication. Le taux de multiplication des MEs (poids frais) peut être multiplié par 10 au bout d'une semaine de culture (Lelu-Walter et Pâques, 2009) permettant de disposer rapidement d'un matériel très réactif et en grande quantité. A partir d'une graine (embryon zygotique), il est possible de générer un nombre quasiment illimité de clones.

#### IV.4.2.3. Cryoconservation des masses embryogènes

Les ME peuvent être cryoconservées et stockées dans cet état physiologique à -196°C dans de l'azote liquide durant de longues périodes avec 100% de réactivation (Lelu-Walter et Pâques, 2009). La cryoconservation offre de nombreux avantages : (1) la perspective de pouvoir mobiliser du matériel à un stade juvénile à tout instant, (2) la sauvegarde et la sécurisation du matériel végétal et des ressources génétiques, (3) la conservation à très long terme. Au niveau logistique, les banques de matériel congelé n'occupent que très peu de place ce qui rend possible la conservation de plusieurs milliers de lignées différentes. Par ailleurs au niveau économique, les banques n'ont besoin que de peu d'entretien ce qui permet une réduction des coûts de conservation du matériel végétal.

#### IV.4.2.4. Maturation des embryons somatiques (Figure I.14-D)

Après une semaine en multiplication, les MEs en culture sur filtre sont transférées sur un milieu de maturation contenant de l'ABA (cis-trans ( $\pm$ )-ABA, 60  $\mu$ M) pour le développement des ES. Les boîtes de Petri sont placées à 23°C, à l'obscurité pour 8 semaines de culture. Les ES immatures se développent en embryons précotylédonaire puis en embryons cotylédonaire pourvus des méristèmes racinaires et caulinaires (Gutmann et al., 1996). Chez les conifères, l'ABA est le régulateur essentiel pour cette étape de maturation. Il permet de limiter la prolifération des MEs et de synchroniser le développement des ES (Gutmann et al., 1996). Les paramètres physiques du milieu de culture peuvent être contrôlés de différentes manières. Pour le mélèze le potentiel osmotique du milieu de culture est régulé par la concentration en saccharose qui est de 0,2 M (Lelu et al., 1994a). La disponibilité en eau pour les cultures est déterminée par la concentration du gélifiant du milieu de maturation et qui doit être de 8 g.l<sup>-1</sup> pour obtenir des ES en grand nombre et de qualité (Lelu-Walter et Pâques 2009, Teyssier et al., 2011). L'efficacité de production d'ES dépend de plusieurs facteurs. Une meilleure qualité et une augmentation du nombre d'ES obtenus sont observées lorsque les MEs sont dissociées puis dispersées et cultivées sur un filtre papier (Lelu-Walter et Pâques, 2009). Le nombre d'embryons somatiques pouvant être générés à partir des MEs est variable selon les lignées (de 8 jusqu'à 2400 embryons /g de matière fraîche de MEs) (Lelu-Walter et Pâques, 2009). L'étape de maturation est principalement caractérisée par l'accumulation des réserves de l'embryon (protéines, lipides et glucides) nécessaires à la germination. Cette accumulation est notable par l'augmentation de la matière sèche de l'embryon sans qu'il y ait de divisions cellulaires (Stasolla et al., 2002 ; Teyssier et al., 2011 ; Teyssier et al., 2014).

#### IV.4.2.5. Déshydratation des embryons somatiques

A la différence des EZ, les ES ne se déshydratent pas spontanément et sont plus proches des embryons issus de graines fraîches en termes de teneur en eau, matière sèche et caractéristiques biochimiques (Gösslová et al., 2001 ; Morel et al., 2014b). La majorité des ES de conifères sont capables de germer en l'absence d'un traitement de déshydratation. Néanmoins, l'application d'une déshydratation améliore la synchronisation de la germination, le développement en plant et la conservation des ES (Lelu et al., 1995) (Tableau I.3). Par ailleurs, l'application d'une déshydratation constitue une phase supplémentaire d'accumulation des réserves notamment en faveur de l'acquisition de la tolérance à la déshydratation. Le succès de la déshydratation va dépendre de plusieurs facteurs contrôlant sa vitesse et son degré de déshydratation. Ces facteurs sont la durée du traitement de déshydratation et l'humidité relative (HR) sous laquelle sont placés les ES.

Chez le mélèze, un traitement de déshydratation a été développé avec succès au mélèze hybride *Larix x marshliinsii*, (Lelu et al., 1995). Les ES cotylédonaire sont prélevés puis disposés sur un filtre de nylon. L'ensemble est transféré dans une plaque multipuits (6 puits) : 3 puits contenant les ES sur filtre, les 3 autres remplis avec une solution sursaturée en sel contrôlant l'HR de l'environnement (Figure I.15). La plaque est ensuite fermée hermétiquement et placée dans une armoire de culture à l'obscurité pour 1 semaine à +4°C. Une déshydratation lente est réalisée sous HR élevée (98%) obtenue grâce à une solution sursaturée de KNO<sub>3</sub> (Dronne et al 1997). Ce traitement a permis de réduire la teneur en eau des ES (0.97g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> MS), mais le niveau n'atteint pas la teneur en eau mesurée chez les embryons zygotiques (EZ) déshydratés qui constituent la référence à atteindre (0.2g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> MS, Lelu et al 1995).

Une déshydratation sous faible HR (59%, solution sursaturée de  $MgNO_3$ ), entraîne une réduction drastique de la teneur en eau des ES ( $0.2g H_2O g^{-1} MS$ ) équivalente à celle des EZ. Cependant, ce traitement a eu comme conséquence la réduction significative de la survie des ES (Dronne et al., 1997). Ainsi, pour pouvoir appliquer un traitement de déshydratation poussée sans conséquence néfaste, il est primordial de déclencher des modifications biochimiques en faveur de l'accumulation de composés (glucides, protéines) nécessaires à l'acquisition de la tolérance à la déshydratation et la protection des ES. Les glucides jouent un rôle essentiel pendant la déshydratation. Ils sont une source d'énergie, protègent la structure et l'intégrité des protéines (Lipavská and Konrádová, 2004; Hartmann and Trumbore 2016; Hoekstra et al., 2001b), participent au maintien de l'équilibre osmotique et empêchent les dommages cellulaires (Obendorf and Górecki 2012; Navarro et al., 2017). Au fur et à mesure de la déshydratation, la modification de l'homéostasie redox induit une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène, aggravée par la baisse des activités enzymatiques impliquées dans leur élimination (Chandra et Keshavkant, 2018).

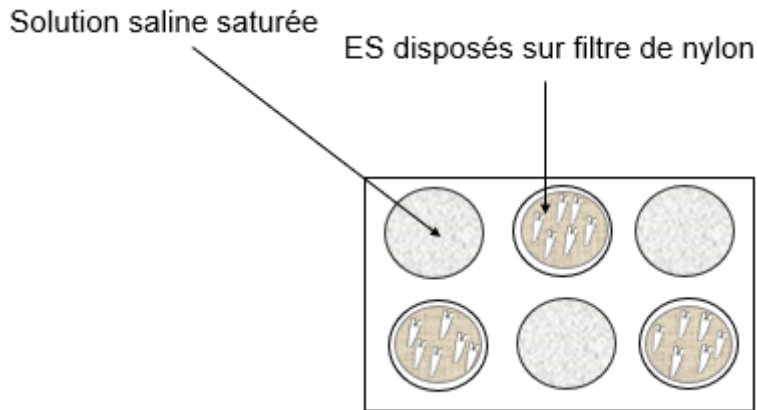


Figure I.15. Schéma du système employé pour déshydrater les ES

Tableau I.3 : Récapitulatif des travaux sur la déshydratation des ES de conifères

Espèce	Durée de déshydratation	Hygrométrie (% HR)	Température	Régime lumineux	% germination (g) / plant (p)	Référence
<i>Picea engelmanni-glauca</i>	sans déshydratation	-	-	-	24% (g)	Roberts et al. 1990
		eau	27°C	Obscurité	95% (g)	
		95%	27°C	Obscurité	65% (g)	
		90%	27°C	Obscurité	16% (g)	
		81%	27°C	Obscurité	0% (g)	
<i>Picea engelmanni-glauca</i>	sans déshydratation 16 jours	-	-	-	0% (g)	Webster et al. 1990
		eau	27°C	Obscurité	24-87% (g)	
<i>Picea engelmanni-glauca</i>	sans déshydratation 3 semaines	-	-	-	14% (g)	Roberts 1991
		eau	27°C	Obscurité	83% (g)	
<i>Picea glauca</i>	sans déshydratation 2 semaines 2 semaines 2 semaines	-	-	-	43% (p)	Attree et al. 1991
		81%	ND	ND	43% (p)	
		63%	ND	ND	23% (p)	
		43%	ND	ND	7% (p)	
<i>Picea sitchensis</i>	sans déshydratation 1-3 jours 7-14 jours 21-28 jours 35 jours	-	-	-	5% (g)	Roberts et al. 1991
		eau	27°C	Obscurité	30% (g)	
		eau	27°C	Obscurité	60-65% (g)	
		eau	27°C	Obscurité	80% (g)	
		eau	27°C	Obscurité	95% (g)	
<i>Pinus resinosa</i>	sans déshydratation 3 jours	-	-	-	52% (g)	Harry et Thorpe 1991
		eau	ND	Obscurité	100% (g)	

	6 jours	eau	ND	Obscurité	89% (g)	
<i>Picea glauca</i>	sans déshydratation 1 semaine	- eau	- 26°C	- Obscurité	2% (g) 82% (g) / 58% (p)	Kong et Yeung 1992
<i>Picea glauca</i>	sans déshydratation 4 semaines	- 63%	- ND	- ND	80% (p) 92% (p)	Attree et al. 1994
<i>Picea glauca</i>	sans déshydratation 2 semaines	- 81%	- ND	- ND	0% (g) 24-87% (g)	Park et al. 1994
<i>Picea mariana</i>	sans déshydratation	- 79%	- -	- -	87% (g)	Beardmore et Charest 1995
	2 jours	58% 31%	25°C	Obscurité	61% (g)	
<i>Larix x leptoeuropaea</i>	sans déshydratation 1 semaine 1 semaine 1 semaine 1 semaine	- eau 98% 76% 59%	- 4°C 4°C 4°C 4°C	- Obscurité Obscurité Obscurité Obscurité	45% (g) / 11% (p) 98% (g) / 64% (p) 99% (g) / 71% (p) 75% (g) / 50% (p) 73% (g) / 41% (p)	Lelu et al. 1995
<i>Picea abies</i>	sans déshydratation 4 semaines	- 98-95%	- 24°C	- Obscurité	0% (g) 15-80% (g)	Find 1997
<i>Pinus thunbergii</i>	sans déshydratation 3 semaines	- 98%	- 25°C	- Obscurité	2-30% (g) / 0-24% (p) 74-94% (g) / 72-90% (p)	Maruyama et Hosoi 2012
<i>Pinus densiflora</i>	sans déshydratation 3 semaines	- 98%	- 25°C	- Obscurité	10-27%(g) / 5-24% (p) 73-85% (g) / 68-80%(p)	

<i>Pinus armandii</i>	sans déshydratation 3 semaines	- 98%	- 25°C	- Obscurité	16-51%(g) / 12-40% (p) 55-91% (g) / 54-90% (p)	
<i>Picea abies</i>	sans déshydratation 2 semaines 3 semaines 2 semaines 3 semaines	- 97% 97% 79% 79%	- 22°C 22°C 22°C 22°C	- Obscurité Obscurité Obscurité Obscurité	99% (g) / 2% (p) 100% (g) / 45% (p) 100% (g) / 42% (p) 5% (g) / 0% (p) 0% (g) / 0% (p)	Hazubska-Przybył et al. 2015
<i>Picea omorika</i>	sans déshydratation 2 semaines 3 semaines 2 semaines 3 semaines	- 97% 97% 79% 79%	- 22°C 22°C 22°C 22°C	- Obscurité Obscurité Obscurité Obscurité	93% (g) / 3% (p) 92% (g) / 5% (p) 100% (g) / 3% (p) 9% (g) / 0% (p) 0% (g) / 0% (p)	
<i>Picea asperata</i>	sans déshydratation 2 semaines	- eau	- 24°C	- Lumière	5% (g) 57% (g)	Jing et al. 2017
<i>Picea abies</i>	sans déshydratation 3 semaines	- ≈ 100%	- 18°C	- Lumière	20% (g) 70% (g)	Fischerová et al. 2022
<i>Picea abies</i>	sans déshydratation 3 semaines	- ≈ 100%	- 18°C	- Lumière	20% (g) 60-80% (g)	Eliášová et al. 2022

#### **IV.4.2.6. Germination des embryons somatiques et développement en plant (Figure I.14-E)**

Après la maturation, les ES cotylédonaire sont transférés sur un milieu de culture dépourvu d'hormones (Annexe 1) pour leur germination. La germination se déroule à 24°C sur 2 à 3 semaines. Les embryons germent la première semaine à l'obscurité puis sous lumière tamisée (sous un filtre papier, Lelu-Walter et Pâques 2009). La germination des ES se caractérise par l'élongation de leur hypocotyle puis par la percée de la radicule à travers la coiffe racinaire (germination *sensu stricto*). Après 4-5 semaines de culture, l'embryon germé développe sa partie aérienne (aiguilles, épicotyle). Il est alors considéré comme un plant qui pourra ensuite être transféré sur le terrain après acclimatation. Le taux de germination et le taux de conversion en plant des ES avoisinent généralement 96 et 65% respectivement (Lelu-Walter et Pâques, 2009). Pour son développement, l'ES puise l'eau et les éléments nutritifs dans le milieu de culture mais aussi de ses propres réserves accumulées durant la phase de maturation. Ces réserves sont principalement localisées dans les cotylédons de l'embryon (Gutmann et al., 1996 ; von Aderkas et al., 2002a). Le choix des embryons mis en germination est déterminé selon des critères morphologiques. Seuls les ES présentant un hypocotyle allongé, aux cotylédons individualisés sont mis en germination. Généralement chez le mélèze, c'est après 8 semaines de maturation que l'ES cotylédonaire est prélevé pour la mise en germination et le développement en plante (Teyssier et al., 2014).

#### **IV.4.2.7. Acclimatation et transfert sur le terrain (Figure I.14-F)**

Les jeunes plants de mélèze issus d'embryogenèse somatique sont généralement acclimatés après 2 mois de culture sur milieu de germination. Les plants sont directement transférés de leur milieu de culture *in vitro* vers du substrat horticole sous ombrière avec un taux d'humidité relative élevée pendant les deux premières semaines (Lelu et al., 1994b). Après 3 mois d'acclimatation, le taux de survie des plants issus d'embryogenèse somatique reste élevé (aux alentours de 85%), après 8 mois 79% des plants sont disponibles pour un transfert sur terrain (Lelu-Walter et Pâques, 2009).

#### **IV.4.2.8. Place de l'embryogenèse somatique dans les programmes d'amélioration du mélèze (Figure I.13)**

L'embryogenèse somatique est une méthode très efficace pour la propagation végétative du mélèze du fait de son taux élevé de régénération de plants. L'autre avantage de l'embryogenèse somatique réside dans la possibilité de cryoconserver les MEs à un stade très juvénile. L'embryogenèse somatique s'obtient à partir d'embryon zygotique dont les futures performances ne sont pas connues sur le terrain. Par conséquent cela nécessite de faire des tests clonaux pour évaluer les caractéristiques de ces plants issus d'ES (Figure I.15). La possibilité de congeler les MEs dans un état juvénile offre le temps nécessaire aux tests clonaux entrepris sur le terrain pour rendre compte de la performance du matériel en question. Une fois les tests réalisés (sélection des clones les plus intéressants après 10-15 ans), il est donc possible de revenir à la collection de MEs cryoconservées pour sortir les clones d'intérêt (*la variété de choix*) qui seront multipliés par embryogenèse somatique. Cette méthode peut donc être utilisée comme outil pour soutenir le besoin en matériel végétal dans les programmes d'amélioration (Lelu-Walter et Pâques, 2009, Zhu et al., 2022). L'embryogenèse somatique offre par exemple la possibilité de production en

masse de pieds mère à partir desquels du bouturage « en vrac » peut être associé pour augmenter la production de plants et à la propagation de variétés élites (Lelu-Walter et al., 2016) (Figure I.13). Néanmoins, pour pouvoir envisager l'intégration de l'embryogenèse somatique dans les programmes d'amélioration, il faut s'assurer que les plants issus d'embryogenèse somatique présentent des caractéristiques équivalentes aux plants issus de semis, notamment en termes de croissance, d'architecture et de vigueur. C'est pourquoi, des tests clonaux sont mis en place (Figure I.13). Par ailleurs, l'embryogenèse fait également face à certaines limites notamment en ce qui concerne le potentiel embryogène (nombre d'ES produits) qui peut être variable en fonction des lignées (Lelu-Walter et Pâques, 2009). Une autre limite importante dans l'embryogenèse somatique du mélèze, comme chez tous les conifères, est l'incapacité de l'obtenir à partir d'arbres adultes. C'est un challenge important car la propagation à partir d'arbres élites aux performances connues permettrait de réduire le temps des cycles.



## **I.5. Méthodologies employées dans la thèse**

La maturation et la déshydratation sont des étapes déterminantes pour la qualité des ES et des graines. Durant ces étapes, l'accumulation des réserves est active. Les composés synthétisés vont fournir l'énergie nécessaire à d'autres processus développementaux importants tels que la germination et le développement en plantes ou encore participer à la protection contre les dommages induits par la déshydratation (Coelho et Benedito, 2008 ; Oliver et al., 2020). Ainsi, la composition et l'abondance des réserves dans l'ES et les graines vont conditionner leur devenir et de fait elles peuvent constituer de bons indicateurs pour évaluer la qualité de l'ES et des graines. Des méthodes existent pour évaluer et quantifier cette qualité, chacune offrant des informations spécifiques à différentes échelles d'études (biologique, histologique, biochimique, moléculaire). Ces méthodes diverses fournissent des aperçus complémentaires permettant une caractérisation approfondie, tant du point de vue qualitatif que quantitatif. Dans cette partie, nous explorerons les méthodes qui nous serviront dans l'étude de la déshydratation et de la qualité des ES et des graines. Il s'agira de mettre en évidence leurs avantages et leurs contributions respectives à l'amélioration de notre compréhension du processus de déshydratation et de notre caractérisation de la qualité des ES et des graines.

### **I.5.1. Etude histologique chez les ES de conifères**

L'histologie permet d'étudier la structure des tissus biologiques et des organes d'un échantillon à un niveau cellulaire. L'histologie joue un rôle crucial dans la compréhension de la manière dont les cellules s'organisent pour former des tissus fonctionnels. Les objectifs de l'histologie dans l'étude de la déshydratation des ES sont multiples. Grâce à l'histologie il sera possible d'observer l'arrangement ainsi que l'intégrité des cellules des ES avant et après déshydratation, ce qui pourrait fournir des informations expliquant les changements en regard des caractéristiques biologiques des ES en réponse à ce traitement. Par ailleurs l'utilisation de colorations spécifiques donnera des informations quant à l'abondance et la localisation cellulaires des composés de réserves. Les colorations sont effectuées sur des sections fines (4-6  $\mu\text{m}$ ) d'ES préalablement fixés par une solution. Deux types de colorations seront utilisés dans cette étude, la coloration au bleu de toluidine et la double coloration à l'APS (acide périodique/réactif de Schiff) et Amido Black. Le bleu de toluidine permet la visualisation des parois et des noyaux qui apparaissent bleu, et aussi des composés phénoliques qui se colorent en vert turquoise (O'Brien et al. 1964; Ruzin 1999). La double coloration APS/Amido Black permet la visualisation des glucides insolubles et des protéines sur une même section (Kong and Yeung, 1992; Eliášová et al., 2022). La cellulose, le mucilage ainsi que l'amidon seront colorés en rose tandis que les protéines auront une coloration bleutée. Les différentes sections colorées sont ensuite observées au microscope. En regard de la déshydratation des ES, Eliášová et al (2022) ont mis en évidence chez les ES de *Picea abies* des modifications de la distribution des protéines et de l'amidon en réponse à un traitement de déshydratation sous HR élevée. Chez le mélèze, les études histologiques qui ont été réalisées concernent principalement la réponse des ES à un changement des paramètres de cultures tels que l'ajout d'ABA dans le milieu de culture (Gutmann et al., 1996 ; von Aderkas et al., 2002b) ou la modification du régime lumineux (von Aderkas et al., 2015). Néanmoins, aucune étude histologique sur la déshydratation des ES de mélèze n'a encore été réalisée

### **I.5.2. Etude du profil des phytohormones chez les ES de conifères**

Les phytohormones jouent un rôle crucial dans le processus d'embryogenèse somatique. Les auxines, les cytokinines et l'ABA sont d'une grande importance puisqu'ils contrôlent chaque étape de l'embryogenèse somatique allant de l'initiation à la germination (Vondrakova et al., 2018). Alors que les auxines et les cytokinines favorisent la division et la croissance cellulaires, l'ABA favorise l'accumulation de protéines, synchronise le développement des ES mais inhibe leur germination (Lelu et Label, 1994 ; Gutmann et al., 1996 ; von Aderkas et al., 2002b). Par ailleurs, la synthèse et le catabolisme des phytohormones endogènes sont souvent finement régulés en réponse à des changements environnementaux ou en réponse à l'application de traitements dont la déshydratation (Tuteja, 2007 ; Eliášová et al, 2022). La déshydratation est souvent associée à la synthèse et au catabolisme des phytohormones telles que l'ABA et les cytokinines (Swamy and Smith, 1999; Zwack et Rashotte, 2015). Chez le mélèze hybride *Larix x marschlinii*, la déshydratation des ES entraîne la réduction de la teneur en ABA elle-même associée à une amélioration de la germination et de la conversion en plante (Dronne et al., 1997). Chez les ES de *Picea abies* le traitement de déshydratation s'accompagne d'un pic de cytokinine et d'un faible ratio auxine/cytokinine, créant de fait des conditions favorables à la germination (Vondrakova et al., 2018). Ainsi, l'exploration du statut hormonal des ES permet d'apporter des informations intéressantes sur les mécanismes moléculaires sous-jacents en réponse à la déshydratation. Dans cette thèse, il s'agit de se concentrer sur quelques groupes principaux de phytohormones : l'ABA, les auxines et les cytokinines qui sont identifiés et quantifiés grâce à la spectrométrie de masse LC/MS. Pour ces 3 groupes, l'analyse se porte aussi bien sur les formes actives que sur les formes de stockage et les catabolites.

### **I.5.3. Protéomique en ES et graines de conifères**

La protéomique est une méthode puissante permettant d'identifier et quantifier des protéines dans un échantillon. Le protéome représente l'ensemble des protéines exprimées à un temps donné dans l'échantillon analysé, comme une photographie immortalisant ce qu'il se passe dans la cellule au moment où elle a été prise. Ainsi, il est possible d'avoir une « image » rendant compte du fonctionnement au niveau métabolique d'un processus développemental. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) est une méthode puissante utilisée en protéomique. La LC-MS/MS permet de détecter et quantifier des protéines présentes à des concentrations très faibles, ce qui est essentiel pour l'analyse de protéines modérément ou faiblement présentes ainsi que pour la détection de protéines différemment exprimées dans des échantillons complexes. La LC-MS/MS ne nécessite pas de séparation préalable des protéines, ce qui évite les biais liés à la solubilité, à la taille ou à d'autres caractéristiques des protéines. Par ailleurs, la LC-MS/MS est une méthode haut débit ce qui permet l'analyse simultanée de nombreux échantillons dans un laps de temps relativement court. Cela en fait une méthode efficace pour des études comparatives à grande échelle, comme c'est le cas dans cette thèse.

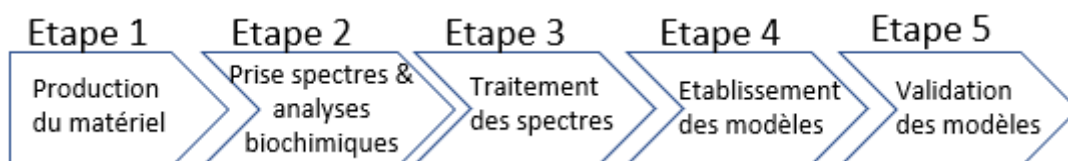
De nombreuses études se sont intéressées à la compréhension des mécanismes impliqués dans le développement des ES et des graines chez de nombreuses espèces (Wang et al., 2015 ; Juarez-Escobar et al., 2021). Néanmoins, il existe un déséquilibre dans le nombre de publications entre angiospermes et gymnospermes. Les études chez les gymnospermes étant moins nombreuses. Par ailleurs, chez les gymnospermes, les études sur les ES prédominent par rapport aux études sur les graines. Chez les ES, les études protéomiques concernent particulièrement la

détermination des mécanismes liés à l'acquisition de la compétence embryogène et à l'amélioration de la capacité embryogène (Gautier et al., 2018 ; Gautier et al., 2019), au développement des ES (Sallandrouze et al., 1999 ; Filonova et al., 2000 ; Teyssier et al., 2011 ; Morel et al., 2014a ; Zhao et al., 2015) à la maturation des ES (Businge et al., 2013 ; Morel et al., 2014b) et la réponse au stress (Castender-Olarieta et al., 2021). En regard de la déshydratation seulement 2 études sont disponibles et ont été réalisées chez *Picea abies* (Eliášová et al., 2022) et *Picea asperata* (Jing et al., 2017). Dans ces études des changements significatifs dans l'abondance et la diversité des protéines pendant la déshydratation des ES ont été observés. Les protéines de réserves (viciline-like, legumine-like) et les protéines associées à la protection cellulaire, telles que les protéines de stress (LEA, HSP) et les enzymes antioxydantes, sont souvent surexprimées. De plus, des protéines spécifiquement impliquées dans la régulation hormonale, la réponse au stress et le métabolisme énergétique ont également été identifiées comme jouant un rôle crucial. Pour les graines, les études protéomiques se focalisent principalement sur leur développement (dos Santos et al., 2006 ; Silveira et al., 2008 ; Balbuena et al., 2009 ; Shi et al., 2010 ; Zhen et al., 2010) Néanmoins, la connaissance fondamentale au niveau protéomique de la déshydratation des ES et des graines est encore peu documentée chez les conifères et aucunement chez le mélèze. Ainsi le travail réalisé dans cette thèse contribuera à combler les lacunes actuelles en matière de connaissances dans ce domaine.

#### **I.5.4. Développement de modèles de prédiction en spectrométrie infrarouge pour la caractérisation des ES et des graines**

La spectrométrie infrarouge est une technique de quantification et de caractérisation des propriétés chimiques d'un échantillon, elle permet par mesure de l'absorption de la lumière par l'échantillon, la détection de composés biochimiques marqués par une signature spectrale spécifique. C'est une méthode rapide et nécessitant peu de matériel. La spectroscopie infrarouge est d'ores et déjà employée en routine dans de nombreux secteurs industriels et pharmaceutiques (Otsuka, 2020; Qu et al., 2015). Elle est aussi utilisée pour l'évaluation de la qualité de produits agricoles et alimentaires (Tsuchikawa & Kobori, 2015 ; Pulkka et al., 2016 ; Tsuchikawa et al., 2022). Par ailleurs, La spectrométrie infrarouge peut également être utilisée pour discriminer des échantillons selon des paramètres qualitatifs. De nombreuses études ont démontré la capacité de la spectroscopie infrarouge à distinguer des échantillons de matériaux forestiers selon des paramètres qualitatifs tels que la variété des semences (Farhadi et al., 2016 ; Tigabu et al., 2005), la provenance des graines (Farhadi et al., 2017) ou encore la viabilité des graines (Farhadi et al., 2015 ; Tigabu, 2003 ; Tigabu et al., 2004). La spectrométrie infrarouge est une méthode ayant prouvé son application à différents types de matériaux complexes et ce dans divers domaines. Ainsi elle pourrait se révéler être une méthode intéressante pour la caractérisation rapide de la composition biochimique des ES et graines de mélèze mais aussi pour les discriminer en fonction de leur stade de maturité.

Le développement des modèles de prédictions suit 5 grandes étapes qui sont les suivantes :



L'étape 1 de production du matériel correspond d'une part à la production d'ES à différents stades de maturation et d'autre part à l'échantillonnage des graines. L'utilisation d'embryons et de graines à différents stades de leur développement, garantit de disposer d'échantillons avec des caractéristiques biochimiques contrastées. Cela permet d'avoir une robustesse pour l'établissement des courbes de calibration.

L'étape 2 correspond à la phase de production des résultats bruts qui seront utilisés pour le développement des modèles. Un premier jeu de données est produit et correspond à la prise des spectres infrarouge sur les échantillons (ES isolés, graines entières). En parallèle, les analyses biochimiques sont réalisées : dosages des protéines totales, des lipides totaux, des glucides et mesure de la teneur en eau ou de son activité, de la teneur en MS.

L'étape 3 consiste au traitement des spectres obtenus par spectroscopie infrarouge. En effet, ils sont complexes car ils contiennent de nombreux pics qui se chevauchent et parfois des variations de ligne de base peuvent être observées. Pour pouvoir extraire l'information utile contenue dans les spectres, des outils chimiométriques sont indispensables. La chimiométrie correspond à l'utilisation d'outils mathématiques, en particulier de méthodes statistiques, pour maximiser l'information pouvant être extraite des données spectrales. La chimiométrie va servir dans un premier temps à traiter les spectres afin de les corriger en éliminant ou diminuant des interférences qui peuvent parasiter et masquer des informations utiles. Pour cette troisième étape, il s'agit donc d'appliquer différents traitements pour corriger les artefacts ou imperfections qui ont été introduits lors de la prise des spectres ou à cause de la nature de l'échantillon.

Ensuite à l'étape 4, la chimiométrie va permettre de corréler les spectres avec les données quantitatives ou qualitatives, telles que les dosages biochimiques obtenus en laboratoire ou le stade de maturité des échantillons, pour développer les modèles de prédiction. A l'issue de cette étape, il est nécessaire de confirmer la validité du modèle grâce à un jeu de données constitué de spectres pris sur des échantillons caractérisés biochimiquement et/ou dont le stade de maturité est connu.

## I.6. Problématique et objectifs de la thèse

Les variations de l'environnement impactent négativement la production de graines de mélèze. Par ailleurs, l'obtention de graines hybrides REVE-VERT est naturellement difficile pour plusieurs raisons. Le décalage de phénologie entre le mélèze d'Europe et le mélèze du Japon qui implique que la pollinisation ne peut se faire naturellement et nécessite la mobilisation de main d'œuvre pour une supplémentation pollinique afin d'augmenter le rendement en graines. A ce décalage phénologique se rajoute une floraison erratique qui complique la prédiction de la date de pollinisation d'une année à l'autre. Par ailleurs il se produit des avortements précoces qui limitent l'obtention de graines matures en quantités (environ 5 graines pleines par cône) (Kosiński 1987 ; Shearer, 1989 ; Owens et al., 1994). Ainsi, disposer régulièrement de graines de mélèze en grande quantité n'est pas garanti, ce qui limite l'obtention de plants. Pour y faire face, deux options sont envisagées (1) la multiplication végétative *in vitro* par embryogenèse somatiques, (2) l'optimisation de la récolte des graines en respectant leur état de maturité. Pour pouvoir mettre en œuvre ces possibilités, il est indispensable de s'intéresser à l'étape finale de la maturation qui est la déshydratation. Cette dernière joue un rôle crucial sur la qualité finale et la germination des ES et des graines. Dans cette thèse, il s'agit d'étudier la déshydratation chez le mélèze (1) en évaluant la réponse des ES et en les comparant aux EZ, (2) en caractérisant les graines récoltées à différentes dates, avant ou après séchage.

Plus précisément, les objectifs de cette thèse sont les suivants (Figure I.16) :

Objectif 1 : Caractériser l'évolution des caractéristiques biologiques et la composition biochimique des ES au cours de leur maturation.

Objectif 2 : Evaluer l'état de maturité des ES de mélèze hybride comparativement à l'EZ en regard de leurs réserves, et tenter d'améliorer l'accumulation de RFO.

Objectif 3 : Caractériser les effets de la déshydratation des ES par une approche analytique multi-échelle.

Objectif 4 : Evaluer les caractéristiques biologiques et biochimiques des graines de mélèze récoltées à différents stades de maturité puis soumises ou non à une déshydratation et analyser les conséquences d'une anticipation de la récolte des graines.

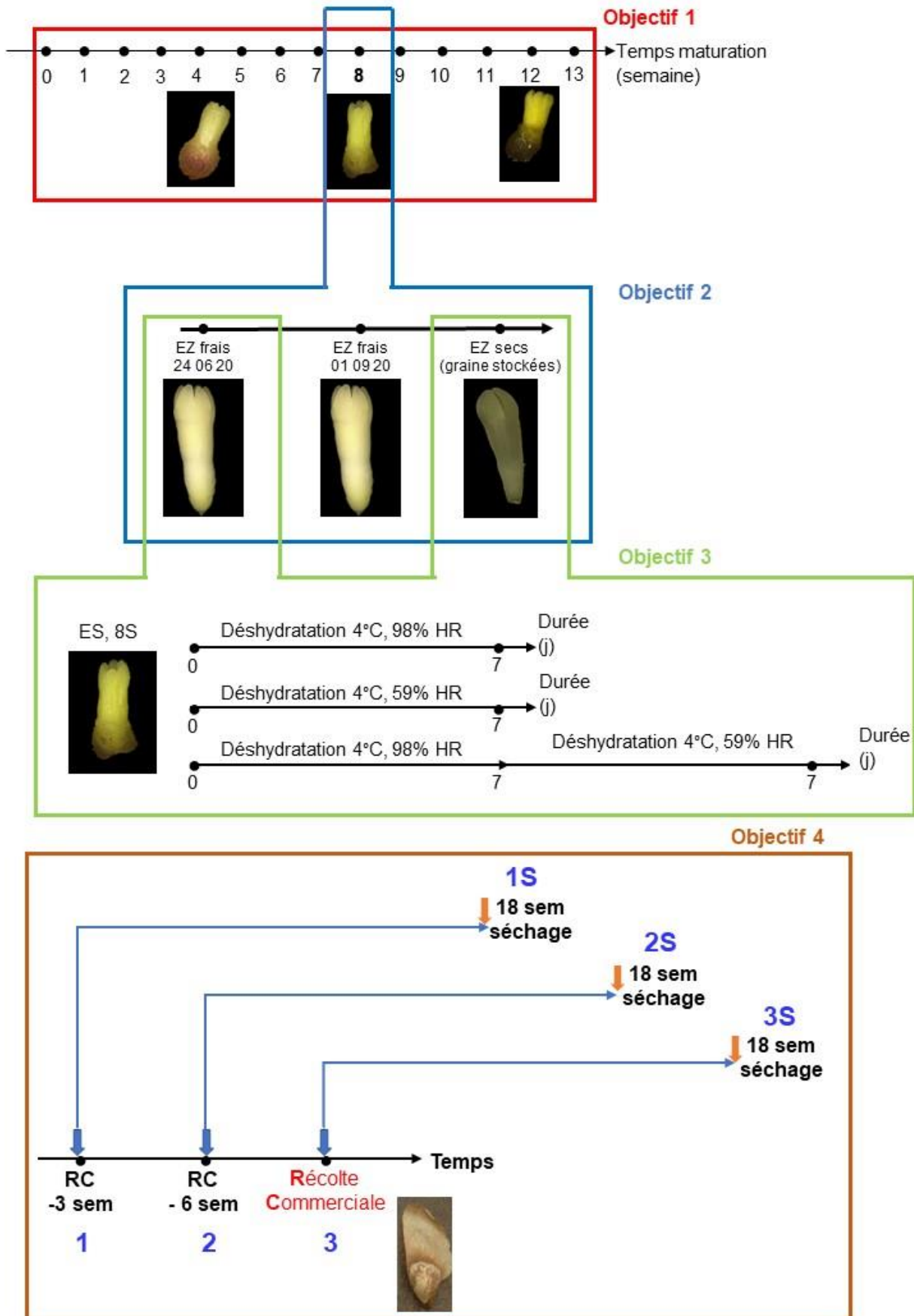


Figure I.16. Etude de la déshydratation des ES et des graines de meléze. Positionnement des objectifs de recherche.

## Références

- Allona I, Casado R, Aragoncillo C** (1992) Seed storage protein from *Pinus pinaster* Ait.: homology of major components with 11S proteins from angiosperms. *Plant Sci.* 87, 9–18.
- Angelovici R, Galili G, Fernie A R** (2010) Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends Plant Sci.* 15, 211–218.
- Attree S M, Pomeroy M K, Fowke L C** (1994) Production of vigorous, desiccation tolerant white spruce (*Picea glauca* [Moench] Voss) synthetic seeds in a bioreactor. *Plant Cell Rep.* 13, 601–606.
- Attree S M, Moore D, Sawhney VK, Fowke L C** (1991) Enhanced maturation and desiccation tolerance of white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss] somatic embryos: Effects of a non-plasmolysing water stress and abscisic acid. *Ann. Bot.* 68, 519–525.
- Bailly C** (2004) Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci. Res.* 14, 93–107.
- Balbuena T S, Silveira V, Junqueira M, Dias L L C, Santa-Catarina C, Shevchenko A, Floh E I S** (2009) Changes in the 2-DE protein profile during zygotic embryogenesis in the Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*). *J. Proteomics* 72, 337–352.
- Bastien J C, Keller R** (1980) Intérêts comparés du mélèze hybride (*Larix x eurolepis* Henry) avec les deux espèces parentes. *Rev. For. Fr.* 32, 521–530.
- Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garcarrubio A, Campos F, Covarrubias A A** (2008) The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol.* 148, 6–24.
- Baud S** (2018) Seeds as oil factories. *Plant Repro.* 31, 213–235.
- Baud S, Dubreucq B, Miquel M, Rochat C, Lepiniec L** (2008) Storage reserve accumulation in *Arabidopsis*: metabolic and developmental control of seed filling. *Arabidopsis Book* 6, e0113.
- Beardmore T, Charest P J** (1995) Black spruce somatic embryo germination and desiccation tolerance. I. Effects of abscisic acid, cold, and heat treatments on the germinability of mature black spruce somatic embryos. *Can. J. For. Res.* 25, 1763–1772.
- Belousova A C, Tret'iakova I N** (2008) Patterns of somatic embryo formation in *Siberian larch*: embryological aspects. *Ontogenez.* 39(2), 106-15.
- Bergstedt A, Lyck C** (2007) Larch wood: a literature review. *Forest & Landscape working paper* 23, 1–107.
- Berjak P, Pammenter N W** (2007) From *Avicennia* to *Zizania*: seed recalcitrance in perspective. *Ann. Bot.* 101, 213–228.
- Bewley J D, Black M** (1994) Seeds dans: Bewley J D, Black M (Eds.) *Seeds: physiology of development and germination*. Springer US, Boston, MA, 1–33.
- Buitink J, Leprince O** (2008) Intracellular glasses and seed survival in the dry state. *Comptes Rendus Biologies* 331, 788–795.
- Businge E, Bygdell J, Wingsle G, Moritz T, Egertsdotter U** (2013) The effect of carbohydrates and osmoticum on storage reserve accumulation and germination of Norway spruce somatic embryos. *Physiol. Plant.* 149, 273–285.
- Cardemil L, Reinero A** (1982) Changes of *Araucaria araucana* seed reserves during germination and early seedling growth. *Can. J. Bot.* 60, 1629–1638.
- Castander-Olarieta A, Pereira C, Montalbán I A, Mendes V M, Correia S, Suárez-Álvarez S, Manadas B, Canhoto J, Moncaleán P** (2021) Proteome-wide analysis of heat-stress in *Pinus radiata* somatic embryos reveals a combined response of sugar metabolism and translational regulation mechanisms. *Front.*

- Plant Sci. 12, 631239.
- Chandra J, Keshavkant S** (2018) Desiccation-induced ROS accumulation and lipid catabolism in recalcitrant *Madhuca latifolia* seeds. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 24(1), 75-87.
- Chalupa V** (1985) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) Kaerst. *Commun. Inst. For. Cech.* 14, 57–63.
- Coelho C M M, Benedito VA** (2008) Seed development and reserve compound accumulation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Seed Sci. Biotechnol.* 2, 42–52.
- Cole T C H, Hilger H H, Stevens P** (2019) Angiosperm phylogeny poster (APP) – Flowering plant systematics, Peer J Preprints.
- Cornu D, Geoffrion C** (1990) Aspects de l'embryogenèse somatique chez le mélèze, *Bulletin de la Société Botanique de France. Act. Bot.* 137(3-4), 25-34.
- Crowe J H, Hoekstra F A, Crowe L M** (1992) Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 54, 579–599.
- Devic M, Roscoe T** (2016) Seed maturation: simplification of control networks in plants. *Plant Sci.* 252, 335–346.
- Dogra P D** (1978). Morphology, development and nomenclature of conifer embryo. *Phytomorphology.* 28(3), 307–322.
- Dos Santos A L W, Wiethölter N, El Gueddari N E, Moerschbacher B M** (2006) Protein expression during seed development in *Araucaria angustifolia*: transient accumulation of class IV chitinases and arabinogalactan proteins. *Physiol. Plant.* 127, 138-148.
- Dronne S, Label P, Lelu M A** (1997) Desiccation decreases abscisic acid content in hybrid larch (*Larix X leptoeuropaea*) somatic embryos. *Physiol. Plant.* 99, 433–438.
- Eliášová K, Konrádová H, Dobrev P I, Motyka V, Lomenech A M, Fischerová L, Lelu-Walter M A, Vondráková Z, Teyssier C** (2022) Desiccation as a post-maturation treatment helps complete maturation of Norway spruce somatic embryos: carbohydrates, phytohormones and proteomic status. *Front. Plant Sci.* 13, 823617.
- Farhadi M, Tigabu M, Odén P C** (2015) Near infrared spectroscopy as non-destructive method for sorting viable, petrified and empty seeds of *Larix sibirica*. *Silva Fenn.* 49(5), 1340.
- Farhadi M, Tigabu M, Stener L G, Odén P C** (2016) Feasibility of visible + near infrared spectroscopy for non-destructive verification of European x Japanese larch hybrid seeds. *New For.* 47, 271-285.
- Farhadi M, Tigabu M, Pietrzykowski M, Danusevičius D, Odén P C** (2017) Application of near infrared spectroscopy for authentication of *Picea abies* seed provenance. *New For.* 48, 629-642.
- Feder M E, Hofmann G E** (1999) heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61, 243–282.
- Filonova L H, Bozhkov P V, Brukhin V B, Daniel G, Zhivotovsky B, von Arnold S** (2000) Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. *J. Cell Sci.* 24, 4399–4411.
- Finch-Savage W E** (2003) Seed development | Onset of desiccation tolerance dans: Thomas B (Ed.) *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. Elsevier, Oxford,



1279–1284.

- Find J I** (1997) Changes in endogenous ABA levels in developing somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in relation to maturation medium, desiccation and germination. *Plant Sci.* 128, 75–83
- Fischerová L, Gemperlová L, Cvikrová M, Matušíková I, Moravčíková J, Gerši Z, Malbeck J, Kuderna J, Pavlíčková J, Motyka V, Eliášová K, Vondráková Z** (2022) The humidity level matters during the desiccation of Norway spruce somatic embryos. *Front. Plant Sci.* 13, 968982.
- Flinn B S, Roberts D R, Newton C H, Cyr D R, Webster F B, Taylor I E P** (1993) Storage protein gene expression in zygotic and somatic embryos of interior spruce. *Physiol. Plant.* 89, 719–730.
- Fujiwara T, Nambara E, Yamagishi K, Goto D B, Naito S** (2002) Storage proteins. *Arabidopsis Book* 1, e0020.
- Ghaffaripour S, Bilcke N V D, Samson R** (2017) The importance of seed reserve on performance and breeding of tamarind seedlings. *Sci. Hortic.* 222, 145 – 152.
- Gautier F, Eliášová K, Leplé J C, Vondráková Z, Lomenech A M, le Metté C, Label P, Costa G, Trontin J F, Teyssier C, Lelu-Walter M A** (2018) Repetitive somatic embryogenesis induced cytological and proteomic changes in embryogenic lines of *Pseudotsuga menziesii* [Mirb.]. *BMC Plant Biol.* 18, 164.
- Gautier F, Label P, Eliášová K, Leplé J C, Motyka V, Boizot N, Vondráková Z, Malbeck J, Trávníčková A, le Metté C, Lesage-Descauses M C, Lomenech A M, Trontin J F, Costa G, Lelu-Walter M A, Teyssier C** (2019) Cytological, biochemical and molecular events of the embryogenic state in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* [Mirb.]). *Front. Plant Sci.* 2019, 10, 118.
- Gill S S, Tuteja N** (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909–930.
- González-Morales S I, Chávez-Montes R A, Hayano-Kanashiro C, Alejo-Jacuinde G, Rico-Cambron T Y, de Folter S, Herrera-Estrella L** (2016) Regulatory network analysis reveals novel regulators of seed desiccation tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113(35), 5232–5241.
- Gorian F, Pasquini S, Daws M I** (2007) Seed size and chilling affect germination of *Larix decidua* Mill. seeds. *Seed Sci. Technol.* 35, 508–513.
- Gösslová M, Svobodová H, Lipavská H, Albrechtová J, Vreugdenhil D** (2001) Comparing carbohydrate status during norway spruce seed development and somatic embryo formation. *In vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 37, 24-28.
- Graham I A** (2008) Seed storage oil mobilization. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 115–142.
- Grigova M, Kubes M, Drazna N, Rezanka T, Lipavska H** (2007) Storage lipid dynamics in somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*): histochemical and quantitative analyses. *Tree Physiol.* 27, 1533–1540.
- Gurr M I** (1980) The Biosynthesis of Triacylglycerols dans: Stumpf P K (Ed.) *Lipids: structure and function*. Academic Press, 205–248.
- Gutmann M, von Aderkas P, Label P, Lelu M.-A** (1996) Effects of abscisic acid on somatic embryo maturation of hybrid larch. *J. Exp. Bot.* 47, 1905–1917.
- Hakman I, Fowke L C, Von Arnold S, Eriksson T** (1985) The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). *Plant Sci.* 38, 53–59.
- Hakman I, Stabel P, Engström P, Eriksson T** (1990) Storage protein accumulation during zygotic and somatic embryo development in *Picea abies* (Norway spruce). *Physiol. Plant.* 80, 441–445.
- Harry I S, Thorpe T A** (1991) Somatic embryogenesis and plant regeneration from

- mature zygotic embryos of red spruce. *Bot. Gaz.* 152(4), 446–452.
- Hartmann H, Trumbore S** (2016) Understanding the roles of nonstructural carbohydrates in forest trees – from what we can measure to what we want to know. *New Phytol.* 211, 386-403.
- Hazubska-Przybył T, Wawrzyniak M, Obarska A, Bojarczuk K** (2014) Effect of partial drying and desiccation on somatic seedling quality in Norway and Serbian spruce. *Acta Physiol. Plant.* 37, 1735.
- Henry A, Flood M G** (1919) The history of the dunkeld hybrid larch, *Larix eurolepis*, with notes on other hybrid conifers. *Proceedings of the Royal Irish Academy. Section B: Biological, Geological, and Chemical Science* 35, 55–66.
- Hoekstra F A, Golovina E A, Buitink J** (2001a) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci.* 6, 431–438.
- Hoekstra F A, Golovina E A, Tetteroo F A, Wolkers W F** (2001b) Induction of desiccation tolerance in plant somatic embryos: how exclusive is the protective role of sugars? *Cryobiol.* 43(2), 140-150.
- Holloway D M, Brook B, Kang J, Wong C, Wu M** (2016) A quantitative study of cotyledon positioning in conifer development. *Bot.* 94, 1063–1074.
- Jin B, Xie Y, Lu Y, Wang D, Zhang M, Wang L** (2012) Starch granule and protein accumulation during seed development of *Ginkgo biloba* L. *Int. Sch. Res. notices* 2012, 653796.
- Jing D, Zhang J, Xia Y, Kong L, OuYang F, Zhang S, Zhang H, Wang J** (2017) Proteomic analysis of stress-related proteins and metabolic pathways in *Picea asperata* somatic embryos during partial desiccation. *Plant Biotechnol. J.* 15(1), 27–38.
- Jolliffe N A, Craddock C P, Frigerio L** (2005) Pathways for protein transport to seed storage vacuoles. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 1016.
- Juarez-Escobar J, Bojórquez-Velázquez E, Elizalde-Contreras J M, Guerrero-Analco J A, Loyola-Vargas V M, Mata-Rosas M, Ruiz-May E** (2021) Current Proteomic and Metabolomic Knowledge of Zygotic and Somatic Embryogenesis in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 11807.
- Kermode A R, Finch-Savage B E** (2002) Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. *CABI Books* 149–184.
- Kijak H, Ratajczak E** (2020) What do we know about the genetic basis of seed desiccation tolerance and longevity? *Int. J. Mol. Sci.* 21, 3612.
- Kim Y W** (2015) Initiation of embryogenic callus from mature zygotic embryos in Japanese larch (*Larix kaempferi*). *J. Plant Biotechnol.* 42, 223-227.
- Kim Y W, Youn Y, Noh E R, Kim J C** (1998) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of Japanese larch (*Larix leptolepis*). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 55, 95-101.
- Klimaszewska K** (1989) Plantlet development from immature zygotic embryos of hybrid larch through somatic embryogenesis. *Plant Sci.* 63, 95–103.
- Klimaszewska K, Ward C, Cheliak W M** (1992) Cryopreservation and plant regeneration from embryogenic cultures of larch (*Larix X eurolepis*) and black spruce (*Picea mariana*). *J. Exp. Bot.* 43(246), 73-79.
- Klimaszewska K, Hargreaves C, Lelu-Walter M A, Trontin J F** (2016) Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000. Dans: *In vitro embryogenesis in Higher plants*, Chap. 7, Germanà MA, Lambardi M (éds), *Methods in Molecular*
- Klimaszewska K, Devantier Y, Lachance D, Lelu M A, Charest P J** (1997) *Larix laricina* (tamarack): somatic embryogenesis and genetic transformation. *Can. J.*

- For. Res. 27(4): 538-550.
- Kong L, Yeung E C** (1992) Development of white spruce somatic embryos: II. Continual shoot meristem development during germination. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28(3), 125-131.
- Kosiński G** (1987) Empty seed production in European larch (*Larix decidua*). *For. Ecol. Manag.* 19, 241–246.
- Koski V** (1991) Generative reproduction and genetic processes in nature dans: *Developments in Plant Genetics and Breeding*. Elsevier, 59–72.
- Koster K L, Leopold A C** (1988) Sugars and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiol.* 88, 829–832.
- Krasowski M J, Owens J N** (1993) Ultrastructural and histochemical postfertilization megagametophyte and zygotic embryo development of white spruce (*Picea glauca*) emphasizing the deposition of seed storage products. *Can. J. Bot.* 71, 98–112.
- Kremer A** (1986) Méthodes et stratégies de sélection. *Rev. For. Fr.* 38, 89–101.
- Lelu M A, Label P** (1994) Changes in the levels of abscisic acid and its glucose ester conjugate during maturation of hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*) somatic embryos, in relation to germination and plantlet recovery. *Physiol. Plant.* 92, 53-60.
- Lelu M A, Klimaszewska K, Pflaum G, Bastien C** (1995) Effect of maturation duration on desiccation tolerance in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea* Dengler). *In Vitro Cell Dev. Biol.* 31, 15–20.
- Lelu M A, Bastien C, Klimaszewska K, Ward C, Charest P J** (1994a) An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*): Part 1. Somatic embryo maturation. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 36, 107–115.
- Lelu M A, Bastien C, Klimaszewska K, Ward C, Charest P J** (1994b) An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*): Part 2. Control of germination and plantlet development. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 36, 117–127.
- Lelu M A, Bastien C, Klimaszewska K, Ward C, Charest P J** (1994c) Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos and from cotyledons and needles of somatic plantlets of *Larix*. *Can. J. For. Res.* 20, 100–106.
- Lelu-Walter M A, Pâques L E** (2009) Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix x eurolepis* and *Larix x marschlinsii*). *Perspectives for breeding*. *Ann. For. Sci.* 66, 104–104.
- Lelu-Walter M A, Bernier-Cardou M, Klimaszewska K** (2008) Clonal plant production from self- and cross-pollinated seed families of *Pinus sylvestris* (L.) through somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 92, 31–45.
- Lelu-Walter M A, Teyssier C, Guérin V, Pâques L E** (2016) Vegetative propagation of larch species: somatic embryogenesis improvement towards its integration in breeding programs. Dans: Park Y-S, Bonga JM, Moon H-K (éds) *Vegetative Propagation of Forest Trees*. National Institute of Forest Science (NIFoS). Seoul, Korea, pp 551-571.
- Leopold A C, Sun W Q, Bernal-Lugo I** (1994) The glassy state in seeds: analysis and function. *Seed Sci. Res.* 4, 267–274.
- Linkies A, Graeber K, Knight C, Leubner-Metzger G** (2010) The evolution of seeds. *New Phytol.* 186, 817–831.
- Lipavská H, Konrádová H** (2004) Somatic embryogenesis in conifers: The role of carbohydrate metabolism. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 40(1), 23 -30.

- MacGillivray H** (1967) Hybrid between tamarack and Japanese larch appears promising in south-central New Brunswick. Canada Department of Forestry and Rural Development, Forestry Branch Bimonthly Research Notes 23, 2–3.
- Maruyama T E, Hosoi Y** (2012) Post-maturation treatment improves and synchronizes somatic embryo germination of three species of Japanese pines. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 110, 45–52.
- Morel A, Teyssier C, Trontin J F, Eliášová K, Pešek B, Beaufour M, Morabito D, Boizot N, le Metté C, Belal-Bessai L, Reymond I, Harvengt L, Cadene M, Corbineau F, Vágner M, Label P, Lelu-Walter M A** (2014a) Early molecular events involved in *Pinus pinaster* Ait. somatic embryo development under reduced water availability: Transcriptomic and proteomic analyses. *Physiol. Plant.* 152, 184–201.
- Morel A, Trontin J F, Corbineau F, Lomenech A M, Beaufour M, Reymond I, Le Metté C, Ader K, Harvengt L, Cadene M, Label P, Teyssier C, Lelu-Walter M A** (2014b) Cotyledonary somatic embryos of *Pinus pinaster* Ait. most closely resemble fresh, maturing cotyledonary zygotic embryos: biological, carbohydrate and proteomic analyses. *Planta* 240, 1075–1095.
- Murphy D J** (1990) Storage lipid bodies in plants and other organisms. *Prog. Lipid Res.* 29, 299–324.
- Nasri N, Triki S** (2007) Les protéines de réserve du pin pignon (*Pinus pinea* L.). *Comptes Rendus Biologies* 330, 402–409.
- Navarro B V, Elbl P, De Souza A P, Jardim V, de Oliveira L F, Macedo A F, Dos Santos A L W, Buckeridge M S, Floh E I S** (2017) Carbohydrate-mediated responses during zygotic and early somatic embryogenesis in the endangered conifer, *Araucaria angustifolia*. *PLoS One.* 12(7), e0180051.
- Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S** (2008) Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol.* 147, 1251–1263.
- Obendorf R L, Górecki R J** (2012). Soluble carbohydrates in legume seeds. *Seed Sci. Res.* 22, 219 - 242.
- O'Brien T P, Feder N, McCully M E** (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59(2), 368-373.
- Oleksyn J** (1985) Scientific activity of Solomon Zakhariyevich Kurdiani—one of the first investigators of heredity in trees. *Folia Dendrol.* 12, 349–368.
- Oliver M J, Farrant J M, Hilhorst H W M, Mundree S, Williams B, Bewley J D** (2020) Desiccation tolerance: avoiding cellular damage during drying and rehydration. *Annu. Rev. Plant Biol.* 71, 435-460.
- Oliver A E, LePrince O, Wolkers W F, Hinch D K, Heyer A G, Crowe J H** (2001) Non-disaccharide-based mechanisms of protection during drying. *Cryobiol.* 43, 151–167.
- Otsuka M** (2020) Near-infrared spectroscopy application to the pharmaceutical industry. In: Meyers RA (ed) *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Wiley, pp 1-15.
- Owens J N** (2008) The reproductive biology of western larch. Inland Empire Tree Improvement Cooperative, Victoria, B.C.
- Owens J N, Molder M** (1979) Sexual reproduction of *Larix occidentalis*. *Can. J. Bot.* 57, 2673–2690.
- Owens J N, Morris S J, Catalano G L** (1994) How the pollination mechanism and prezygotic and postzygotic events affect seed production in *Larix occidentalis*. *Can. J. For. Res.* 24, 917-927.

- Pâques L E** (1989) A critical review of larch hybridization and its incidence on breeding strategies. *Ann. For. Sci.* 46, 141–153.
- Pâques L E** (1992) Performance of vegetatively propagated *Larix decidua*, *L. kaempferi* and *L. laricina* hybrids. *Ann. For. Sci.* 49, 63–74.
- Pâques L E, Foffová E, Heinze B, Lelu-Walter M A, Liesebach M, Philippe G** (2013) Larches (*Larix* sp.) dans: Pâques L E (Ed.) *Forest Tree Breeding in Europe, Managing Forest Ecosystems*. Springer Netherlands, Dordrecht, 13–122.
- Park Y S, Pond S E, Bonga J M** (1994) Somatic embryogenesis in white spruce (*Picea glauca*): genetic control in somatic embryos exposed to storage, maturation treatments, germination, and cryopreservation. *Theor. Appl. Genet.* 89, 742–750.
- Pérez S, Bertoft E** (2010) The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. *Starch - Stärke* 62, 389–420.
- Philippe G, Baldet P, Héois B, Ginisty C** (2006) *Reproduction sexuée des conifères et production de semences en vergers à graines*. Cemagref; Quæ, Paris, Versailles.
- Pulkka S, Segura V, Harju A, Tapanila T, Tanner J, Pâques L E, Charpentier J P** (2016) Prediction of stilbene content from heartwood increment cores of scots pine using near infrared spectroscopy methodology. *J. Near Infrared Spectroscop.* 24(6), 517–528.
- Qi L W, Han Y F, Li L, Ewald D, Han S Y** (2000) The somatic embryogenesis and establishment of transformation experiment system in *Larix principis-Rupprechtii*. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao.* 33(4), 357-65.
- Qu J H, Liu D, Cheng J H, Sun D W, Ma J, Pu H, Zeng X A** (2015) Applications of near-infrared spectroscopy in food safety evaluation and control: a review of recent research advances. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 55(13), 1939-1954.
- Rajjou L, Duval M, Gallardo K, Catusse J, Bally J, Job C, Job D** (2012) Seed germination and vigor. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63(1), 507-533.
- Reinert J** (1959) Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventivembryonen an Gewebekulturen aus Karotten. *Planta* 53, 318–333.
- Roberts D R** (1991) Abscisic acid and mannitol promote early development, maturation and storage protein accumulation in somatic embryos of interior spruce. *Physiol. Plant.* 83, 247–254.
- Roberts D R, Lazaroff W R, Webster F B** (1991) Interaction between maturation and high relative humidity treatments and their effects on germination of Sitka spruce somatic embryos. *J. Plant Physiol.* 138, 1–6.
- Roberts D R, Sutton B C S, Flinn B S** (1990) Synchronous and high frequency germination of interior spruce somatic embryos following partial drying at high relative humidity. *Can. J. Bot.* 68, 1086–1090.
- Roberts J K, DeSimone N A, Lingle W L, Dure L** (1993) Cellular concentrations and uniformity of cell-type accumulation of two lea proteins in cotton embryos. *Plant Cell* 5, 769–780.
- Ruzin S E** (1999) *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford University Press, Inc., New York.
- Said C, Villar M, Zandonella P** (1991) Ovule receptivity and pollen viability in Japanese larch (*Larix leptolepis* Gord.). *Silvae Genet.* 40, 1–6.
- Sallandrouze A, Faurobert M, El Maataoui M, Espagnac H** (1999) Two-dimensional electrophoretic analysis of proteins associated with somatic embryogenesis development in *Cupressus sempervirens* L. *Electrophoresis.* 20(4-5), 1109-

1119.

- Saly S, Joseph C, Corbineau F, Lelu M A, Côme D** (2002) Induction of secondary somatic embryogenesis in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*) as related to ethylene. *Plant Growth Regul.* 37, 287–294.
- Shearer R C** (1989) Seed and pollen cone production in *Larix occidentalis*. In Proc. Int. Workshop on Tropical Tree Seed Research, Gympie, Qld, Australia, Aug. 21-24, 1989, J.W. Turnbull (ed), 14-17.
- Shi J, Zhen Y, Zheng R H** (2010) Proteome profiling of early seed development in *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook. *J. Exp. Bot.* 61, 2367–2381.
- Shmakov V N, Konstantinov Y M** (2020) Somatic embryogenesis in *Larix*: the state of art and perspectives. *Vavilovskii Zhurnal. Genet. Seleksii* 24, 575–588.
- Silveira V, Santa-Catarina C, Balbuena T S, Moraes F M S, Ricart C A O, Sousa M V, Guerra M P, Handro W, Floh E I S** (2008). Endogenous abscisic acid and protein contents during seed development of *Araucaria angustifolia*. *Biol. Plant.* 52, 101–104.
- Singh H** (1978) Embryology of gymnosperms. Gebrüder Borntraeger, Berlin, 1–302.
- Slobodník B, Guttenberger H** (2005) Zygotic embryogenesis and empty seed formation in European larch (*Larix decidua* Mill.). *Ann. For. Sci.* 62, 129–134.
- Smolikova G, Leonova T, Vashurina N, Frolov A, Medvedev S** (2020) Desiccation tolerance as the basis of long-term seed viability. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 101.
- Song Y, Zhen C, Zhang H G, Li S J** (2016) Embryogenic callus induction and somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Larix olgensis*. *Sci. Silvae Sin.* 52(10), 45-54.
- Stasolla C, Kong L, Yeung E C, Thorpe T A** (2002) Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology. In *Vitro Cell. Dev. Biol.* 38, 93–105.
- Swamy P M, Smith B N** (1999) Role of abscisic acid in plant stress tolerance. *Current Sci.* 76(9), 1220-1227.
- Tetlow I J** (2011) Starch biosynthesis in developing seeds. *Seed Sci. Res.* 21, 5–32.
- Teyssier C, Grondin C, Bonhomme L, Lomenech A M, Vallance M, Morabito D, Label P, Lelu-Walter M A** (2011) Increased gelling agent concentration promotes somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix x eurolepis*): a 2-DE proteomic analysis. *Physiol. Plant.* 141, 152–165.
- Teyssier C, Maury S, Beaufour M, Grondin C, Delaunay A, Le Metté C, Ader K, Cadene M, Label P, Lelu-Walter M A** (2014) In search of markers for somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix x eurolepis*): global DNA methylation and proteomic analyses. *Physiol. Plant.* 150, 271–291.
- Thompson R G, von Aderkas P** (1992) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of western larch. *Plant Cell. Rep.* 11(8), 379-85.
- Tigabu M** (2003) Characterization of forest tree seed quality with near infrared spectroscopy and multivariate analysis. Thesis. Umeå, ISBN 91-576-6508-7.
- Tigabu M, Odén P C, Lindgren D** (2005) Identification of seed sources and parents of *Pinus sylvestris* L. using visible-near infrared reflectance spectra and multivariate analysis. *Trees* 19, 468-476.
- Tigabu M, Odén P C, Shen T Y** (2004) Application of near-infrared spectroscopy for the detection of internal insect infestation in *Picea abies* seed lots. *Can. J. For. Res.* 34(1), 76-84.
- Tisserat B, Esan E B, Murashige T** (1979) Somatic embryogenesis in angiosperms dans: *Horticultural Reviews*, 1–78.

- Tret'yakova I N, Barsukova A V** (2012) Somatic embryogenesis in in vitro culture of three larch species. *Russ. J. Dev. Biol.* 43, 353–361.
- Tsuchikawa S, Kobori H** (2015) A review of recent application of near infrared spectroscopy to wood science and technology. *J. Wood Sci.* 61, 213-220.
- Tsuchikawa S, Ma T, Inagaki T** (2022) Application of near-infrared spectroscopy to agriculture and forestry. *Anal. Sci.* 38, 635-642.
- Tuteja N** (2007) Abscisic acid and abiotic stress signaling. *Plant Signal. Behav.* 2(3), 135-138.
- Verger M, Pâques L E** (1993) Multiplication végétative du mélèze hybride (*Larix x eurolepis* Henry) par bouturage en vrac. *Ann. For. Sci.* 50, 205–215.
- Voelker T, Kinney A J** (2001) Variations in the biosynthesis of seed-storage lipids. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 52, 335–361.
- von Aderkas P** (2002a) *In Vitro* phenotypic variation in larch cotyledon number. *Int. J. Plant Sci.* 163, 301–307.
- von Aderkas P, Klimaszewska K, Bonga J M** (1990) Haploid and diploid embryogenesis in *Larix leptolepis*, *L. decidua*, and their reciprocal hybrids. *Can. J. For. Res.* 20(1), 9-14.
- von Aderkas P, Bonga J, Klimaszewska K, Owens J** (1991) Comparison of larch embryogeny *in vivo* and *in vitro* dans: Ahuja M R (Ed.) *Woody Plant Biotechnology*. Springer US, New York, 139–155.
- von Aderkas P, Rohr R, Sundberg B, Gutmann M, Dumont-BéBoux N, Lelu M A** (2002b) Abscisic acid and its influence on development of the embryonal root cap, storage product and secondary metabolite accumulation in hybrid larch somatic embryos. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 69, 111-120.
- von Aderkas P, Teyssier C, Charpentier J P, Gutmann M, Pâques L, Le Metté C, Ader K, Label P, Kong L, Lelu-Walter M A** (2015) Effect of light conditions on anatomical and biochemical aspects of somatic and zygotic embryos of hybrid larch (*Larix x marschlinii*). *Ann. Bot.* 115(4), 605-115.
- Vondrakova Z, Dobrev P I, Pesek B, Fischerova L, Vagner M, Motyka V** (2018) Profiles of endogenous phytohormones over the course of norway spruce somatic embryogenesis. *Front. Plant Sci.* 9, 1283.
- Wahid N, Bounoua L** (2013) The relationship between seed weight, germination and biochemical reserves of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) in Morocco. *New For.* 44, 385–397.
- Wang W Q, Liu S J, Song S Q, Møller I M** (2015) Proteomics of seed development, desiccation tolerance, germination and vigor. *Plant Physiol. Biochem.* 86, 1-15.
- Webster F B, Roberts D R, Mcinnis S M, Sutton B C S** (1990) Propagation of interior spruce by somatic embryogenesis. *Can. J. For. Res.* 20, 1759–1765.
- Wehmeyer N, Hernandez L D, Finkelstein R R, Vierling E** (1996) Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. *Plant Physiol.* 112, 747–757.
- Wehmeyer N, Vierling E** (2000) The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. *Plant Physiol.* 122, 1099–1108.
- Wolff R L, Lavalie O, Pédrone F, Pasquier E, Deluc L G, Marpeau A M, Aitzetmüller K** (2001) Fatty acid composition of pinaceae as taxonomic markers. *Lipids* 36, 439–451.
- Wright J W** (1976) Population genetics—selection dans: *Introduction to Forest Genetics*. Elsevier, 47–63.
- Xu C, Shanklin J** (2016) Triacylglycerol metabolism, function, and accumulation in

- plant vegetative tissues. *Annu. Rev. Plant Biol.* 67, 179–206.
- Yang X, Zhang X** (2010) Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 29(1), 36-57,
- Zhao J, Li H, Fu S, Chen B, Sun W, Zhang J, Zhang J** (2015) An iTRAQ-based proteomics approach to clarify the molecular physiology of somatic embryo development in Prince Rupprecht's larch (*Larix principis-rupprechtii* Mayr). *PLOS ONE* 10(3), e0119987.
- Zhen Y, Ji S S, Zhao Z Z, Xu S P, Wang Z J, Zheng R H** (2010) Proteomic analysis of seed development in chinese Fir (*Cunninghamia lanceolata*). *Russ. J. Plant Physiol.* 57, 560–567.
- Zhu T, Wang J, Hu J, Ling J** (2022) Mini review: application of the somatic embryogenesis technique in conifer species. *For. Res.* 2, 18.
- Zwack P J, Rashotte A M** (2015) Interactions between cytokinin signalling and abiotic stress responses. *J. Exp. Bot.* 66, 4863-4871.



## **Chapitre II – Caractérisations biologique et biochimique de la maturation des embryons somatiques de mélèze hybride**

L'un des objectifs clés de l'embryogenèse somatique est l'obtention d'ES de qualité. Chez le mélèze, c'est après 8 semaines de maturation que l'ES cotylédonaire est prélevé pour la mise en germination et le développement en plante (Teyssier et al., 2014). A ce jour, c'est la morphologie des ES qui est le principal critère d'évaluation de leur qualité mais, celui-ci pourrait ne pas être suffisamment objectif et précis. Durant la maturation, les composés de réserve s'accumulent dans le but de fournir de l'énergie pour les processus développementaux ultérieurs tels que la germination et la conversion en plante (Coelho et Benedito, 2008). Ainsi, la composition et l'abondance des réserves dans l'ES va conditionner son devenir et de fait elles peuvent constituer de bons indicateurs pour évaluer la qualité de l'ES. Par conséquent, l'analyse de l'évolution au cours de la maturation de certains paramètres biologiques et biochimiques incluant la capacité germinative, la teneur en eau et les réserves (lipides, protéines, glucides) pourraient fournir des informations utiles et fiables pour évaluer la qualité des ES de mélèze (Teyssier et al., 2014). Les caractéristiques biologiques et biochimiques sont classiquement mesurées en laboratoire par des méthodes parfois laborieuses, chronophages et nécessitant beaucoup de matériel. La spectrométrie infrarouge constitue une technique à la fois rapide, fiable et innovante pour déterminer qualitativement et quantitativement les réserves des ES (Wang et al., 2021). La spectrométrie infrarouge consiste en l'identification de composés biochimiques et se base sur la capacité d'absorption des rayonnements infrarouges par les molécules. Par ailleurs, grâce à la chimiométrie associée aux données spectrales recueillies, il est possible de développer des modèles de calibration. Ces modèles permettront notamment de déterminer de manière quantitative la composition des ES sans passer par une étape de préparation de l'échantillon qui nécessite beaucoup de temps et de ressources. Les mêmes spectres infrarouges peuvent aussi être utilisés pour la classification des ES en fonction de paramètres qualitatifs, dans notre cas le temps de maturation. Ces modèles sont basés sur la reconnaissance de zones spectrales spécifiques. Les échantillons sont identifiés et classés en fonction des similitudes et différences au niveau des spectres associés aux différents échantillons. In fine, ces modèles permettront de disposer d'un outil d'aide à la prise de décision pour la récolte d'ES de qualité.

Dans ce chapitre, les objectifs sont (1) d'étudier l'évolution de la composition biochimique des ES de mélèze hybride au cours de leur maturation (2) de développer des modèles de calibration en spectrométrie infrarouge pour prédire les teneurs en eau, en lipides, en protéines et en glucides et (3) de développer des modèles de calibration en spectrométrie infrarouge pour discriminer les ES en fonction de leur stade de maturité.

L'étude des caractéristiques des ES a été réalisée au cours de leur maturation, soit de 0 à 13 semaines, au niveau biologique (poids frais, poids sec, teneur en eau, germination) et biochimique (lipides, protéines, glucides). L'ensemble de ces

paramètres mesurés nous renseignent sur l'état de maturité des ES. Grâce aux données acquises lors de cette caractérisation, il est possible de développer des modèles de calibration en spectrométrie infrarouge permettant la prédiction de ces paramètres. Ces modèles constituent des outils puissants pour faciliter la caractérisation des ES en raison des nombreux avantages que procure cette méthode par rapport aux méthodes classiques d'évaluation en laboratoire. De plus, des modèles permettant la classification des ES ont aussi été développés. Ces derniers permettent de discriminer les ES en fonction de leur temps de maturation en se basant sur des paramètres qui ne sont pas forcément mesurés en laboratoire. Ces modèles pourront servir d'outil d'aide à la décision pour la récolte d'ES de qualité, c'est-à-dire des ES ayant des caractéristiques similaires aux ES de 8 semaines.

Nous avons travaillé sur deux lignées embryogènes demi-frères, les lignées Q10 et N23. Le plan des expérimentations ainsi que les analyses réalisées sont présentés dans la figure II.1.

La caractérisation complète de la maturation concernant des paramètres biologiques (teneur en eau, germination) ainsi que les principales réserves (lipides, protéines, glucides) n'a jamais été réalisée et complètent celle partielle effectuée. De plus, le développement de modèles de calibration en spectrométrie infrarouge pour les ES de mélèze est une première et constitue l'originalité du travail.

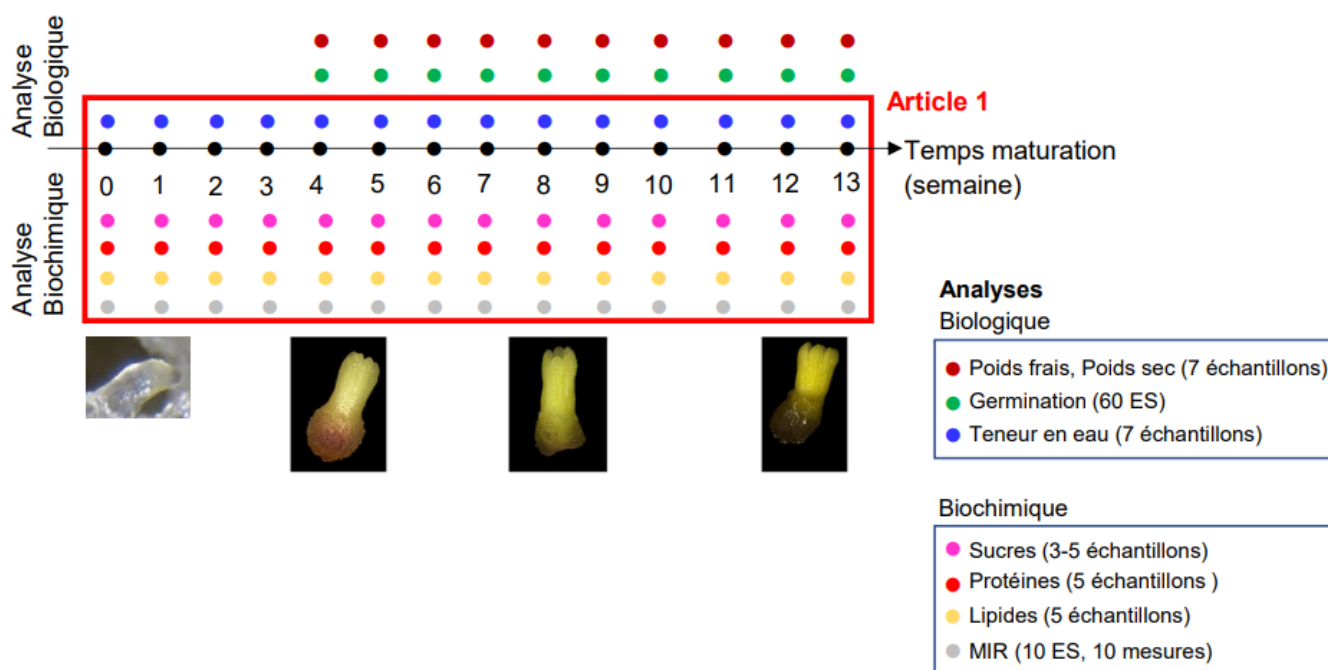


Figure II.1. Plan expérimental des analyses réalisées dans le chapitre 1. ES : embryons somatiques ; MIR : spectres moyen infrarouge.

## **II.1. Publication**

Article publié dans *Physiologia Plantarum* : doi: 10.1111/ppl.13966.

## ORIGINAL RESEARCH

# Characterization of hybrid larch somatic embryo maturation by biochemical analyses and by a novel, fast mid-infrared approach

Parisa Savane  | Nassim Belmokhtar  | Armelle Delile  | Nathalie Boizot  |  
Céline Ridet  | Marie-Anne Lelu-Walter  | Caroline Teyssier 

INRAE, ONF, BioForA, Orléans, France

**Correspondence**

Caroline Teyssier, INRAE, ONF, BioForA, UMR 0588, F-45075 Orléans, France.

Email: [caroline.teyssier@inrae.fr](mailto:caroline.teyssier@inrae.fr)

**Funding information**

Region Centre-Val de Loire, Grant/Award Number: 2019 00135978

Edited by Y. Jiao

**Abstract**

The morphology of somatic embryos (SE) is not a sufficient criterion to determine the level of maturation and the optimal stage to transfer embryos for germination, unlike the biochemical components. This composition characterization in the laboratory is too restrictive to be considered at each maturation cycle, as would be necessary. It is, therefore, essential to consider alternative methods. The objectives of this work were to achieve a complete biochemical characterization of the embryos during their development, to serve as a reference and develop a characterization based on infrared spectrometry and chemometrics. During the precotyledonary stage (0–3 weeks of maturation), water content and glucose and fructose levels were high, which is consistent with SE development. After 4 weeks, the cotyledonary SE had a metabolism oriented towards the storage accumulation of lipids, proteins and starch, whereas raffinose only appeared from 8 weeks. Mid-infrared calibration models were developed for water, proteins, lipids, carbohydrates, glucose, fructose, inositols, raffinose, stachyose and starch contents with an  $r^2$  average of 0.84. A model was also developed to discriminate the weeks of SE maturation. Different classes of age were discriminated with at least 72% of accuracy. Infrared analysis of the SE based on their full biochemical spectral fingerprint revealed a very slight variation in composition between 7 and 9 weeks, information that is very difficult to obtain by conventional analysis methods. These results provide novel insights into the maturation of conifer SE and indicate that mid-infrared spectrometry could be an easy and effective method for SE characterization.

**1 | INTRODUCTION**

Somatic embryogenesis is a clonal propagation method that permits the production and multiplication of a high number of somatic embryos (SE) that can be converted into plants. This process offers a powerful tool to massively propagate coniferous plants and to release improved varieties (Lelu-Walter et al., 2013). Considerable research has been conducted on somatic embryogenesis in larch species (Lelu-Walter et al., 2016), especially in hybrid larch, *Larix × eurolepis*, which

shows a certain hybrid vigour (Pâques, 1992). The production of SE involves many phases, including initiation, proliferation, maturation, germination, acclimatization and growth until planting (Lelu-Walter & Pâques, 2009). One of the crucial steps in somatic embryogenesis is the production of high-quality SE at the end of the maturation. Traditionally, morphology has been used to assess the quality of SE, but this method can be tricky and subjective. During maturation, the accumulation of storage compounds becomes increasingly efficient, and these compounds provide energy for further important developmental

processes, including germination and conversion into plants (Coelho & Benedito, 2008). In conifers, they are mainly proteins and lipids. The soluble carbohydrates are involved in many cellular processes such as osmotic regulation, energy providing and molecular structure protection. Following their profile through the maturation gives important information about its progression (Lipavská & Konrádová, 2004). Hence, analyses of the temporal evolution of some biological and biochemical indicators, including water content and storage compounds such as proteins, lipids, soluble carbohydrates and starch, could give insights into SE development and reveal some consistent information to evaluate SE quality reliably (Teyssier et al., 2014). The biochemical characterization of SE is routinely carried out in the laboratory, but it is laborious, time-consuming and produces large amounts of waste. It sometimes requires a high quantity of samples, making sample preparation very tedious. To overcome these limitations, alternative methods are needed for qualitative and quantitative analyses, such as infrared spectroscopy, which is fast, clean and cost-effective (Wang et al., 2022). The characterization of the embryos by this method is based on the use of calibration curves (called prediction models) on the infrared absorbance of the samples. Infrared spectroscopy consists of the measurement of the interaction of light with the organic matter. Two main infrared regions can be used for analyses depending on the type of interaction with the molecules: near-infrared (range from 10,000 to 4000  $\text{cm}^{-1}$ ) and mid-infrared (mid-IR; range from 4000 to 600  $\text{cm}^{-1}$ ). In the present paper, the latter was coupled to attenuated total reflectance, and Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FT-IR), resulting in time analysis and signal-to-noise ratio decrease (Gordon, 2011). The main drawback of ATR-FT-IR is the need to apply significant pressure to the analysed samples, which results in their destruction.

The spectra obtained by mid-IR spectroscopy on a heterogeneous material provide averaged structure information containing a high-resolution and specific absorption band due to more intense fundamental modes of vibration, reflecting, among other things, water, protein, lipid, and carbohydrate content (Williams & Norris, 2021). Mid-IR spectra are complex, often containing many overlapping peaks and baseline variations, thus requiring chemometric tools to extract useful information and improve the correlation between spectral changes and reference data obtained in the laboratory (Ferreira et al., 2014; Workman & Weyer, 2007). Thus, mid-IR spectroscopy coupled with chemometrics can be used to quantitatively determine the biochemical composition of new biological samples without a preparation step, which is time-consuming and resource-intensive. Infrared spectroscopy is already used routinely in the food, chemical and pharmaceutical industries nowadays for quality control and the identification of chemical compounds (Otsuka, 2020; Qu et al., 2015). It is also applied to agricultural products and forest materials such as fruits, wood (Pulkka et al., 2016) and seeds (Tsuchikawa et al., 2022; Tsuchikawa & Kobori, 2015), demonstrating that this method is widely applicable to various types of complex material and a wide range of fields.

Mid-IR spectra can also be used for classification to discriminate classes according to qualitative parameters. Samples are identified and classified according to similarities and differences among spectra

from the different types of samples. Many studies have demonstrated the capacity of infrared spectroscopy to discriminate among sets of forest materials according to qualitative parameters, including seed sources (Farhadi et al., 2016; Tigabu et al., 2005), seed provenance (Farhadi et al., 2017) and seed viability (Farhadi et al., 2015; Tigabu, 2003; Tigabu et al., 2004). Monitoring SE maturation stages before harvest is important to ensure maximum SE quality. The best collection time for hybrid larch SE is considered to be around 8 weeks of maturation, according to storage protein profiles and abundance (Teyssier et al., 2014).

A growth lag between SE development can sometimes be observed between maturation cycles; however, depending on environmental and/or biological factors, shifting the optimal collection time by the same duration. Mid-IR spectra can be used to develop a model for the discrimination of SE based on the time of maturation, helping the decision-making for harvesting at the best collection time. However, the predictive ability of these models is closely related to the SE used during the training step, which limits their generalization. The use of independent validation sets composed of different lines (or species) of SE representative of the future samples is mandatory to assess the model's robustness. Much like a standard range for a particular assay, establishing a pattern per sample type enables rapid prediction of samples of that type.

The aims of this paper were first to study the evolution of hybrid larch SE biochemical composition during maturation and to develop mid-IR calibration models for the prediction of water, protein, lipid, soluble carbohydrates and starch content. Then, we aimed to develop models to discriminate SE depending on the time they spent in the maturation medium in order to facilitate the comparison of SE based on their developmental status. For this purpose, SE were characterized for their biochemical constituents during maturation using traditional laboratory methods (Lefebvre et al., 2022; Morel, Teyssier, et al., 2014; Teyssier et al., 2011). At the same time, different samples were taken to develop calibration models in fresh SE based on mid-IR spectra obtained from a single hybrid larch SE. The chemometric approach applied here was based on the pre-processing of the spectra (Rinnan et al., 2009) and the use of Partial Least Squares Regression (PLS-R) and Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA) algorithms. This is the first complete biochemical characterization of hybrid larch SE maturation, including analyses of the main storage compounds (lipids, proteins and carbohydrates). To our knowledge, it is also the first time that quality parameters of conifer SE have been determined and their maturation times discriminated using mid-IR spectroscopy. This work provides new insights into understanding the process of SE maturation and opens up new possibilities to evaluate SE characteristics.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Culture of SE

Experiments were conducted with two half-sib embryogenic lines (Q10 and N23) of hybrid larch *L. eurolepis* from the REVE-VERT family

obtained at INRAE Orléans, France, from immature zygotic embryos (Lelu-Walter & Pâques, 2009). Embryonal masses (EMs) were subcultured in clumps every 2 weeks onto fresh proliferation medium, which consisted of basal MSG medium (Becwar et al., 1990) supplemented with 9  $\mu\text{M}$  2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2.3  $\mu\text{M}$  6-benzyladenine and 60 mM sucrose, solidified with 4  $\text{g L}^{-1}$  gellan gum (Phytigel TM, Sigma-Aldrich). EMs were multiplied according to the proliferation method previously described (Lelu-Walter & Pâques, 2009). Two-week-old proliferating EMs were collected and suspended in liquid proliferation medium, vigorously shaken to break them up into a fine suspension, and poured as a thin layer onto a filter paper (Whatman No. 2) in a Büchner funnel. A low-pressure pulse was applied to drain the liquid, and the filter paper with attached cells was placed on the surface of fresh proliferation medium. Maturation of SE was carried out according to Lelu-Walter and Pâques (2009). Briefly, 10-day-old EMs actively growing on filter paper were weighed, dispersed into liquid MSG medium with no plant growth regulator, and distributed onto a filter paper disc as previously described for the proliferation step. Filter paper discs with dissociated EMs (approximately 80–150 mg fresh weight [FW]) were transferred onto MSG basal medium containing 0.2 M sucrose, 1  $\mu\text{M}$  indolebutyric acid, 60  $\mu\text{M}$  *cis-trans* ( $\pm$ )-abscisic acid (ABA) and 8  $\text{g L}^{-1}$  gellan gum. Maturation was conducted in darkness at 23°C. After transfer onto the ABA maturation media, SE underwent maturation. After 0, 1, 2 and 3 weeks, precotyledonary SE were too small to be collected without the surrounding suspension part, but from 4 weeks until 13 weeks, they were cotyledonary and isolated from the rest of the culture. Biological replicates were obtained by harvesting embryos from different Petri dishes containing material at the same maturation stage. Harvested SE were weighed and directly frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until required for biochemical analysis. The samples destined for water content measurements were used immediately after harvest.

## 2.2 | Water content of SE

At each collection date, the samples were immediately weighed after harvest to determine their FW, between 200 and 100 mg for precotyledonary SE at early stages and about 15 mg for cotyledonary SE. The dry weight (DW) was determined after oven-drying at 70°C for 24 h. Their water content was calculated as  $(\text{FW} - \text{DW})/\text{DW}$  and expressed as  $\text{g H}_2\text{O g}^{-1}$  DW (Dronne et al., 1997). Seven samples were assayed for each developmental stage.

## 2.3 | Determination of soluble carbohydrates, starch, total protein and total lipid contents

### 2.3.1 | Carbohydrates and starch

Soluble sugars were extracted as described by Välimäki et al. (2022). SE (approximately 200 mg FW for SE at early stages and 50 mg FW

for cotyledonary SE) were freeze-dried and ground in 1 mL 80% aqueous ethanol containing 0.25  $\text{mg mL}^{-1}$  mannitol as an internal standard, and the extracts were heated for 30 min at 80°C. After centrifugation, the supernatants were purified on activated charcoal and polyvinylpyrrolidone to remove proteins and polyphenols. After two successive extractions with 80% ethanol without mannitol, the purified supernatants were combined. After drying under vacuum, the residues were resuspended in 100  $\mu\text{L}$  ultra-pure  $\text{H}_2\text{O}$ . Samples (10  $\mu\text{L}$ ) were injected and eluted with ultra-pure  $\text{H}_2\text{O}$  at a flow rate of 0.6  $\text{mL min}^{-1}$  and analysed by HPLC (HPLC VWR-HITACHI Chromaster) using a Rezex column (RPM-Monosaccharide  $\text{Pb}^{2+}$ , 8%, 300  $\times$  7.8 mm, Phenomenex) maintained at 85°C, and equipped with an ELSD 85 detector (VWR Hitachi with the following parameters: Temperature 60°C; Gain 5; Offset 0; Filter 6 s; sampling time 100 ms-10 Hz; nitrogen pressure 3.5 bar). The various sugars were identified by co-elution with standards (Sigma, USA). The peak areas were acquired and processed with OpenLAB CDS software version EZChrom. Results were expressed as  $\mu\text{g mg}^{-1}$  DW and corresponded to the mean of 3 or 5 biological repetitions  $\pm$  SE. Determination of starch content was assayed from the resulting pellets obtained after extraction of soluble sugars. The pellets were dried and incubated for 2 h at 95°C in 0.02 M NaOH. After cooling to room temperature, amyloglucosidase from *Aspergillus niger* (SIGMA) was added to reduce starch to glucose and the samples were incubated for 1 h at 50°C. Starch content was quantified as glucose equivalents from the supernatants (Välimäki et al., 2022). Each sample was assayed in triplicate.

### 2.3.2 | Total protein

Frozen SE (about 20 mg f.w.) was homogenized with 0.5 mL of lysis buffer (10% [v/v] glycerol; 2% [w/v] SDS; 5% [v/v]  $\beta$ -mercapto-ethanol; 2% [w/v] poly(vinyl) pyrrolidone; 50 mM Tris pH 6.8). The samples were incubated for 5 min at 95°C, then centrifuged for 10 min at 16707 g and the supernatants were collected. After a second extraction, the two supernatants were combined and protein concentration was determined using the Bradford assay with bovine serum albumin as standard. Results were expressed as  $\mu\text{g mg}^{-1}$  FW and corresponded to the mean of five biological repetitions  $\pm$  SE. The extracted proteins (10  $\mu\text{g}$ ) were separated by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on a 12% gel with stacking gel (4%) following standard protocols in the presence of 10  $\mu\text{g}$  of total protein extract of megagametophyte from REVE-VERT family seed from the experiment made in Teyssier et al. (2014). The gel was stained for proteins with colloidal Coomassie brilliant blue G-250 (CBB-G).

### 2.3.3 | Total lipid

Total lipid was extracted according to Lefebvre et al. (2022). Extractions were carried out using freeze-dried SE (about 20 mg FW) ground with 0.5 mL chloroform:methanol (1:2). For lipid concentration

determination, the supernatants were collected and the extracts (20  $\mu\text{L}$ ) were evaporated at 90°C. After adding 660  $\mu\text{L}$  98% sulphuric acid, the samples were vigorously shaken before incubation for 2 min at 90°C, and then 340  $\mu\text{L}$  of reagent containing 0.2  $\text{mg mL}^{-1}$  vanillin in 17% orthophosphoric acid were added. Samples were again vigorously shaken and placed at room temperature for 10 min before the optical density measurement at 525 nm corresponding to the absorption of the complex formed by the reaction between the carbonium ion (produced by the reaction between lipids and sulphuric acid) and the carbonyl group of phospho-vanillin. Lipid concentration was determined using sunflower oil as standard. Results were expressed as  $\mu\text{g mg}^{-1}$  DW and corresponded to the mean of five biological repetitions  $\pm$  SE.

## 2.4 | Spectral acquisition

Mid-infrared spectra were collected using the Attenuated Total Reflectance accessory of the Frontier spectrometer (Perkin Elmer, USA). Measurements were recorded from fresh SE either with surrounding suspensors for the early stages of maturation (0–3 weeks of maturation) or isolated cotyledonary SE for later stages (4–13 weeks of maturation). All these spectra were acquired in the mid-IR region from 650 to 4000  $\text{cm}^{-1}$  with a spectral resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$  and a zero-filling factor of 4, resulting in an interval of 1  $\text{cm}^{-1}$  between data points. For each sample, four scans were acquired and averaged to give a single spectrum computed as  $\text{Log}(1/R)$ , then expressed in absorbance. Our method does not require any sample preparation.

## 2.5 | Spectral pre-processing

Pre-processing methods are widely performed in chemometrics to reduce or remove artifacts from spectral data, such as systematic noise due to instrumental drift, light scattering, baseline shift, sample state and moisture content that could introduce variations that are not correlated with the biochemical composition of the samples (Engel et al., 2013; Mishra et al., 2020; Roger et al., 2020). To improve the efficiency of prediction models, we applied various pre-processing techniques using the R software (version 4.1.3, © 2009–2022 RStudio, PBC). One of the first steps is often baseline correction using the detrend and Savitzky–Golay based first and second derivative methods available in the R package *rchemo* (Lesnoff, 2021). We also corrected the light-scatter effect by applying standard normal variate (SNV) and Multiplicative Scatter Correction (MSC) available in the *rchemo* and *pls* R packages, respectively. A combination of baseline and global intensity correction was also performed. The appropriate pre-processing method is defined for each model based on the cross-validation performances.

## 2.6 | Multivariate analysis of spectral data

Principal Component Analysis (PCA) is used to identify the most significant directions of variability in the multivariate spectral data by

decomposing them into several principal components (PCs). This allows to highlight the proximity and differences between spectra. The used functions were provided by the R package *ade4* (Dray & Dufour, 2007).

PLS-R analysis prediction models and PLS discriminant analysis (PLS-DA) were developed using 10 spectra for each maturation age and genotype. They were calculated by the R software (version 4.1.3, © 2009–2022 RStudio, PBC). Both methods were carried out using functions provided by the R package *rchemo* (Lesnoff, 2021) between 1 and 20 latent variables (LVs) (Mevik & Wehrens, 2015).

The calibration models using the PLS-R method were developed to predict biological and biochemical compounds quantitatively. For each model, the best spectra pre-processing and the optimal number of LVs were chosen according to cross-validation and the RMSECV corresponding to the root mean square error of cross-validation. The performance of the models was characterized using  $r^2_{\text{cal}}$  and Root Mean Square Error of Prediction (RMSEP).  $r^2_{\text{cal}}$  ought to be as close as possible to 1, while the RMSEP considered as a parameter for judging the predictive ability of a calibration model has to be as low as possible for the model to be accepted as reliable. PLS-DA models were selected based on the overall accuracy of the model.

Locally weighted PLS (LW-PLS-R) was calculated with the Chem-Flow application (Rossard et al., 2016).

## 2.7 | Statistical analyses

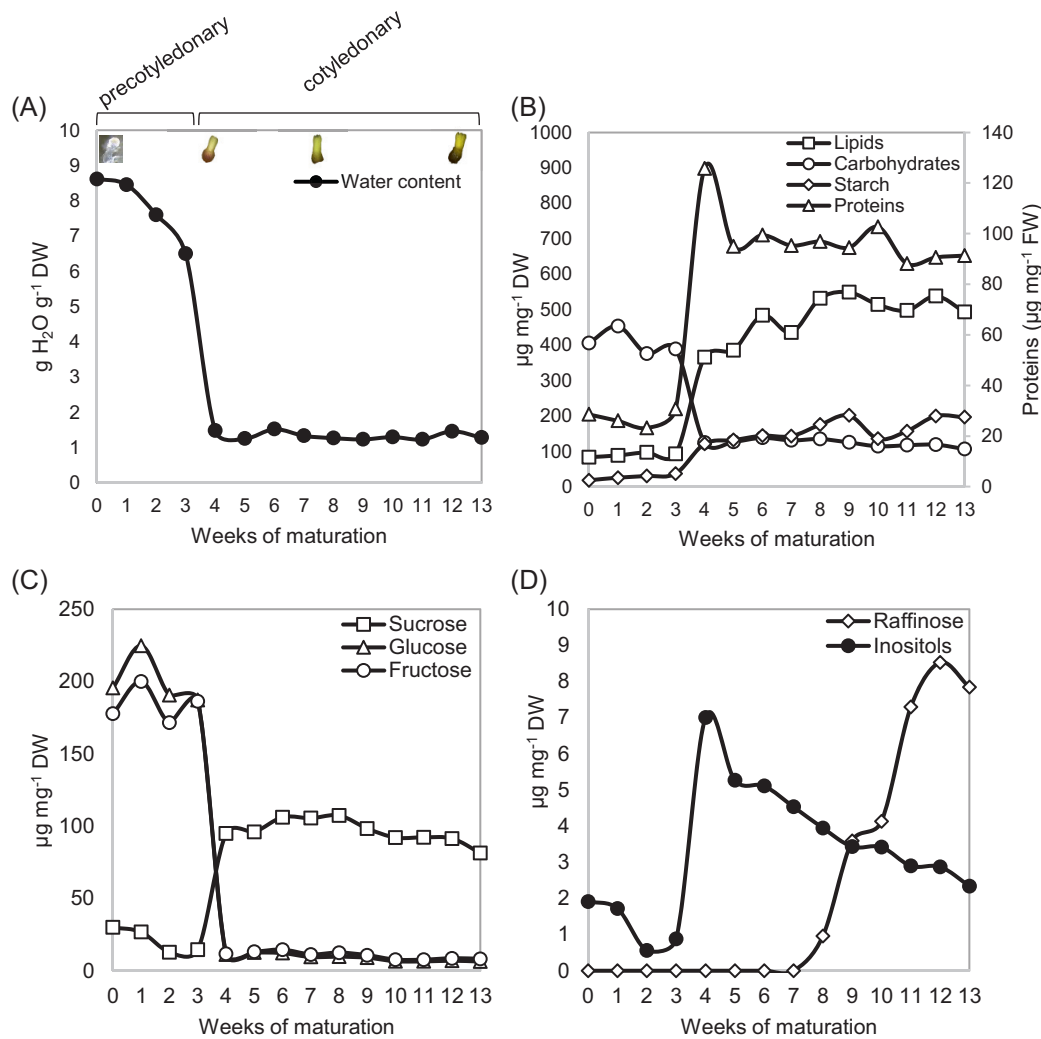
Statistical analyses were conducted using the R software (version 4.1.3, © 2009–2022 RStudio, PBC). Effects of the treatments on the water, lipid, protein, starch and carbohydrate content were evaluated using one-way ANOVAs. Variations of these parameters in relation to the maturation stages were analysed with multiple comparisons of means with Tukey contrasts ( $p < 0.05$ ).

# 3 | RESULTS

## 3.1 | Evolution of SE biological and biochemical composition during maturation

Significant changes occurred during SE maturation: water content (Figure 1A) and total soluble carbohydrates (Figure 1B) decreased from 4 weeks and then remained stable, while the total proteins, total lipids and starch content increased significantly after 4 weeks. A two-way ANOVA was performed to test the influence of SE embryogenic lines and weeks of maturation on the water content, lipid, protein, soluble carbohydrates and starch contents (Table 1). The ANOVA highlighted that the strongest significant effect was the number of weeks of maturation (at least 85%) compared to the effect of the embryogenic lines. The interaction between weeks of maturation and the SE embryogenic line explained less than 7% of the variance of the SE composition. In contrast, protein content was as dependent on the embryogenic cell line as on the age of maturation.





**FIGURE 1** Changes in the biological and biochemical contents of hybrid larch somatic embryos during maturation. (A) Morphological aspect of SE and their respective developmental stage and time course changes of water content (●). (B) Time course changes of total lipid content (□), total protein content (△), total soluble carbohydrate content (◊) and starch content (◊) in hybrid larch somatic embryos. (C) Variation of sucrose content (□), glucose content (△) and fructose content (◊). (D) Variation of raffinose content (◊) and inositols content (●) in hybrid larch somatic embryos according to maturation time. Means are from 5 to 14 biological replicates for the two somatic embryos lines combined.

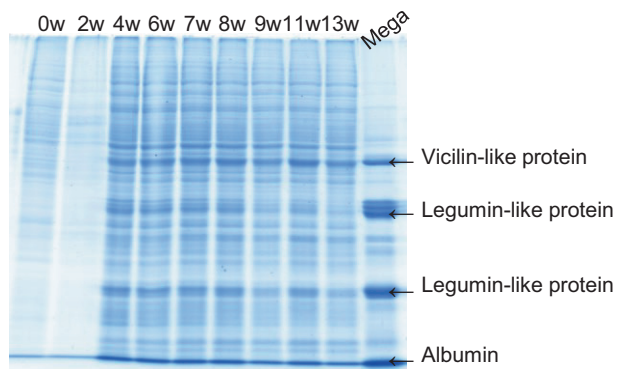
**TABLE 1** Percentage of effect according to ANOVA analyses for compounds measured in hybrid larch somatic embryos during maturation (mat.).

	Week of mat.	Line	Interaction week of mat.:Line
Carbohydrates	96.23	0.31	1.35
Lipids	92.84	0.01	3.02
Proteins	45.28	42.56	5.46
Water content	96.78	1.07	2.05
Fructose	97.24	0.08	1.47
Glucose	98.12	0.04	0.78
Inositols	85.14	1.82	5.74
Raffinose	87.08	1.21	6.41
Starch	89.84	1.33	3.21
Sucrose	89.39	5.51	0.55

The profile of soluble carbohydrates changed significantly during SE maturation with higher levels of sucrose, glucose and fructose (Figure 1C) than of raffinose and inositols (Figure 1D). Sucrose content

was low in precotyledonary SE, then increased to  $94.9 \mu\text{g mg}^{-1} \text{DW}$  from 4 weeks on and remained stable (Table S1). On the other hand, glucose and fructose contents showed a higher level from 0 to





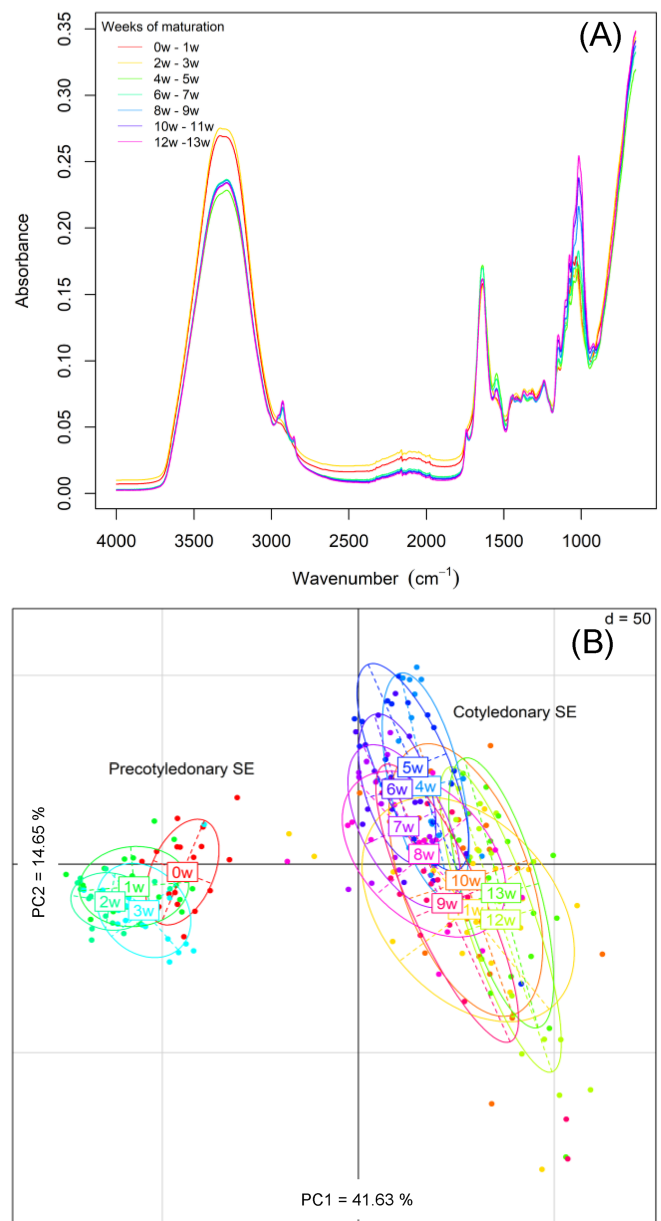
**FIGURE 2** SDS-PAGE total protein pattern of somatic embryos from hybrid larch embryogenic line N23 collected throughout maturation. The storage protein pattern is given by the protein extract of megagametophyte (Mega) from mature (dry) seeds of the same full-sib family. The identifications of major storage proteins are shown on the right.

3 weeks of maturation than for the later times of maturation. At 8 weeks, raffinose appeared, and the content rose significantly until 11 weeks to reach  $7.3 \mu\text{g mg}^{-1}$  DW then stabilized (Figure 1D). Inositols showed a different dynamic: the level was low at the beginning of maturation, peaked at 4 weeks at  $7.0 \mu\text{g mg}^{-1}$  DW and decreased slightly afterwards. The ANOVA analysis for soluble carbohydrates likewise showed a higher effect of weeks of maturation over the effect of embryogenic lines (Table 1).

An electrophoretic assay of total protein extracts was carried out to visualize the profile of protein content in SE during maturation (Figure 2). The major bands of the SE and the megagametophyte in the same hybrid larch variety have already been identified by mass spectrometry, they are easily repairable, thanks to the presence on this gel of the proteins of the megagametophyte (Teyssier et al., 2014). Significant differences between the different maturation times were observed. Among the numerous bands detected in SE, some of them, mainly the major bands, were identified as storage proteins such as vicilin-like protein, legumin-type protein or albumin. Their quantities increased from 4 to 11 weeks of maturation. For albumin, no change in the band intensity was observed during hybrid larch SE maturation. In contrast, the intensities of bands corresponding to vicilin-like protein and legumin-type proteins increased with maturation time.

### 3.2 | Evolution of SE during maturation by mid-IR spectra analyses

The mid-IR absorbance mean spectra of each of the 13 maturation times measured during SE maturation are shown in Figure 3A. Differences in spectral absorbance were observed according to the maturation time in various wavelength areas, around  $3300 \text{ cm}^{-1}$ ,  $2930 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1700 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1550 \text{ cm}^{-1}$  and  $1000 \text{ cm}^{-1}$ , and great differences can be observed in the absorbance level depending on the maturation times,



**FIGURE 3** Mid-IR absorbance spectra and resulting PCA of SE during their maturation. (A) Mean absorbance SNV-treated spectra of the 13 somatic embryos maturation times. (B) Scatter plot PC1 versus PC2 scores of the 13 somatic embryos maturation times.

especially between precotyledonary and cotyledonary SE. These differences in absorbance may be explained by the differences in the SE biochemical composition at the different maturation times and could be related to the variations of the content in the biological and biochemical analyses carried out.

The PCA score plot on the first two PCs highlighted a full separation between precotyledonary and cotyledonary SE along the second component, which explained 14.65% of the variation between samples (Figure 3B). The first group, the negative side, comprises 0- to 5-week-old SE, while the second, the positive side, consists of samples from other stages. Furthermore, we distinguish a separation

**TABLE 2** Statistics for the prediction of biological and biochemical content in hybrid larch somatic embryos using PLS-R method.

Trait	Precoty + coty			Precoty			Coty		
	<i>n</i>	$r^2_{cal}$	RMSEP	<i>n</i>	$r^2_{cal}$	RMSEP	<i>n</i>	$r^2_{cal}$	RMSEP
Carbohydrates				80	0.84	3.04	200	0.67	2.91
Lipid				80	0.96	0.43	200	0.77	13.43
Protein				80	0.96	3.70	200	0.89	10.66
Water content				80	0.96	0.25	179	0.65	0.08
Fructose	280	0.92	2.33						
Glucose	280	0.95	2.10						
Inositols				80	0.72	0.03	200	0.89	0.20
Raffinose				nd	nd	nd	110	0.91	0.33
Starch				80	0.94	0.31	200	0.74	6.87
Sucrose				80	0.90	0.26	200	0.69	2.59

Note: Only the statistical results of the best prediction models are given, obtained with the data from all the precotyledonary and cotyledonary somatic embryos (Precoty + coty), or with the distinction of their developmental stage: precotyledonary (Precoty) or cotyledonary (Coty).

Abbreviations: *n*, number of samples; nd, not determined; PLS-R, Partial Least Squares Regression;  $r^2_{cal}$ ,  $r^2$  of calibration; RMSEP, root mean square error of prediction.

between 1- to 3-week-old SE on the negative side and 4- to 6-week-old SE on the positive side of the first component (41.36% of variation).

The PCA loadings analysis revealed the importance of the wavenumbers 1550, 1450, 1400 and 1350  $\text{cm}^{-1}$  on the separation of groups of spectra on the first PC (Figure S1). On the second PC, the following wavenumbers have been identified as the most impacting the clustering of samples: 3250, 2050, 2000, 1950, 1900, 1800 and 1450  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.3 | Prediction of SE biological and biochemical composition

By PLS-R predictive analysis, we developed two models to determine glucose and fructose contents for the entire range of sample ages. The statistics of these models are shown in Table 2. The two models yielded excellent coefficients of determination ( $r^2_{cal}$  from 0.92 to 0.95 and prediction errors RMSEP from 2.10 to 2.33). For the prediction of water, protein, lipid, starch, total soluble carbohydrates, sucrose, inositols and raffinose contents, it was not possible to develop a unique model for all the samples in the precotyledonary and cotyledonary SE stages, as there were not sufficient reference values to cover the entire range. It was therefore necessary to develop two separate models, one for precotyledonary SE and the other for cotyledonary SE (Table 2). For all the traits except for inositols, the calibration models performed better for precotyledonary SE ( $r^2_{cal}$  varying in the range of 0.80–0.96) than for cotyledonary SE ( $r^2_{cal}$  varying in the range of 0.65–0.77). Conversely, the model developed for the prediction of inositol content showed better performance for cotyledonary SE ( $r^2_{cal} = 0.89$ ) than for precotyledonary SE ( $r^2_{cal} = 0.72$ ). Raffinose was only found in cotyledonary SE, so the calibration model was exclusively developed for this material.

**TABLE 3** Performance of PLS-DA models developed for identifying the class corresponding to weeks of maturation of hybrid larch somatic embryos by mid-IR spectroscopy.

Weeks of maturation	Class	<i>n</i>	Prediction accuracy (%)
0, 1, 2, 3	A	80	100
4, 5, 6	B	99	85.9
7, 8, 9	C	120	85.8
10, 11, 12, 13	D	120	71.7

Abbreviation: *n*, number of samples.

This model presented a high performance, with  $r^2_{cal}$  reaching 0.91 and a RMSEP of 0.33. (Table 2). We also tested the statistical method LW-PLS-R (Lesnoff et al., 2020) for grouped samples (Table S2). Using the measurement error made by the predictive model (RMSEP) as a tool to compare the two statistical models (Locher et al., 2005), it was found that their performance was equivalent.

### 3.4 | Discrimination of SE depending on the age of the SE

Two PLS-DA models based on mid-IR spectra were developed to discriminate SE weeks of maturation, which corresponds to the age of the SE. The first prediction model included all weeks of maturation, which were grouped into classes that have a physiological meaning, that is, a grouping based on the biochemical composition of SE. This grouping was intended to increase the discrimination ability of the model. SE from 0- to 3- week-old were grouped in class A, 4- to 6-week-old SE were assigned to class B, 7- to 9-week-old SE were assigned to class C and finally, older SE from 10- to 13-week-old were grouped in class D (Table 3).

**TABLE 4** Confusion matrix of PLS-DA classification expressed as percentage according to class corresponding to weeks of maturation (real class) of hybrid larch somatic embryos.

		Real class			
		A	B	C	D
Predicted class	A	<b>100</b>	0	0	0
	B	0	<b>86</b>	3	0
	C	0	13	<b>86</b>	28
	D	0	1	11	<b>72</b>

Note: The values in bold correspond to the correct predictions of each class.

**TABLE 5** Performance of PLS-DA models developed to identify hybrid larch somatic embryo maturation time by mid-IR spectroscopy based on maturation times from 6 to 9 weeks.

Weeks of maturation	<i>n</i>	Prediction accuracy (%)
6	49	85.7
7	40	60.0
8	40	65.0
9	40	62.5

Abbreviation: *n*, number of samples.

**TABLE 6** Confusion matrix of PLS-DA classification expressed as percentage according to maturation times of hybrid larch somatic embryos from 6 to 9 weeks.

		Real weeks			
		6	7	8	9
Predicted weeks	6	<b>86</b>	7.5	2.5	2.5
	7	8	<b>60</b>	17.5	2.5
	8	6	25	<b>65</b>	32.5
	9	0	7.5	15	<b>62.5</b>

Note: The bold values in bold correspond to the correct predictions of each class.

According to cross-validation and the misclassification error rate, the best classification model was obtained with SNV-treated spectra and 12 LVs. The overall accuracy of the model in assigning SE weeks of maturation to their respective classes was 84%, with an error rate of 16%. PLS-DA discriminated classes with varying degrees of accuracy (Table 3). The efficiency of the PLS-DA model in discriminating the different classes can be evaluated by the confusion matrix showing the percentage of correctly classified and misclassified samples (Table 4).

The best-predicted class was clearly class A with 100% accuracy, indicating that the model correctly classified all the samples. It was followed by classes B and C with 86% of well-classified samples. Class D showed the lowest value with 72% of correctly predicted samples and 28% of samples classified as class C when in fact they belonged to class

D. The second PLS-DA model was developed to achieve greater precision in the discrimination of intermediate weeks of maturation, which are the most interesting from a physiological point of view. For this model, only the samples corresponding to 6- to 9-week-old SE were selected. The mean accuracy of the model reached 69.2%. In detail, the prediction accuracy was 86, 60, 65 and 63% for the maturation durations of 6, 7, 8 and 9 weeks, respectively (Table 5).

The values of the ratio of correctly classified and misclassified samples are shown in the confusion matrix (Table 6). The percentages associated with wrongly classified samples were clearly higher for Weeks 7, 8 and 9.

## 4 | DISCUSSION

The aim of this study was to fill the lack of SE characterization in conifers throughout the entire maturation process by analysing the composition of SE in hybrid larch from the 1st to the 13th week of maturation. Considering the benefit of carrying out this characterization for monitoring the maturation process, this study also analyses the feasibility of carrying it out by infrared spectrometry, thus meeting the requirements of speed and simplicity of such analyses.

Maturation comprises two phases, namely the development of the cotyledonary embryos from EMs (precotyledonary phase), and then their preparation for germination by the deposition of storage products to sustain the further germination process and their subsequent conversion into plants (cotyledonary phase) (Coelho & Benedito, 2008). These evolutions in embryo size and morphology are accompanied by changes in biochemical composition, which are both the causes and the consequences of these morphological and functional changes. Our results agree with the literature on the maturation of conifer embryos (Trontin et al., 2016).

Water content decreased significantly, in our results, with weeks of maturation (Figure 1A). Water status is also an important factor implicated in the maturation process and the production of high-quality SE in various species, including both gymnosperms and angiosperms (Klimaszewska & Smith, 1997; Prewein et al., 2004), as a low water loss contributes to stimulating the accumulation of storage compounds (Stasolla et al., 2002). The water content was still high at the end of maturation (about 2 g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> DW), as is usually the case in somatic embryogenesis in conifers (Teyssier et al., 2011). This level, very far from that of the seed after desiccation storage (0.2 gH<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> DW, Lelu et al., 1995), explains why maturation is generally followed by a desiccation treatment (Maruyama & Hosoi, 2012; Pond et al., 2002).

During cotyledonary stages, lipids accumulated from 0 to 13 weeks of maturation (Figure 1B). The proportion of lipids in the embryos reached 54.8% of the DW, in agreement with the fact that lipids, along with proteins, are known to be used as the principal sources of energy in conifer seeds (Silveira et al., 2004). Likewise, after the initiation of cotyledons, proteins accumulated concomitantly with lipids (Brownfield et al., 2007; Joy IV et al., 1991). Their accumulation occurred concomitantly with a decrease in the water content. Their accumulation is important for germination and precocious

seedling vigour (Grigová et al., 2007; King & Gifford, 1997; Tersikh et al., 2005) and their increasing evolution dynamic during maturation can be considered as an indicator of proper embryo development. However, a crucial point not investigated in this study concerns the lipid profile, which is an indicator of SE quality (Brownfield et al., 2007; Hudec et al., 2016; Pescador et al., 2012).

Proteins, amino acids and nitrogen are the main sources of energy for germination and precocious seedling growth. While the quantities of proteins did not change significantly during the cotyledonary phase, a change in the nature of the proteins took place with the accumulation of the storage proteins legumin-like, vicilin-like and albumin, in agreement with the observation in *Pinus strobus* and *Picea abies* (Elišová et al., 2022; Klimaszewska et al., 2004). We highlighted the significant impact of the genotype on the protein content of SE, which may explain the differences in contents obtained during maturation between this study and a previous one for hybrid larch SE (Teyssier et al., 2014).

Starch is not usually considered a storage compound in conifer seeds; nevertheless, we observed starch deposition during cotyledonary stages following the same deposition pattern as lipids from 0 to 13 weeks of maturation (Figure 1B). This accumulation during embryo maturation is highly species-dependent. It has been observed for the somatic and zygotic embryos of *Pinus pinaster* (Tereso et al., 2007), the SE of *Picea glauca* (Joy IV et al., 1991), the mature seed of *Pinus taeda* (Silveira et al., 2004), probably coming from the catabolism of triacylglycerols. But on the other hand, when the zygotic embryos were analysed in *P. taeda*, the starch content decreased during maturity (Pullman & Buchanan, 2008); it was also very low in the zygotic embryos of mature *P. abies* (Elišová et al., 2022).

Carbohydrate type and content varied considerably during the maturation of *Larix* SE, as we observed in this study. Changes in carbohydrate type content during maturation are crucial, and their content contributes to the quality of the SE as they may influence the vigour during seedling establishment via various pathways (Gibson, 2005). Their metabolism during SE maturation is very important since carbohydrates fulfil diverse major roles such as carbon and energy sources, stress protectants, osmotic regulators and signal molecules (Lipavská & Konrádová, 2004). We observed a decrease in total carbohydrate content that could result from the decrease in hexose content, as reported by Lipavská et al. (2000) in *P. abies*. Otherwise, precotyledonary stages were characterized by high levels of glucose and fructose. This profile rich in hexoses is usually associated with cell multiplication (Iraqi & Tremblay, 2001; Weber et al., 1997). When SE reached the cotyledonary stage, an increase followed by a stabilization in sucrose level was observed, whereas hexose levels decreased. As a result, the hexose:sucrose ratio became low, consistent with the promotion of storage functions (Weber et al., 1996; Wobus & Weber, 1999). An analogous carbohydrate dynamic during maturation was also reported for *P. abies* SE (Lipavská et al., 2000) and matched with the fact that during the precotyledonary stage, the establishment and development of embryo organs predominate, while the cotyledonary stage is principally characterized by the accumulation of storage compounds, as reported in Hakman (1993).

Raffinose appeared late in the maturation process of hybrid larch SE (from 8 weeks of maturation) and reached a maximum level from

11 weeks of maturation. This complex sugar always appears at the end of the maturation of somatic or zygotic embryos of conifers (Gösslová et al., 2001; Morel, Trontin, et al., 2014), or after stress treatment of SE (Elišová et al., 2022; Konrádová et al., 2003; Välimäki et al., 2022). Raffinose, which is a part of the raffinose family oligosaccharides (RFO), is considered a storage reserve and a marker of desiccation tolerance (Konrádová et al., 2003).

Inositols were found from the beginning of maturation, with a maximum level at 4 weeks of maturation and a lower level after this point. This increasing then decreasing profile was observed in the zygotic embryos of *P. abies*, as reported by Gösslová et al. (2001), and the zygotic embryos of *P. taeda* (Pullman & Buchanan, 2008). The constantly low amount observed and its temporary presence suggest a possible role for inositol derivatives as signalling molecules (Lipavská & Konrádová, 2004).

To summarize this part of the work, during the precotyledonary stage, the hybrid larch SE profile was characterized by a high water content and high levels of glucose and fructose, which is consistent with SE development. For the cotyledonary stage, SE metabolism was oriented towards storage accumulation as we observed a high amount of sucrose and the accumulation of lipids, proteins and starch.

#### 4.1 | Evolution of mid-IR spectra during hybrid larch SE maturation

In order to easily carry out such a characterization of ES, we wanted to test an alternative method to biochemical assays. To this end, we dedicated the second part of this study to the evaluation of the feasibility of predicting ES compositions and their maturation time based on their infrared absorbance. The absorbance measurements could have been conducted in the mid or near-infrared ranges. As comparative studies for the quantification of equivalent biochemical variables showed that the two types of spectroscopy gave equivalent precision and sensitivity (Ferreira et al., 2014), we opted for mid-IR as it requires a smaller quantity of samples, thus allowing a spectrum to be recorded with a single cotyledonary embryo.

Despite a gradual evolution of the embryos during maturation, our biochemical characterization results clearly showed a metabolic shift between the precotyledonary embryos and the cotyledonary ones (Figure 1). This is even more visible in infrared spectroscopy because the spectra obtained are the result of the full molecular composition of the embryos (Figure 3B). Among the differences observed in spectral absorbance according to the maturation time, many spectral areas were already assigned to specific biochemical components. Thus, the largest peak around  $3200\text{ cm}^{-1}$  is attributed to water absorption regions (Türker-Kaya & Huck, 2017). Lipids present peaks around  $2800$  and  $1800\text{ cm}^{-1}$  (Huck-Pezzei et al., 2012; Shoab et al., 2013), while proteins are related to the peak around  $1550\text{ cm}^{-1}$  (Heraud et al., 2007). The region between  $1500$  and  $1200\text{ cm}^{-1}$  can be associated with both lipids and proteins (Huck-Pezzei et al., 2012) and the region between  $1200$  and  $900\text{ cm}^{-1}$  matches with carbohydrate absorption (Heraud et al., 2007).

## 4.2 | PCA of mid-IR spectra

We used PCA for our exploratory analysis in order to interpret spectral data by reducing the matrix dimension in such a way as to extract key features and highlight samples clustering based on their similarities (Wold et al., 1987). This multivariate statistical method combines information of the 3351 wavenumbers of our spectral data into 10 variables, called PCs, which account for the overall variability. The geometric properties of PCs make it possible to distinguish two clusters on the PC1–PC2 score plot, as shown in Figure 3A. We can see a first group of spectra corresponding to the precotyledonary SE on the negative side and a second for the cotyledonary SE on the positive side of PC2. Samples aggregation can be explained by similarities in their spectral fingerprint based on the molecular composition.

PCA loadings (Figure 1S) revealed the involvement of wavenumbers assigned to water absorption (around  $3330\text{ cm}^{-1}$ ) and both lipids and proteins ( $1400$  to  $1550\text{ cm}^{-1}$ ) on PC1. Loadings on the second PC highlighted the implication of more wavelengths and components: lipids (around  $1800\text{ cm}^{-1}$ ), proteins (around  $1650\text{ cm}^{-1}$ ), both proteins and lipids (ranging from  $1400$  to  $1550\text{ cm}^{-1}$ ), carbohydrates (from  $1900$  to  $2000\text{ cm}^{-1}$ ) and water ( $3300\text{ cm}^{-1}$ ). These findings suggest that SE samples clustering on PC1 are mainly due to biochemical composition (lipids, proteins and carbohydrates) in agreement with results reported during the comparison of SE average spectra.

## 4.3 | Models for the quantitative prediction of hybrid larch SE biochemical composition

We investigated the potential of mid-IR models to determine hybrid larch SE quality through quantitative prediction of their biochemical composition without any prior analysis, thereby saving time and material. Ideally, a single calibration for a specific biochemical compound could be applied to all shapes of hybrid larch SE. The precision of the model depends, however, on the number and the spread of the measured values. In our case, depending on the variables, the measured values were grouped in one (glucose and fructose) or two populations (all the others). In the latter case, this leads to the development of separate statistical PLS-R models for precotyledonary and cotyledonary SE. Nevertheless, we tested the statistical method LW-PLS-R (Lesnoff et al., 2020) for grouped samples (Table S2), with no significant improvement in the prediction. However, as we observed in PCA analysis that all the spectra could be discriminated according to two populations of samples, corresponding to the shape of the embryos (Figure 3B), we chose the models dedicated to one or the other.

Another advantage of the prediction of protein content by mid-IR is the relative independence of this method from the amino acid composition of the proteins assayed, unlike Bradford assays. According to Strug et al. (2014), the impact of sequence in protein content can be more than a factor of 2.

In summary, the PLS-R calibration models developed in this study for the prediction of biochemical compound contents in hybrid larch SE present high correlation coefficients and low predictive errors and

can therefore be used as effective tools to quantitatively predict the water content and storage compounds' content (lipids, proteins, carbohydrates) in single hybrid larch SE belonging to the same line used for model calibration. The use of the model on other lines and species needs the incorporation of new samples related to these groups during the training step.

## 4.4 | Models for discrimination of SE maturation time

Our aim was to develop a model to discriminate SE depending on the time they spent in the maturation medium in order to determine the developmental status of the SE. For this purpose, two classification models were developed using the statistical PLS-DA method to enable discriminant analysis according to the similarities and dissimilarities found in mid-IR spectra. The robustness of the PLS-DA model is based on its ability to recognize members of a given group while rejecting non-members. It is evaluated through the percentage of accuracy, which has to be as high as possible.

The first model included 0- to 13-week-old SE. SE ages were grouped into four distinct classes according to Daneshvar et al. (2015), who showed that reducing the number of classes in PLS-DA models improves prediction accuracy. This model can predict the different classes with high accuracies (Table 3) throughout embryogenesis. Our previous results show that many biochemical profiles can be distinguished according to the SE age range, leading to spectral variations. In this model, the grouping of SE age into classes followed the different SE biochemical composition profiles, making the different classes highly contrasted in terms of biochemical properties. This great difference between classes is an advantage for the robustness and accuracy of the model in the prediction and could explain the mean high prediction accuracies obtained with this PLS-DA model.

This class D prediction rate was lower than for the other classes, but it was the one grouping together the most heterogeneous SE, with up to 3 weeks difference, the oldest SE starting to degrade like the reveal the necrosis points appearing punctually in the Petri dishes.

The second model focused on a smaller range (6–9 weeks) with a time step of only 1 week. This model was developed to achieve higher precision in the discrimination of the weeks of maturation, which are the most interesting from a physiological point of view, especially regarding protein composition and abundance (Teyssier et al., 2014) and lipid deposition. Usually, 8-week-old SE are transferred on germination medium (Lelu-Walter & Pâques, 2009). In this model, the different SE ages presented biochemical profiles with quite subtle differences in terms of qualitative and quantitative biochemical contents. This is reflected in the percentage of accuracy obtained, between 60% and 86% (Table 6). The 6-week-old SE were best assigned to their respective class, making this class the best predicted one, whereas the 7-, 8- and 9-week-old SE were all classified with a prediction accuracy of between 60% and 65%. This difference in the classification rate according to SE ages indicates a greater difference between the SE composition of 6-week-old SE and that of the others.



The resemblance of the biochemical profiles observed between SE of 7, 8 or 9 weeks could explain the lower values obtained for the classification of these SE.

The results of this second model are very interesting since it was constructed considering the full biochemical spectral fingerprint of the SE and not only the biochemical variables we are able to measure. This model gives us the following information: (1) the SE metabolism almost slowed during Weeks 7–9 of maturation since their composition does not noticeably change; (2) the germination initially applied to 8-week-old SE based on protein content (Teyssier et al., 2014) could be extended to 7- to 9-week-old SE.

Otherwise, for these two models, incorrectly classified samples are found in the classes close to the real class they belonged to, that is to say, mainly in the class immediately adjoining the real one (Tables 4 and 6). This means that even if the models made classification errors, these misclassifications were not very far from the true classification, which makes the model quite precise in terms of SE discrimination. The risk of completely mistaking the prediction of SE age is, therefore, very low. A parameter influencing the level of prediction is the sampling size, as discussed by Farhadi et al. (2017): in the case of seeds, expanding the range of variability in individuals by including more samples in the data set would probably improve the discrimination ability of the model.

In conclusion, our results demonstrated the potential of mid-IR spectroscopy to successfully classify SE based on age. The size of the age classes to be predicted can be adjusted to the scientific interest. Thanks to the second model presented, it appears that 7- to 9-week-old SE can be harvested for germination and not only 8-week-old SE as previously determined (Teyssier et al., 2014).

## 4.5 | Conclusion and perspectives

This is the first report on the biochemical characterization of hybrid larch SE maturation, including analyses of main storage compounds. Our biochemical analyses indicated that SE exhibited variations in the biochemical profiles during maturation. Significant changes in the profiles of storage compounds and soluble carbohydrates indicate a switch in metabolic activity. During the first weeks of maturation, the SE profile was characterized by high levels of glucose, fructose and water content, which is consistent with SE development. For the remaining maturation times, SE metabolism was mainly oriented towards storage accumulation, with the accumulation of lipids and proteins but also of high amounts of sucrose and starch. Some raffinose was synthesized during the final stages of maturation. The results obtained in this study showed that modifications in biochemical profile may be required to sustain correct embryo development.

We also demonstrated that mid-IR calibration models could be developed for quantitatively determining SE biochemical composition and for the discrimination of SE age. Mid-IR offers various benefits compared to classical laboratory methods, such as high efficiency in the analyses of numerous samples, minimal sample preparation and rapidity. Moreover, mid-IR shows high sensitivity for the determination of a biochemical compound concentration and for the detection of very subtle differences among SE at different times of maturation, making mid-IR a

rapid and promising tool for monitoring SE maturation. This characterization of the SE is essential to take into account the speed of development of the SE. It would also make it possible to verify the developmental stage of SEs according to the culture conditions. It also allows very detailed analysis of the impact of culture conditions or treatment on this process. Finally, it could be possible to consider a selection of the SE produced in automated culture systems, thanks to high-throughput and individual characterization of the SE by infrared, replacing an unsatisfactory selection based on morphology criteria (Le et al., 2021).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

**Conceptualization:** Caroline Teyssier, Parisa Savane and Marie-Anne Lelu-Walter. **Methodology:** Armelle Delile, Céline Ridet, Caroline Teyssier, Marie-Anne Lelu-Walter, Nassim Belmokhtar, Nathalie Boizot and Parisa Savane. **Writing—original draft preparation:** Caroline Teyssier and Parisa Savane. **Review:** Marie-Anne Lelu-Walter and Nassim Belmokhtar. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge support of the Region Centre-Val de Loire, through a grant to Parisa Savane (grant No. 2019 00135978). We are grateful to Phénobois facility (INRAE, 2018). Plateforme de Phénotypage de Propriétés Hydrauliques et Physico chimiques du Bois de Ressources Génétiques Ligneuses, <https://doi.org/10.15454/1.5572410490640864E12> for its facility for generation of the mid-IR raw data and its contribution to the methodologic development in infrared spectrometry and chemometrics.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

Mid-infrared data supporting the findings of this study are available from the corresponding author on request.

## ORCID

Parisa Savane  <https://orcid.org/0000-0001-6417-6062>

Nassim Belmokhtar  <https://orcid.org/0000-0002-6882-2516>

Armelle Delile  <https://orcid.org/0000-0003-4635-8238>

Nathalie Boizot  <https://orcid.org/0000-0002-4884-6342>

Céline Ridet  <https://orcid.org/0009-0009-2776-6982>

Marie-Anne Lelu-Walter  <https://orcid.org/0000-0003-4518-8767>

Caroline Teyssier  <https://orcid.org/0000-0001-7106-5483>

## REFERENCES

- Becwar, M.R., Nagmani, R. & Wann, S.R. (1990) Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Canadian Journal of Botany*, 20(6), 810–817.
- Brownfield, D.L., Todd, C.D., Stone, S.L., Deyholos, M.K. & Gifford, D.J. (2007) Patterns of storage protein and triacylglycerol accumulation during loblolly pine somatic embryo maturation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 88(2), 217–223.
- Coelho, C.M.M. & Benedito, V.A. (2008) Seed development and reserve compound accumulation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Seed Science and Biotechnology*, 2(2), 42–52.
- Daneshvar, A., Tigabu, M., Karimidoost, A. & Oden, P. (2015) Single seed near infrared spectroscopy discriminates viable and non-viable seeds of *Juniperus polycarpus*. *Silva Fennica*, 49(5), 14.

- Dray, S. & Dufour, A.-B. (2007) The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software*, 22(4), 1–20.
- Dronne, S., Label, P. & Lelu, M.-A. (1997) Desiccation decreases abscisic acid content in hybrid larch (*Larix × leptoeuropaea*) somatic embryos. *Physiologia Plantarum*, 99(3), 433–438.
- Elišová, K., Konrádová, H., Dobrev, P.I., Motyka, V., Lomenech, A.-M., Fischerová, L. et al. (2022) Desiccation as a post-maturation treatment helps complete maturation of Norway spruce somatic embryos: carbohydrates, phytohormones and proteomic status. *Frontiers in Plant Science*, 13, 823617.
- Engel, J., Gerretzen, J., Szymańska, E., Jansen, J.J., Downey, G., Blanchet, L. et al. (2013) Breaking with trends in pre-processing? *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 50, 96–106.
- Farhadi, M., Tigabu, M., Pietrzykowski, M., Danusevičius, D. & Odén, P.C. (2017) Application of near infrared spectroscopy for authentication of *Picea abies* seed provenance. *New Forests*, 48(5), 629–642.
- Farhadi, M., Tigabu, M., Stener, L.-G. & Odén, P.C. (2016) Feasibility of visible + near infrared spectroscopy for non-destructive verification of European × Japanese larch hybrid seeds. *New Forests*, 47(2), 271–285.
- Farhadi, M., Tigabu, M. & Odén, P.C. (2015) Near infrared spectroscopy as non-destructive method for sorting viable, petrified and empty seeds of *Larix sibirica*. *Silva Fennica*, 49(5), 12p.
- Ferreira, D.S., Pallone, J.A.L. & Poppi, R.J. (2014) Comparison and application of near-infrared (NIR) and mid-infrared (MIR) spectroscopy for determination of quality parameters in soybean samples. *Food Control*, 35(1), 227–232.
- Gösslová, M., Svobodová, H., Lipavská, H., Albrechtová, J. & Vreugdenhil, D. (2001) Comparing carbohydrate status during Norway spruce seed development and somatic embryo formation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology—Plant*, 37(1), 24–28.
- Gibson, S.I. (2005) Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(1), 93–102.
- Gordon, G.A. (2011) Application of Fourier transform mid-infrared spectroscopy (FTIR) for research into biomass feed-stocks. In: Goran, N. (Ed.) *Fourier transforms*, Ch. 4. Rijeka: IntechOpen.
- Grigová, M., Kubeš, M., Drážná, N., Řezanka, T. & Lipavská, H. (2007) Storage lipid dynamics in somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*): histochemical and quantitative analyses. *Tree Physiology*, 27(11), 1533–1540.
- Hakman, I. (1993) Embryology in Norway spruce (*Picea abies*). An analysis of the composition of seed storage proteins and deposition of storage reserves during seed development and somatic embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 87(2), 148–159.
- Heraud, P., Caine, S., Sanson, G., Gladow, R., Wood, B.R. & McNaughton, D. (2007) Focal plane array infrared imaging: a new way to analyse leaf tissue. *The New Phytologist*, 173(1), 216–225.
- Huck-Pezzei, V.A., Pallua, J.D., Pezzei, C., Bittner, L.K., Schönbichler, S.A., Abel, G. et al. (2012) Fourier transform infrared imaging analysis in discrimination studies of St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(6–7), 1771–1778.
- Hudec, L., Konrádová, H., Hašková, A. & Lipavská, H. (2016) Norway spruce embryogenesis: changes in carbohydrate profile, structural development and response to polyethylene glycol. *Tree Physiology*, 36(5), 548–561.
- Iraqi, D. & Tremblay, F.M. (2001) Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugars and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development. *Journal of Experimental Botany*, 52(365), 2301–2311.
- Joy, R.W., IV, Yeung, E.C., Kong, L. & Thorpe, T.A. (1991) Development of white spruce somatic embryos: I. storage product deposition. *In Vitro Cellular & Developmental Biology—Plant*, 27(1), 32–41.
- King, J.E. & Gifford, D.J. (1997) Amino acid utilization in seeds of loblolly pine during germination and early seedling growth (I. arginine and arginase activity). *Plant Physiology*, 113(4), 1125–1135.
- Klimaszewska, K., Morency, F., Jones-Overton, C. & Cooke, J. (2004) Accumulation pattern and identification of seed storage proteins in zygotic embryos of *Pinus strobus* and in somatic embryos from different maturation treatments. *Physiologia Plantarum*, 121(4), 682–690.
- Klimaszewska, K. & Smith, D.R. (1997) Maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* is promoted by a high concentration of gellan gum. *Physiologia Plantarum*, 100(4), 949–957.
- Konrádová, H., Grigova, M. & Lipavská, H. (2003) Cold-induced accumulation of raffinose family oligosaccharides in somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*). *In Vitro Cellular & Developmental Biology—Plant*, 39(4), 425–427.
- Le, K.-C., Dedicova, B., Johansson, S., Lelu-Walter, M.-A. & Egertsdotter, U. (2021) Temporary immersion bioreactor system for propagation by somatic embryogenesis of hybrid larch (*Larix × eurolepis* Henry). *Biotechnology Reports*, 32, e00684.
- Lefebvre, M., Villar, M., Boizot, N., Delile, A., Dimouro, B., Lomenech, A.-M. et al. (2022) Variability in seeds' physicochemical characteristics, germination and seedling growth within and between two French *Populus nigra* L. populations. *Peer Community Journal*, 2, e10.
- Lelu-Walter, M.-A., Teyssier, C., Guérin, V. & Pâques, L. (2016) Vegetative propagation of larch species: somatic embryogenesis improvement towards its integration in breeding programs. In: Park, Y.-S., Bonga, J.-M. & Moon, H.-K. (Eds.) *Vegetative propagation of forest trees*. Korea: National Institute of Forest Science (NIFoS), Seoul, pp. 551–571.
- Lelu-Walter, M.-A., Thompson, D., Harvengt, L., Sanchez, L., Toribio, M. & Pâques, L.E. (2013) Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction. *Tree Genetics & Genomes*, 9(4), 883–899.
- Lelu-Walter, M.-A. & Pâques, L.E. (2009) Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix x eurolepis* and *Larix x marschlin-sii*). Perspectives for breeding. *Annals of Forest Science*, 66, 104.
- Lelu, M.-A., Klimaszewska, K., Pflaum, G. & Bastien, C. (1995) Effect of maturation duration on desiccation tolerance in hybrid larch (*Larix x Leptoeuropaea dengler*) somatic embryos. *In Vitro Cellular & Developmental Biology—Plant*, 31, 15–20.
- Lesnoff, M. (2021) *R package rchemo: dimension reduction, regression and discrimination for Chemometrics*. <https://github.com/mlesnoff/rchemo>. Montpellier, France: CIRAD, UMR SELMET.
- Lesnoff, M., Metz, M. & Roger, J.-M. (2020) Comparison of locally weighted PLS strategies for regression and discrimination on agro-nomic NIR data. *Journal of Chemometrics*, 34(5), e3209.
- Lipavská, H., Svobodová, H., Albrechtová, J., Kumstýřová, L., Vágner, M. & Vondráková, Z. (2000) Carbohydrate status during somatic embryo maturation in Norway spruce. *In Vitro Cellular & Developmental Biology—Plant*, 36(4), 260–267.
- Lipavská, H. & Konrádová, H. (2004) Somatic embryogenesis in conifers: the role of carbohydrate metabolism. *In Vitro Cellular & Developmental Biology—Plant*, 40(1), 23–30.
- Locher, F., Heuwinkel, H., Gutser, R. & Schmidhalter, U. (2005) Development of near infrared reflectance spectroscopy calibrations to estimate legume content of multispecies legume–grass mixtures. *Agronomy Journal*, 97(1), 11–17.
- Maruyama, T.E. & Hosoi, Y. (2012) Post-maturation treatment improves and synchronizes somatic embryo germination of three species of Japanese pines. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 110(1), 45–52.
- Mevik, B.-H. & Wehrens, R. (2015) *Introduction to the pls Package*. R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, pp. 1–23.
- Mishra, P., Biancolillo, A., Roger, J.M., Marini, F. & Rutledge, D.N. (2020) New data preprocessing trends based on ensemble of multiple preprocessing techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 132, 116045.
- Morel, A., Teyssier, C., Trontin, J.-F., Eliášová, K., Pešek, B., Beaufour, M. et al. (2014) Early molecular events involved in *Pinus pinaster* Ait. Somatic embryo development under reduced water availability:

- transcriptomic and proteomic analyses. *Physiologia Plantarum*, 152(1), 184–201.
- Morel, A., Trontin, J.-F., Corbineau, F., Lomenech, A.-M., Beaufour, M., Reymond, I. et al. (2014) Cotyledonary somatic embryos of *Pinus pinaster* Ait. Most closely resemble fresh, maturing cotyledonary zygotic embryos: biological, carbohydrate and proteomic analyses. *Planta*, 240(5), 1075–1095.
- Otsuka, M. (2006) Near-infrared spectroscopy application to the pharmaceutical industry. *Encyclopedia of analytical chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*, 1–15.
- Pâques, L.E. (1992) Performance of vegetatively propagated *Larix decidua*, *L. kaempferi* and *L. laricina* hybrids. *Annals of Forest Science*, 49(1), 63–74.
- Pescador, R., Kerbauy, G.B., dos Santos, D.Y.A.C., Dal Vesco, L.L., de Freitas Fraga, H.P. & Guerra, M.P. (2012) Comparative study of reserve lipid accumulation during somatic and zygotic *Acacia sellowiana* (O. berg.) Burret embryogenesis. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(2), 771–778.
- Pond, S.E., Von Aderkas, P. & Bonga, J.M. (2002) Improving tolerance of somatic embryos of *Picea glauca* to flash desiccation with a cold treatment (desiccation after cold acclimation). *In Vitro Cellular & Developmental Biology—Plant*, 38(4), 334–341.
- Prewin, C., Vagner, M. & Wilhelm, E. (2004) Changes in water status and proline and abscisic acid concentrations in developing somatic embryos of pedunculate oak (*Quercus robur*) during maturation and germination. *Tree Physiology*, 24(11), 1251–1257.
- Pulkka, S., Segura, V., Harju, A., Tapanila, T., Tanner, J., Pâques, L.E. et al. (2016) Prediction of stilbene content from heartwood increment cores of scots pine using near infrared spectroscopy methodology. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 24(6), 517–528.
- Pullman, G.S. & Buchanan, M. (2008) Identification and quantitative analysis of stage-specific carbohydrates in loblolly pine (*Pinus taeda*) zygotic embryo and female gametophyte tissues. *Tree Physiology*, 28(7), 985–996.
- Qu, J.H., Liu, D., Cheng, J.H., Sun, D.W., Ma, J., Pu, H. et al. (2015) Applications of near-infrared spectroscopy in food safety evaluation and control: a review of recent research advances. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(13), 1939–1954.
- Rinnan, Å., Fvd, B. & Engelsen, S.B. (2009) Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(10), 1201–1222.
- Roger, J.-M., Biancolillo, A. & Marini, F. (2020) Sequential preprocessing through ORThogonalization (SPORT) and its application to near infrared spectroscopy. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 199, 103975.
- Rossard, V., Boulet, J.C., Gogé, F., Latrille, E. & Roger, J.-M. (2016) Chem Flow, chemometrics using Galaxy. In: *Galaxy Community Conference, GCC 2016*. Bloomington, USA.
- Shoab, A., Akhtar, N. & Nafisa, A. (2013) Fourier transform-infrared spectroscopy to monitor modifications in canola biochemistry caused by *Alternaria destruens*. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 25(2), 105–109.
- Silveira, V., Balbuena, T.S., Santa-Catarina, C., Floh, E.I.S., Guerra, M.P. & Handro, W. (2004) Biochemical changes during seed development in *Pinus taeda* L. *Plant Growth Regulation*, 44, 147–156.
- Stasolla, C., Kong, L., Yeung, E.C. & Thorpe, T.A. (2002) Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology—Plant*, 38(2), 93–105.
- Strug, I., Utzat, C., Cappione, A., Gutierrez, S., Amara, R., Lento, J. et al. (2014) Development of a univariate membrane-based mid-infrared method for protein quantitation and total lipid content analysis of biological samples. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2014, 657079.
- Türker-Kaya, S. & Huck, C.W. (2017) A review of mid-infrared and near-infrared imaging: principles, concepts and applications in plant tissue analysis. *Molecules*, 22(1).
- Tereso, S., Zoglauer, K., Milhinhos, A., Miguel, C. & Oliveira, M.M. (2007) Zygotic and somatic embryo morphogenesis in *Pinus pinaster*: comparative histological and histochemical study. *Tree Physiology*, 27(5), 661–669.
- Terskikh, V.V., Feurtado, J.A., Borchardt, S., Giblin, M., Abrams, S.R. & Kermode, A.R. (2005) *In vivo* <sup>13</sup>C NMR metabolite profiling: potential for understanding and assessing conifer seed quality. *Journal of Experimental Botany*, 56(418), 2253–2265.
- Teysier, C., Grondin, C., Bonhomme, L., Lomenech, A.-M., Vallance, M., Morabito, D. et al. (2011) Increased gelling agent concentration promotes somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix × eurolepis*): a 2-DE proteomic analysis. *Physiologia Plantarum*, 141(2), 152–165.
- Teysier, C., Maury, S., Beaufour, M., Grondin, C., Delaunay, A., Le Metté, C. et al. (2014) In search of markers for somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix × eurolepis*): global DNA methylation and proteomic analyses. *Physiologia Plantarum*, 150(2), 271–291.
- Tigabu, M. (2003) Characterization of forest tree seed quality with near infrared spectroscopy and multivariate analysis. Thesis. Umeå. ISBN 91-576-6508-7.
- Tigabu, M., Odén, P.C. & Lindgren, D. (2005) Identification of seed sources and parents of *Pinus sylvestris* L. using visible–near infrared reflectance spectra and multivariate analysis. *Trees*, 19(4), 468–476.
- Tigabu, M., Odén, P.C. & Shen, T.Y. (2004) Application of near-infrared spectroscopy for the detection of internal insect infestation in *Picea abies* seed lots. *Canadian Journal of Forest Research*, 34(1), 76–84.
- Trontin, J.-F., Klimaszewska, K., Morel, A., Hargreaves, C.L. & Lelu-Walter, M.-A. (2016) Molecular aspects of conifer zygotic and somatic embryo development: a review of genome-wide approaches and recent insights. In: Germana, M. & Lambardi, M. (Eds.) *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants. Methods in Molecular Biology*. New York: Springer Science Business Media, pp. 167–207.
- Tsuchikawa, S., Ma, T. & Inagaki, T. (2022) Application of near-infrared spectroscopy to agriculture and forestry. *Analytical Sciences: The International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 38(4), 635–642.
- Tsuchikawa, S. & Kobori, H. (2015) A review of recent application of near infrared spectroscopy to wood science and technology. *Journal of Wood Science*, 61(3), 213–220.
- Välimäki, S., Teysier, C., Tikkinen, M., Delile, A., Boizot, N., Varis, S. et al. (2022) Norway spruce somatic embryogenesis benefits from proliferation of embryogenic tissues on filter discs and cold storage of cotyledonary embryos. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1031686.
- Wang, Y., Xiang, J., Tang, Y., Chen, W. & Xu, Y. (2022) A review of the application of near-infrared spectroscopy (NIRS) in forestry. *Applied Spectroscopy Reviews*, 57(4), 300–317.
- Weber, H., Borisjuk, L., Heim, U., Sauer, N. & Wobus, U. (1997) A role for sugar transporters during seed development: molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in fava bean seeds. *Plant Cell*, 9(6), 895–908.
- Weber, H., Buchner, P., Borisjuk, L. & Wobus, U. (1996) Sucrose metabolism during cotyledon development of *Vicia faba* L. is controlled by the concerted action of both sucrose-phosphate synthase and sucrose synthase: expression patterns, metabolic regulation and implications for seed development. *The Plant Journal*, 9(6), 841–850.
- Williams, P. & Norris, K.H. (2021) *Near-infrared technology in the agricultural and food industries*. Paul, Minn., USA: American Association of Cereal Chemists, St.
- Wobus, U. & Weber, H. (1999) Sugars as signal molecules in plant seed development. *Biological Chemistry*, 380(7–8), 937–944.



- Wold, S., Esbensen, K. & Geladi, P. (1987) Principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2(1), 37–52.
- Workman, J.J. & Weyer, L. (2007) *Practical guide to interpretive near-infrared spectroscopy*, 1st edition. Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis Group.

#### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

**How to cite this article:** Savane, P., Belmokhtar, N., Delile, A., Boizot, N., Ridel, C., Lelu-Walter, M.-A. et al. (2023) Characterization of hybrid larch somatic embryo maturation by biochemical analyses and by a novel, fast mid-infrared approach. *Physiologia Plantarum*, 175(4), e13966. Available from: <https://doi.org/10.1111/ppl.13966>

Table S1. Composition of hybrid larch somatic embryos during maturation.

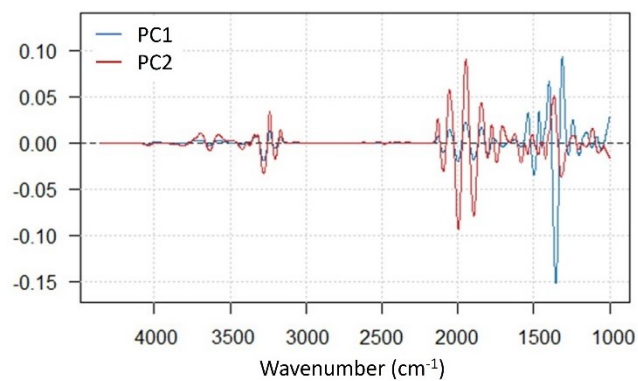
Data are presented as mean values  $\pm$  standard deviations of 3 to 7 biological replicates. Significant differences at  $P < 0.05$  are indicated by letters.<sup>1</sup>:  $\mu\text{g mg}^{-1}$  DW; <sup>2</sup>:  $\mu\text{g mg}^{-1}$  FW; <sup>3</sup>:  $\text{g H}_2\text{O g}^{-1}$  DW.

Weeks of maturation	Lipids <sup>1</sup>	Proteins <sup>2</sup>	Carbohydrates <sup>1</sup>	Starch <sup>1</sup>	Water content <sup>3</sup>
0	83.2 $\pm$ 9.2 <sup>a</sup>	28.6 $\pm$ 14.7 <sup>a</sup>	405.2 $\pm$ 53.6 <sup>bc</sup>	17.8 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	8.6 $\pm$ 0.6 <sup>d</sup>
1	88.2 $\pm$ 2.9 <sup>a</sup>	26.0 $\pm$ 26.0 <sup>a</sup>	453.0 $\pm$ 27.3 <sup>bc</sup>	25.2 $\pm$ 3.3 <sup>a</sup>	8.5 $\pm$ 1.7 <sup>d</sup>
2	96.8 $\pm$ 7.0 <sup>a</sup>	23.3 $\pm$ 6.2 <sup>a</sup>	375.4 $\pm$ 59.6 <sup>bc</sup>	30.0 $\pm$ 6.6 <sup>a</sup>	7.6 $\pm$ 0.9 <sup>c</sup>
3	92.2 $\pm$ 12.1 <sup>a</sup>	30.7 $\pm$ 21.6 <sup>a</sup>	388.8 $\pm$ 37.6 <sup>c</sup>	36.7 $\pm$ 3.8 <sup>a</sup>	6.5 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>
4	365.4 $\pm$ 65.1 <sup>b</sup>	125.7 $\pm$ 56.9 <sup>b</sup>	124.6 $\pm$ 14.0 <sup>a</sup>	120.8 $\pm$ 21.0 <sup>b</sup>	1.5 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
5	385.1 $\pm$ 38.6 <sup>b</sup>	94.9 $\pm$ 38.5 <sup>b</sup>	126.9 $\pm$ 17.5 <sup>a</sup>	131.4 $\pm$ 13.2 <sup>bc</sup>	1.3 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
6	483.4 $\pm$ 78.0 <sup>cd</sup>	99.4 $\pm$ 30.1 <sup>b</sup>	137.9 $\pm$ 17.6 <sup>a</sup>	143.7 $\pm$ 16.9 <sup>bd</sup>	1.5 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
7	435.3 $\pm$ 109.6 <sup>bc</sup>	95.3 $\pm$ 33.1 <sup>b</sup>	130.8 $\pm$ 13.8 <sup>a</sup>	142.6 $\pm$ 22.4 <sup>bc</sup>	1.3 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
8	531.2 $\pm$ 36.4 <sup>cd</sup>	96.9 $\pm$ 24.6 <sup>b</sup>	134.5 $\pm$ 14.9 <sup>a</sup>	174.8 $\pm$ 26.0 <sup>de</sup>	1.3 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
9	548.7 $\pm$ 72.2 <sup>d</sup>	94.5 $\pm$ 25.4 <sup>b</sup>	125.0 $\pm$ 17.5 <sup>a</sup>	201.0 $\pm$ 27.4 <sup>c</sup>	1.2 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
10	513.8 $\pm$ 63.7 <sup>cd</sup>	102.6 $\pm$ 32.2 <sup>b</sup>	114.1 $\pm$ 11.6 <sup>a</sup>	135.0 $\pm$ 19.2 <sup>bc</sup>	1.3 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>
11	497.2 $\pm$ 56.4 <sup>cd</sup>	88.1 $\pm$ 27.1 <sup>b</sup>	116.9 $\pm$ 13.9 <sup>a</sup>	156.7 $\pm$ 25.5 <sup>cd</sup>	1.2 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
12	537.9 $\pm$ 81.5 <sup>d</sup>	90.6 $\pm$ 35.8 <sup>b</sup>	118.7 $\pm$ 8.2 <sup>a</sup>	199.5 $\pm$ 30.6 <sup>c</sup>	1.5 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
13	493.0 $\pm$ 59.4 <sup>cd</sup>	91.3 $\pm$ 37.9 <sup>b</sup>	106.4 $\pm$ 11.5 <sup>a</sup>	196.0 $\pm$ 19.0 <sup>c</sup>	1.3 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>

Weeks of maturation	Sucrose <sup>1</sup>	Glucose <sup>1</sup>	Fructose <sup>1</sup>	Raffinose <sup>1</sup>	Inositols <sup>1</sup>
0	30.0 $\pm$ 6.8 <sup>a</sup>	195.6 $\pm$ 27.2 <sup>b</sup>	177.7 $\pm$ 34.1 <sup>bc</sup>	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	1.9 $\pm$ 0.4 <sup>ab</sup>
1	26.7 $\pm$ 10.2 <sup>a</sup>	224.6 $\pm$ 7.2 <sup>c</sup>	200.0 $\pm$ 30.6 <sup>c</sup>	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	1.7 $\pm$ 0.8 <sup>ab</sup>
2	12.8 $\pm$ 3.8 <sup>a</sup>	190.5 $\pm$ 38.6 <sup>b</sup>	171.6 $\pm$ 23.0 <sup>bc</sup>	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	0.6 $\pm$ 0.1 <sup>ab</sup>
3	14.5 $\pm$ 7.1 <sup>a</sup>	187.2 $\pm$ 18.8 <sup>b</sup>	186.3 $\pm$ 19.0 <sup>bc</sup>	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	0.9 $\pm$ 0.3 <sup>ab</sup>
4	94.9 $\pm$ 13.2 <sup>bc</sup>	11.1 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>	11.7 $\pm$ 2.5 <sup>a</sup>	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	7.0 $\pm$ 1.2 <sup>g</sup>
5	96.1 $\pm$ 12.9 <sup>bc</sup>	12.5 $\pm$ 2.7 <sup>a</sup>	13.0 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	5.3 $\pm$ 0.7 <sup>f</sup>
6	106.2 $\pm$ 11.0 <sup>c</sup>	12.2 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>	14.5 $\pm$ 3.9 <sup>a</sup>	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	5.1 $\pm$ 0.5 <sup>f</sup>
7	105.5 $\pm$ 12.1 <sup>c</sup>	9.5 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	11.2 $\pm$ 1.7 <sup>a</sup>	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	4.5 $\pm$ 0.3 <sup>cf</sup>
8	107.4 $\pm$ 12.8 <sup>c</sup>	9.7 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	12.5 $\pm$ 2.5 <sup>a</sup>	1.0 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	4.0 $\pm$ 0.7 <sup>de</sup>
9	98.3 $\pm$ 13.5 <sup>bc</sup>	9.0 $\pm$ 2.7 <sup>a</sup>	10.7 $\pm$ 2.9 <sup>a</sup>	3.6 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>	3.4 $\pm$ 0.9 <sup>cde</sup>
10	92.1 $\pm$ 10.1 <sup>bc</sup>	6.6 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	7.6 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	4.1 $\pm$ 1.9 <sup>b</sup>	3.4 $\pm$ 0.5 <sup>cde</sup>
11	92.3 $\pm$ 12.6 <sup>bc</sup>	6.5 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	7.6 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>	7.3 $\pm$ 1.6 <sup>c</sup>	2.9 $\pm$ 0.7 <sup>bd</sup>
12	91.4 $\pm$ 9.7 <sup>bc</sup>	6.9 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	8.6 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	8.5 $\pm$ 3.0 <sup>c</sup>	2.9 $\pm$ 1.2 <sup>bd</sup>
13	81.4 $\pm$ 11.1 <sup>b</sup>	6.4 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	8.2 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>	7.8 $\pm$ 2.2 <sup>c</sup>	2.3 $\pm$ 0.8 <sup>bc</sup>

Table S2. Statistics for the prediction of biological and biochemical content in hybrid larch somatic embryos using PLS-R analyzes. precoty: precotyledonary SE, coty: cotyledonary SE, msc: multiple scatter correction, snv: standard normal variate, dt: detrend, snv.der1: standard normal variate plus first derivative, der1: first derivative, der2: second derivative, snv.der2: standard normal variate plus second derivative, nLV: number of latent variables, n: number of samples,  $r^2_{cal}$ :  $r^2$  of calibration, RMSEP: root mean square error of prediction, Parameters: Lvdis (Number of latent variables used to compute the Mahalanobis distances between observations)/H (shape of the eight function)/KNN (Number of neighbours to select).

Trait	Model	Data set	nLV	n	spectra treatment	$r^2_{cal}$	RMSEP	Parameters
Carbohydrates	LW-PLS-R	precoty + coty	11	280	msc		3.986	20/1/400
Carbohydrates	PLS-R	precoty	9	80	msc	0.84	3.04	
Carbohydrates	PLS-R	coty	12	200	snv	0.67	2.91	
Fructose	LW-PLS-R	precoty + coty	20	280	der2		1.592	20/1/400
Fructose	PLS-R	precoty + coty	9	280	der2	0.92	2.33	
Glucose	LW-PLS-R	precoty + coty	20	280	snv		1.67	20/1/200
Glucose	PLS-R	precoty + coty	8	280	snv	0.95	2.1	
Inositols	LW-PLS-R	precoty + coty	11	280	msc		0.218	20/2/200
Inositols	PLS-R	precoty	5	80	der1	0.72	0.03	
Inositols	PLS-R	coty	12	200	msc	0.89	0.2	
Lipid	LW-PLS-R	precoty + coty	15	280	msc		13.94	20/1/400
Lipid	PLS-R	precoty	11	80	msc	0.96	0.43	
Lipid	PLS-R	coty	13	200	snv.der2	0.77	13.43	
Protein	LW-PLS-R	precoty + coty	11	280	snv.der2		7.69	20/2/200
Protein	PLS-R	precoty	12	80	dt	0.96	3.70	
Protein	PLS-R	coty	15	200	der1	0.89	10.66	
Raffinose	LW-PLS-R	precoty + coty	17	110	msc		0.591	20/3/200
Raffinose	PLS-R	coty	15	110	msc	0.91	0.33	
Starch	LW-PLS-R	precoty + coty	13	280	msc		6.862	20/1/400
Starch	PLS-R	precoty	11	80	snv	0.94	0.31	
Starch	PLS-R	coty	11	200	msc	0.74	6.87	
Sucrose	LW-PLS-R	precoty + coty	18	280	snv.der2		2.77	20/3/400
Sucrose	PLS-R	precoty	11	80	raw	0.9	0.26	
Sucrose	PLS-R	coty	12	200	snv.der1	0.69	2.59	
Water content	LW-PLS-R	precoty + coty	13	279	msc		0.537	20/1/200
Water content	PLS-R	precoty	13	80	Msc	0.96	0.25	
Water content	PLS-R	coty	10	179	raw	0.65	0.08	



**Figure S1.** PC1 and PC2 loadings. The height of the peaks is related to the contribution of the absorbance of the corresponding wavenumber in the prediction model.

## **II.2. Caractérisation biologique des ES cotylédonaire de mélèze hybride au cours de leur maturation**

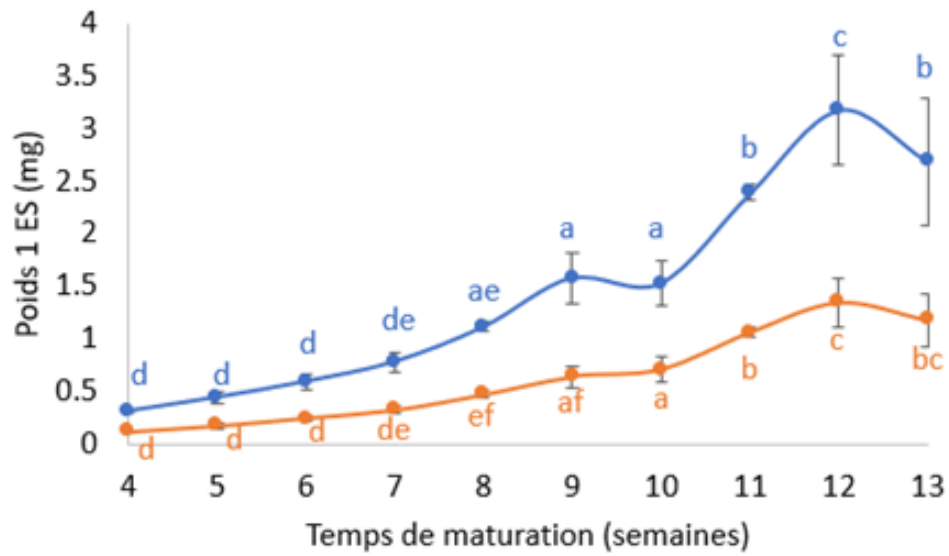
### **II.2.1. Résultats complémentaires**

Evolution des caractéristiques biologiques des ES cotylédonaire de mélèze hybride au cours de leur maturation

Au cours de la maturation, le poids frais et le poids sec des ES évoluent progressivement, de manière croissante et significative avec leur âge (Figure II.2). Comparée à la lignée N23, la lignée Q10 présente une évolution du poids frais et du poids sec plus rapide. Concernant la germination (développement de la radicule), la lignée N23 présente dès 7 jours une capacité germinative atteignant en moyenne 98 à 100% pour les stades de 4 à 12 semaines (Tableau II.1). A 14 jours, l'ensemble des ES ont germé quel que soit le stade de maturation. Pour la lignée Q10, le pourcentage de germination est fonction de l'âge de l'ES : à 7 jours il varie de 22 % (ES de 4 semaines) à 100 % (ES de 8 semaines) (Tableau II.1). A 14 jours la capacité germinative atteint 97 à 100 % entre 4 et 9 semaines de maturation puis décroît significativement avec le temps de maturation.

Remarque. Dans cette expérimentation, était initialement prévue l'observation du développement en plante des ES (partie aérienne) après leur germination. L'apparition des premières aiguilles est notée à partir de la 4ème semaine de culture sur milieu de germination. Ces observations n'ont malheureusement pas pu être réalisées du fait de contraintes extérieures (covid).

### Q10



### N23

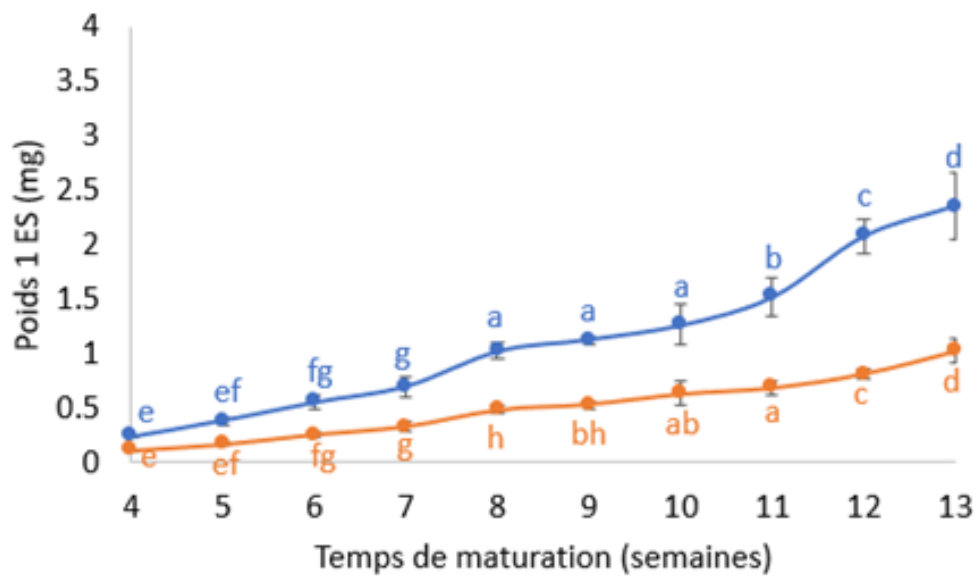


Figure II.2. Evolution du poids frais (●) et du poids sec (●) des embryons somatiques (ES) au cours de leur maturation, pour deux lignées embryogènes de mélèze hybride (Q10, N23). Les différences significatives pour  $p < 0.05$  sont indiquées par des lettres (ANOVA, Tuckey).  $n=6$

Tableau II.1 Suivi de la germination des embryons somatiques (ES) en fonction de leur temps de maturation, pour deux lignées embryogènes de mélèze hybride (Q10, N23).

Lignée	Durée de maturation (semaines)	Nb total ES mis en culture	Nb ES germés à 7 jours		Nb ES germés à 14 jours	
			Total	%*	Total	%*
Q10	4	60	13	22 ± 8 e	60	100 ± 0 a
	5	60	48	80 ± 5 ad	58	97 ± 3 a
	6	60	56	93 ± 8 ab	60	100 ± 0 a
	7	60	34	57 ± 14 cd	60	100 ± 0 a
	8	60	60	100 ± 0 a	60	100 ± 0 a
	9	60	56	93 ± 6 ab	60	100 ± 0 a
	10	60	43	72 ± 10 bcd	54	90 ± 13 ab
	11	60	35	58 ± 14 cd	45	75 ± 0 bc
	12	60	32	53 ± 13 c	38	63 ± 12 c
	13	60	39	65 ± 22 cd	ND	ND
N23	4	60	59	98 ± 3 a	60	100 ± 0 a
	5	60	60	100 ± 0 a	60	100 ± 0 a
	6	60	60	100 ± 0 a	60	100 ± 0 a
	7	60	60	100 ± 0 a	60	100 ± 0 a
	8	60	60	100 ± 0 a	60	100 ± 0 a
	9	60	60	100 ± 0 a	60	100 ± 0 a
	10	60	60	100 ± 0 a	60	100 ± 0 a
	11	60	60	100 ± 0 a	60	100 ± 0 a
	12	60	60	100 ± 0 a	60	100 ± 0 a
	13	60	ND	ND	ND	ND

\* Les différences significatives pour  $p < 0.05$  sont indiquées par des lettres (ANOVA, Tuckey). n=6

## II.2.2. Discussion

### Evolution de la capacité germinative des ES de mélèze hybride au cours de leur maturation

La germination (développement de la radicule) des ES nécessite de les transférer sur un milieu dépourvu d'ABA. Elle a été mesurée après 7 et 14 jours de culture en fonction de l'âge des ES (de 4 à 13 semaines de maturation). Chez la lignée Q10, pour les temps de maturation de 4 à 10 semaines, le pourcentage de germination final (à 14 jours) atteint 90 à 100 %. A partir de 11 semaines de maturation le pourcentage de germination diminue significativement par rapport au pourcentage mesuré chez les ES de 8 semaines. Un résultat similaire a déjà été observé chez les ES de mélèze hybride *L. leptoeuropaea* (Lelu et al., 1995). L'inhibition de cette germination avait été corrélée à une accumulation observée de l'ABA dans les ES au cours de leur maturation (Lelu et Label, 1994), connue pour inhiber la germination et la conversion en plante (Rodríguez-Gacio et al., 2009). Pour les ES de 4 semaines de la lignée Q10, bien que le pourcentage de germination finale soit de 100%, le pourcentage de germination à 7 jours est réduit (22 %) par rapport aux ES de 8 semaines (100%). Le plus faible pourcentage de germination à 7 jours des ES de 4 semaines pourrait être attribué au fait que ces ES n'ont pas accumulé de réserves en quantité et qualité suffisantes pour permettre une germination aussi rapide que celle des ES de 8 semaines.

Chez la lignée N23, le pourcentage de germination atteint 98 à 100 % indépendamment du temps de maturation, et ce dès 7 jours après mise en germination. A 14 jours, tous les ES mis en germination ont développé une radicule. Le comportement différent de cette lignée par rapport à la lignée Q10 pourrait s'expliquer par une différence de sensibilité à l'ABA, la lignée Q10 étant supposément plus sensible que la lignée N23.

Chez les deux lignées étudiées, le pourcentage de germination à 7 jours est de 100 % pour les ES de 8 semaines. Cela conforte le choix de ce stade comme étant optimal pour la mise en germination, à l'instar de ce qui a été suggéré dans une précédente étude réalisée chez le mélèze hybride (Teyssier et al., 2014). Néanmoins, les ES de 6, 7 et 9 présentent un pourcentage de germination équivalent aux ES de 8 semaines ce qui ne permet pas de les discriminer seulement sur la base de leur capacité germinative ou de leur morphologie. Il était donc important de trouver une nouvelle méthode rapide et efficace permettant la discrimination des ES selon d'autres critères (Savane et al., 2023).



## Conclusions du chapitre II

Cette étude constitue pour la première fois une caractérisation complète des ES de mélèze hybride au cours de leur maturation. Nous avons montré qu'au cours de la maturation, les ES présentaient de nombreuses variations de leur composition biochimique. Des modifications significatives de leurs profils de réserves nous indiquent que des changements d'activité métabolique s'opèrent au cours de leur maturation. En effet, au cours des premières semaines de maturation, la composition des ES est principalement caractérisée par des teneurs élevées en glucose, en fructose et en eau. Cette observation va de pair avec le développement des ES. Ensuite le métabolisme s'oriente vers l'accumulation des réserves (lipides, protéines) mais aussi de saccharose, de raffinose et d'amidon. Des modifications de la composition des ES sont nécessaires pour maintenir un développement embryonnaire correct pour soutenir in fine les phases ultérieures de développement telle que la germination. La caractérisation des réserves des ES en association avec les résultats de germination fournissent par ailleurs des informations solides et précises en regard de l'évaluation de la qualité des ES qui doit dorénavant se baser non seulement sur leur morphologie mais aussi sur leur composition biochimique.

Nous avons aussi démontré que des modèles de prédiction par spectrométrie moyen infrarouge peuvent être développés pour déterminer quantitativement la composition des ES de mélèze hybride et pour discriminer les ES selon leur temps de maturation. A notre connaissance, c'est la première fois que ces types de modèles sont développés pour des ES de conifère en général et de mélèze hybride en particulier. Ces modèles offrent de nombreux avantages par rapport aux méthodes d'évaluation classiques en laboratoire notamment une grande efficacité dans l'analyse de nombreux échantillons en peu de temps avec une préparation minimale. Par ailleurs, la spectrométrie moyen infrarouge est une technique très sensible permettant la détection de différences de composition très subtiles entre les ES à différents temps de maturation. Les modèles développés dans cette étude constituent donc des outils prometteurs pour le suivi de la maturation des ES de mélèze hybride et pour la prise de décision quant à la récolte d'ES de qualité équivalente aux ES de 8 semaines, temps de maturation considéré comme optimal selon nos analyses. En effet, disposer de ces modèles facilitera par exemple le suivi de l'évolution des ES se développant dans différentes conditions de culture ou pour caractériser l'effet de traitements pouvant être appliqués aux ES en maturation.

Les modèles PLS-R et PLS-DA développés dans notre étude sont évolutifs et peuvent être nourris et améliorés par des données acquises au cours de nouvelles expérimentations. L'addition de ces nouvelles données permettra notamment d'augmenter la précision et la robustesse des modèles. Par ailleurs, nous pouvons aussi ajouter des données spectrales et biochimiques obtenues sur d'autres lignées permettant ainsi de disposer de modèles applicables sur une plus grande diversité d'échantillons d'ES de mélèze hybride. Bien que les modèles développés en spectrométrie infrarouge ne sont pas universels et sont spécifiques d'une espèce et d'un type d'échantillon, ceux que nous avons obtenus dans notre étude servent de preuves de concept afin de partager à la communauté scientifique la méthode adaptée à notre cas et qui pourrait être appliquée aux ES d'autres espèces forestières ou pour d'autres variables biochimiques pour ce type d'échantillon.

En résumé, nous avons vu dans ce chapitre que les ES de 8 semaines sont à un stade optimal pour la mise en germination en raison de leur capacité germinative et de leur composition biochimique. Aussi ces ES ont constitué notre référence pour toutes les

expérimentations réalisées dans les chapitres suivants. Par ailleurs, afin de compléter la caractérisation des ES, il s'agira par la suite de situer l'état de maturité des ES de 8 semaines par rapport à des EZ de mélèze hybride récoltés à différents temps de maturité.

## Références

- Becwar M R, Nagmani R, Wann S R** (1990) Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Can. J. Bot.* 20(6), 810-817.
- Brownfield D L, Todd C D, Stone S L, Deyholos M K, Gifford D J** (2007) Patterns of storage protein and triacylglycerol accumulation during loblolly pine somatic embryo maturation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 88(2), 217-223.
- Coelho C M M, Benedito V A** (2008) Seed development and reserve compound accumulation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Seed Sci. Biotechnol.* 2, 42-52.
- Daneshvar A, Tigabu M, Karimidoost A, Odén P C** (2015) Single seed near infrared spectroscopy discriminates viable and non-viable seeds of *Juniperus polycarpos*. *Silva Fenn.* 49(5), 1334.
- Dray S, Dufour A B** (2007) The ade4 Package: Implementing the Duality Diagram for Ecologists. *J. Stat. Softw.* 22(4), 1-20.
- Dronne S, Label P, Lelu M A** (1997) Desiccation decreases abscisic acid content in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*) somatic embryos. *Physiol. Plant.* 99(3), 433-438.
- Eliášová K, Konrádová H, Dobrev P I, Motyka V, Lomenech A M, Fischerová L, Lelu-Walter M A, Vondráková Z, Teyssier C** (2022) Desiccation as a post-maturation treatment helps complete maturation of norway spruce somatic embryos: carbohydrates, phytohormones and proteomic status. *Front. Plant Sci.* 13, 823617.
- Engel J, Gerretzen J, Szymańska E, Jansen J J, Downey G, Blanchet L, Buydens L M C** (2013) Breaking with trends in pre-processing? *Trends Anal. Chem.* 50, 96-106.
- Farhadi M, Tigabu M, Odén P C** (2015) Near infrared spectroscopy as non-destructive method for sorting viable, petrified and empty seeds of *Larix sibirica*. *Silva Fenn.* 49(5), 1340.
- Farhadi M, Tigabu M, Stener L G, Odén P C** (2016) Feasibility of visible + near infrared spectroscopy for non-destructive verification of European x Japanese larch hybrid seeds. *New For.* 47, 271-285.
- Farhadi M, Tigabu M, Pietrzykowski M, Danusevičius D, Odén P C** (2017) Application of near infrared spectroscopy for authentication of *Picea abies* seed provenance. *New For.* 48, 629-642.
- Ferreira DS, Galão O F, Pallone J A L, Poppi R J** (2014) Comparison and application of near-infrared (NIR) and mid-infrared (MIR) spectroscopy for determination of quality parameters in soybean samples. *Food Control* 35(1), 227-232.
- Gibson S I** (2005) Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8(1), 93-102.
- Gordon G A** (2011) Application of Fourier transform mid-infrared spectroscopy (FTIR) for research into biomass feed-stocks. In: Goran N (ed) *Fourier Transforms*. IntechOpen, Rijeka, p Ch. 4.
- Gösslová M, Svobodová H, Lipavská H, Albrechtová J, Vreugdenhil D** (2001) Comparing carbohydrate status during norway spruce seed development and somatic embryo formation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 37(1), 24-28.
- Grigová M, Kubeš M, Drážná N, Řezanka T, Lipavská H** (2007) Storage lipid dynamics in somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*): histochemical and quantitative analyses. *Tree Physiol.* 27(11), 1533-1540.
- Hakman I** (1993) Embryology in norway spruce (*Picea abies*). An analysis of the

- composition of seed storage proteins and deposition of storage reserves during seed development and somatic embryogenesis. *Physiol. Plant.* 87(2), 148-159.
- Heraud P, Caine S, Sanson G, Gleadow R, Wood B R, McNaughton D** (2007) Focal plane array infrared imaging: a new way to analyse leaf tissue. *New Phytol.* 173(1), 216-225.
- Huck-Pezzei V A, Pallua J D, Pezzei C, Bittner L K, Schönbichler S A, Abel G, Popp M, Bonn G K, Huck C W** (2012) Fourier transform infrared imaging analysis in discrimination studies of St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *Anal. Bio. Chem.* 404(6-7), 1771-1778.
- Hudec L, Konrádová H, Hašková A, Lipavská H** (2016) Norway spruce embryogenesis: changes in carbohydrate profile, structural development and response to polyethylene glycol. *Tree Physiol.* 36(5), 548-561.
- Iraqi D, Tremblay F M** (2001) Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugars and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development. *J. Exp. Bot.* 52(365), 2301-2311.
- Joy IV R W, Yeung E C, Kong L, Thorpe T A** (1991) Development of white spruce somatic embryos: I. Storage product deposition. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 27(1), 32-41.
- King J E, Gifford D J** (1997) Amino acid utilization in seeds of loblolly pine during germination and early seedling growth (I. arginine and arginase activity). *Plant Physiol.* 113(4), 1125-1135.
- Klimaszewska K, Morency F, Jones-Overton C, Cooke J** (2004) Accumulation pattern and identification of seed storage proteins in zygotic embryos of *Pinus strobus* and in somatic embryos from different maturation treatments. *Physiol. Plant.* 121(4), 682-690.
- Klimaszewska K, Smith D R** (1997) Maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* is promoted by a high concentration of gellan gum. *Physiol. Plant.* 100(4), 949-957.
- Konrádová H, Grigova M, Lipavska H** (2003) Cold-induced accumulation of raffinose family oligosaccharides in somatic embryos of norway spruce (*Picea abies*). *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 39(4), 425-427.
- Le K C, Dedicova B, Johansson S, Lelu-Walter M A, Egertsdotter U** (2021) Temporary immersion bioreactor system for propagation by somatic embryogenesis of hybrid larch (*Larix x eurolepis* Henry). *Biotechnol. Rep.* 32, e00684.
- Lefebvre M, Villar M, Boizot N, Delile A, Dimouro B, Lomenech A M, Teyssier C** (2022) Variability in seeds' physicochemical characteristics, germination and seedling growth within and between two French *Populus nigra* L. populations. *Peer Community Journal* 2(e10).
- Lelu M A, Label P** (1994) Changes in the levels of abscisic acid and its glucose ester conjugate during maturation of hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*) somatic embryos, in relation to germination and plantlet recovery. *Physiol. Plant.* 92, 53-60.
- Lelu-Walter M A, Pâques L E** (2009) Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix x* and *Larix x marschlinsii*). *Perspectives for breeding.* *Ann. For. Sci.* 66, 104.
- Lelu M A, Klimaszewska K, Pflaum G, Bastien C** (1995) Effect of maturation duration on desiccation tolerance in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea* dengler) somatic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 31, 15-20.

- Lelu-Walter M A, Teyssier C, Guérin V, Pâques L** (2016) Vegetative propagation of larch species: somatic embryogenesis improvement towards its integration in breeding programs. In: Park Y S B J, Moon H K (ed) Vegetative Propagation of Forest Trees. National Institute of Forest Science (NIFoS), Seoul, Korea, pp 551-571.
- Lelu-Walter M A, Thompson D, Harvengt L, Sanchez L, Toribio M, Pâques L E** (2013) Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction. *Tree Genet. Genomes* 9(4), 883-899.
- Lesnoff M** (2021) R package rchemo: Dimension reduction, regression and discrimination for chemometrics. <https://github.com/mlesnoff/rchemo>. CIRAD, UMR SELMET, Montpellier, France.
- Lesnoff M, Metz M, Roger J M** (2020) Comparison of locally weighted PLS strategies for regression and discrimination on agronomic NIR data. *J. Chem.* 34, e3209.
- Lipavská H, Konrádová H** (2004) Somatic embryogenesis in conifers: The role of carbohydrate metabolism. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 40(1), 23-30.
- Lipavská H, Svobodová H, Albrechtová J, Kumstýřová L, Vágner M, Vondráková Z** (2000) Carbohydrate status during somatic embryo maturation in norway spruce. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 36(4), 260-267.
- Locher F, Heuwinkel H, Gutser R, Schmidhalter U** (2005) Development of near infrared reflectance spectroscopy calibrations to estimate legume content of multispecies legume-grass mixtures. *Agron. J.* 97(1), 11-17.
- Maruyama T E, Hosoi Y** (2012) Post-maturation treatment improves and synchronizes somatic embryo germination of three species of Japanese pines. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 110(1), 45-52.
- Mevik B H, Wehrens R** (2015) Introduction to the pls Package. R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 1–23.
- Mishra P, Biancolillo A, Roger J M, Marini F, Rutledge D N** (2020) New data preprocessing trends based on ensemble of multiple preprocessing techniques. *Trends Anal. Chem.* 132, 116045.
- Morel A, Trontin J F, Corbineau F, Lomenech A M, Beaufour M, Reymond I, Le Metté C, Ader K, Harvengt L, Cadene M, Label P, Teyssier C, Lelu-Walter M A** (2014) Cotyledonary somatic embryos of *Pinus pinaster* Ait. most closely resemble fresh, maturing cotyledonary zygotic embryos: biological, carbohydrate and proteomic analyses. *Planta* 240, 1075-1095.
- Morel A, Teyssier C, Trontin J F, Eliášová K, Pešek B, Beaufour M, Morabito D, Boizot N, Le Metté C, Belal-Bessai L, Reymond I, Harvengt L, Cadene M, Corbineau F, Vágner M, Label P, Lelu-Walter M A** (2014a) Early molecular events involved in *Pinus pinaster* Ait. somatic embryo development under reduced water availability: transcriptomic and proteomic analyses. *Physiol. Plant.* 152(1), 184-201.
- Otsuka M** (2020) Near-infrared spectroscopy application to the pharmaceutical industry. In: Meyers RA (ed) *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Wiley, pp 1-15.
- Pâques L E** (1992) Performance of vegetatively propagated *Larix decidua*, *L. kaempferi* and *L. laricina* hybrids. *Ann. For. Sci.* 49(1), 63-74.
- Pescador R, Kerbauy G B, dos Santos D Y A C, Dal Vesco L L, de Freitas Fraga H P, Guerra M P** (2012) Comparative study of reserve lipid accumulation during somatic and zygotic *Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret embryogenesis. *Acta Physiol. Plant.* 34(2), 771-778.

- Pond S E, Von Aderkas P, Bonga J M** (2002) Improving tolerance of somatic embryos of *Picea glauca* to flash desiccation with a cold treatment (desiccation after cold acclimation). *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 38(4), 334-341.
- Prewein C, Vagner M, Wilhelm E** (2004) Changes in water status and proline and abscisic acid concentrations in developing somatic embryos of pedunculate oak (*Quercus robur*) during maturation and germination. *Tree Physiol.* 24(11), 1251-1257.
- Pulkka S, Segura V, Harju A, Tapanila T, Tanner J, Pâques L E, Charpentier J P** (2016) Prediction of stilbene content from heartwood increment cores of scots pine using near infrared spectroscopy methodology. *J. Near Infrared Spectroscop.* 24(6), 517–528.
- Pullman G S, Buchanan M** (2008) Identification and quantitative analysis of stage-specific carbohydrates in loblolly pine (*Pinus taeda*) zygotic embryo and female gametophyte tissues. *Tree Physiol.* 28(7), 985-996.
- Qu J H, Liu D, Cheng J H, Sun D W, Ma J, Pu H, Zeng X A** (2015) Applications of near-infrared spectroscopy in food safety evaluation and control: a review of recent research advances. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 55(13), 1939-1954.
- Rinnan Å, Berg F V D, Engelsen S B** (2009) Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. *Trends Anal. Chem.* 28(10), 1201-1222.
- Rodríguez-Gacio M C, Matilla-Vázquez M A, Matilla A J** (2009) Seed dormancy and ABA signaling: the breakthrough goes on. *Plant Signal. Behav.* 4(11), 1035-1049.
- Roger J M, Biancolillo A, Marini F** (2020) Sequential preprocessing through ORThogonalization (SPORT) and its application to near infrared spectroscopy. *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 199, 103975.
- Savane P, Belmokhtar N, Delile A, Boizot N, Ridel C, Lelu-Walter M A, Teyssier C** (2023) Characterisation of hybrid larch somatic embryo maturation by biochemical analyses and by a novel, fast mid-infrared method. *Physiol. Plant.* 175(4), e13966.
- Shoib A, Akhtar N, Nafisa, Aftab A** (2013) Fourier transform-infrared spectroscopy to monitor modifications in canola biochemistry caused by *Alternaria destruens*. *Pak. J. Phytopathol.* 25(2), 105-109.
- Silveira V, Balbuena T S, Santa-Catarina C, Floh E I S, Guerra M P, Handro W** (2004) Biochemical changes during seed development in *Pinus taeda* L. *Plant Growth Regul.* 44, 147-156.
- Stasolla C, Kong L, Yeung E C, Thorpe T A** (2002) Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 38(2), 93-105.
- Strug I, Utzat C, Cappione A, Gutierrez S, Amara R, Lento J, Capito F, Skudas R, Chernokalskaya E, Nadler T** (2014) Development of a univariate membrane-based mid-infrared method for protein quantitation and total lipid content analysis of biological samples. *J. Anal. Methods Chem.* 2014, 657079.
- Tereso S, Zoglauer K, Milhinhos A, Miguel C, Oliveira M M** (2007) Zygotic and somatic embryo morphogenesis in *Pinus pinaster*: comparative histological and histochemical study. *Tree Physiol.* 27(5), 661-669.
- Terskikh V V, Feurtado J A, Borchardt S, Giblin M, Abrams S R, Kermode A R** (2005) *In vivo* <sup>13</sup>C NMR metabolite profiling: potential for understanding and assessing conifer seed quality. *J. Exp. Bot.* 56(418), 2253-2265.
- Teyssier C, Grondin C, Bonhomme L, Lomenech A M, Vallance M, Morabito D,**

- Label P, Lelu-Walter M A** (2011) Increased gelling agent concentration promotes somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix x eurolepis*): a 2-DE proteomic analysis. *Physiol. Plant.* 141, 152-165.
- Teyssier C, Maury S, Beaufour M, Grondin C, Delaunay A, Le Metté C, Ader K, Cadene M, Label P, Lelu-Walter M A** (2014) In search of markers for somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix x eurolepis*): global DNA methylation and proteomic analyses. *Physiol. Plant.* 150, 271-291.
- Tigabu M** (2003) Characterization of forest tree seed quality with near infrared spectroscopy and multivariate analysis. Thesis. Umeå, ISBN 91-576-6508-7.
- Tigabu M, Odén P C, Lindgren D** (2005) Identification of seed sources and parents of *Pinus sylvestris* L. using visible-near infrared reflectance spectra and multivariate analysis. *Trees* 19, 468-476.
- Tigabu M, Odén P C, Shen T Y** (2004) Application of near-infrared spectroscopy for the detection of internal insect infestation in *Picea abies* seed lots. *Can. J. For. Res.* 34(1), 76-84.
- Trontin J F, Klimaszewska K, Morel A, Hargreaves C L, Lelu-Walter M A** (2016) Molecular aspects of conifer zygotic and somatic embryo development: a review of genome-wide approaches and recent insights. In: Germana, M. & Lambardi, M. (Eds.) *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants. Methods in Molecular Biology.* New York: Springer Science Business Media, pp. 167–207
- Tsuchikawa S, Kobori H** (2015) A review of recent application of near infrared spectroscopy to wood science and technology. *J. Wood Sci.* 61, 213-220.
- Tsuchikawa S, Ma T, Inagaki T** (2022) Application of near-infrared spectroscopy to agriculture and forestry. *Anal. Sci.* 38, 635-642.
- Türker-Kaya S, Huck C W** (2017) A review of mid-infrared and near-infrared imaging: principles, concepts and applications in plant tissue analysis. *Molecules* 22(1), 168.
- Välimäki S, Teyssier C, Tikkinen M, Delile A, Boizot N, Varis S, Lelu-Walter M A, Aronen T** (2022) Norway spruce somatic embryogenesis benefits from proliferation of embryogenic tissues on filter discs and cold storage of cotyledonary embryos. *Front. Plant Sci.* 13, 1031686.
- Wang Y, Xiang J, Tang Y, Chen W, Xu Y** (2021) A review of the application of near-infrared spectroscopy (NIRS) in forestry. *Appl. Spectrosc. Rev.* 57(4), 300-317.
- Weber H, Buchner P, Borisjuk L, Wobus U** (1996) Sucrose metabolism during cotyledon development of *Vicia faba* L. is controlled by the concerted action of both sucrose-phosphate synthase and sucrose synthase: expression patterns, metabolic regulation and implications for seed development. *Plant J.* 9(6), 841-850.
- Weber H, Borisjuk L, Heim U, Sauer N, Wobus U** (1997) A role for sugar transporters during seed development: Molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in fava bean seeds. *Plant Cell* 9(6), 895-908.
- Williams P, Norris K H** (2021) Near-infrared technology in the agricultural and food industries. Paul, Minn., USA: American Association of Cereal Chemists, St.
- Wobus U, Weber H** (1999) Sugars as signal molecules in plant seed development. *Biol. Chem.* 380(7-8), 937-944.
- Wold S, Esbensen K, Geladi P** (1987) Principal component analysis. *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 2(1), 37-52.
- Workman J J, Weyer L** (2007) Practical guide to interpretive near-infrared spectroscopy (1st ed.). In: Press. C (ed).

## Chapitre III – Comparaison des embryons somatiques *versus* embryons zygotiques en regard de leurs réserves. Essais de traitements pour améliorer l'accumulation des RFO

Chez le mélèze hybride, les ES cotylédonaire sont transférés sur milieu de germination après 8 semaines de maturation. La sélection des ES est primordiale pour obtenir *in fine* des plants de qualité en termes de vigueur et de croissance. En général, la qualité de l'ES est déterminée selon sa ressemblance avec l'EZ. Ainsi, chez le mélèze hybride les ES cotylédonaire sont morphologiquement et anatomiquement identiques aux EZ (Von Aderkas et al., 2015). Outre les critères morphologiques et anatomiques, la qualité de l'ES peut aussi être estimée selon des variables biochimiques. Ainsi les ES sont proches des EZ secs par leurs teneurs en protéines totales (Teyssier et al., 2014). Il est en général admis que les caractéristiques des réserves des EZ secs (protéines, lipides, glucides) constituent une référence pour les ES. Par conséquent, dans ce chapitre nous avons comparé tout d'abord les ES à des EZ issus de graines récoltées à différents stades de maturité (frais vs sec).

Contrairement à d'autres conifères comme l'épicéa (Pond et al., 2002), les ES de mélèze sont capables de germer en l'absence d'un traitement de déshydratation. Cependant, l'application d'une déshydratation aux ES a permis de se rapprocher des caractéristiques biologiques des EZ (teneur en eau) et d'améliorer la synchronisation de la germination et le développement en plante (Lelu et al., 1995). Pour pouvoir être déshydratés, les ES doivent acquérir une tolérance à la déshydratation. Durant la maturation, les ES accumulent des composés de réserves nécessaires aux processus développementaux ultérieurs. Ces réserves sont utilisées comme source de carbone et d'énergie pour soutenir la germination et la conversion en plante (Coelho et Benedito, 2008). Par ailleurs, les glucides solubles sont aussi indispensables à la protection des ES durant l'étape de déshydratation (Hoekstra et al., 2001 ; Lipavská et Konrádová, 2004). Parmi ces glucides solubles, les RFO sont reconnus être importants pour la protection contre divers stress abiotiques (froid, déshydratation) et comme marqueurs de la tolérance à la déshydratation (ElSayed et al., 2014 ; Keller et Ludlow, 1993). Dans le chapitre I nous avons observé durant la maturation des ES de mélèze hybride, le début d'une synthèse de raffinose à partir de la 8<sup>ème</sup> semaine (Savane et al., 2023). Le deuxième objectif du chapitre II est d'essayer promouvoir cette synthèse de raffinose afin de préparer les ES à une déshydratation. Pour ce faire, nous avons testé 2 traitements. Le traitement 1 correspond à un renouvellement du milieu de maturation. Ce renouvellement du milieu est régulièrement réalisé pour des espèces comme *Abies cephalonica* (Krajňáková et Häggman, 2009), *Picea abies* (Eliášová et al., 2022), *Pinus pinaster* (Ramarosandratana et al., 2001). Pour *Abies nordmanniana* cela semble nécessaire, la durée de maturation étant particulièrement longue (20 semaines, Find et al., 2002). Ainsi nous espérons fournir à nouveau en quantité non limitante, les éléments nécessaires à la synthèse des composés de réserves pour *in fine* booster l'accumulation de réserves énergétiques et de raffinose chez les ES.



Chez *Picea abies* l'exposition d'ES cotylédonaire à +4°C a entraîné l'accumulation de RFO (raffinose, stachyose) (Konrádová et al., 2003 ; Välimäki et al., 2022). À l'image de ces études, pour le traitement 2, nous avons essayé de placer les boîtes de Petri avec les ES au froid. Par ailleurs, nous avons essayé de comprendre si les modifications dues au froid sont temporaires (changement d'environnement) ou permanentes suggérant une possible réorientation du métabolisme en faveur de l'acquisition de la tolérance à la déshydratation.

Pour résumer, les objectifs de ce chapitre sont :

(1) d'évaluer l'état de maturité des ES cotylédonaire de 8 semaines comparativement à l'EZ en regard de toutes leurs réserves (Figure III.1, partie 1). Pour ce faire, nous avons caractérisé les niveaux biologiques (poids frais, poids sec) et biochimiques (protéines, lipides, sucres) des ES de deux lignées (Q10, N23) et des EZ de mélèze hybride de la même variété (REVE-VERT). Les EZ sont issus de graines récoltées à 2 stades de maturité : le stade cotylédonaire frais (24 juin et 1<sup>er</sup> septembre) et le stade déshydraté correspondant à des EZ issus de graines sèches stockées, les caractéristiques biochimiques de ces derniers constituant notre référence. Cela nous permettra de disposer pour la première fois de l'état de maturité des ES de 8 semaines de mélèze hybride vis-à-vis des EZ au niveau de toutes leurs réserves (protéines, lipides, sucres).

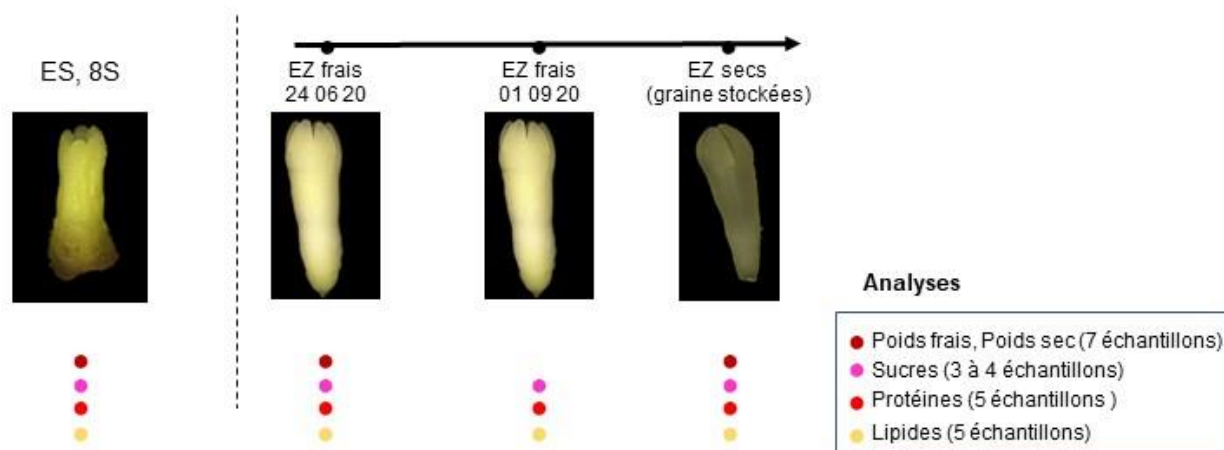
(2) d'améliorer l'accumulation de RFO chez l'ES par un renouvellement du milieu de maturation. Cela a consisté à transférer les filtres sur lesquels se développent les ES, sur un nouveau milieu de maturation pendant 2 ou 4 semaines (Figure III.1, partie 2).

(3) d'améliorer l'accumulation de RFO chez l'ES par un traitement à basse température. Les boîtes contenant les ES sont placées à +4°C pendant 1, 2 ou 3 semaines (Figure II.1, partie 3). Pour les boîtes traitées 2 semaines au froid, une partie a été remise en culture à 23°C pour observer si les modifications induites par le froid se maintiennent ou pas.

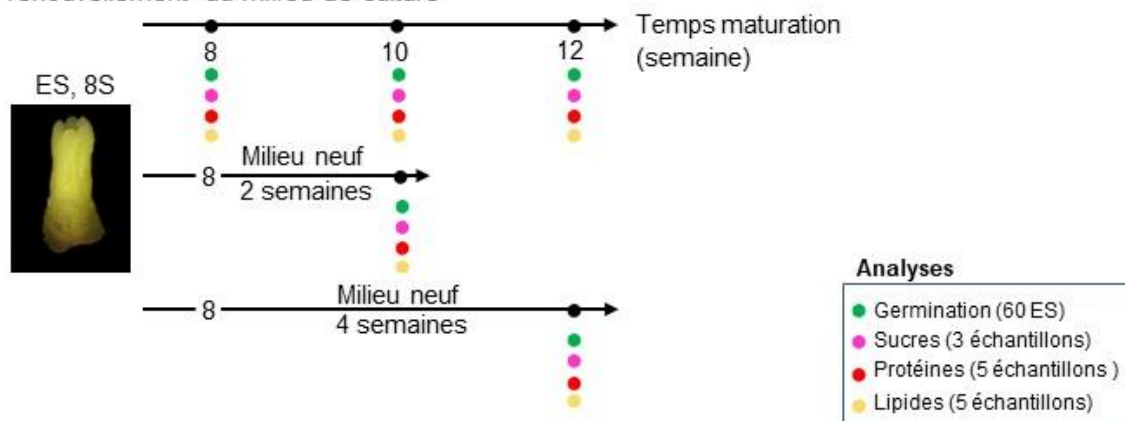
Les potentiels effets des traitements renouvellement et froid, ont été mesurés sur les caractéristiques biologiques (germination, conversion en plant) et sur les réserves (protéines, lipides, glucides) des ES (Figure III.1, parties 2 et 3).

À notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée pour comprendre les effets de la remise sur milieu neuf de maturation sur les caractéristiques biologiques et biochimiques des ES. Notre étude fournira des informations utiles à la compréhension de la maturation des ES. En particulier pour les espèces dont le renouvellement de milieu culture est réalisé en routine (*Abies nordmanniana*, *Abies cephalonica*, *Picea abies*, *Pinus pinaster*) (Find et al., 2002 ; Krajňáková et Häggman, 2009 ; Eliášová et al., 2022 ; Ramarosandratana et al., 2001). De plus, l'originalité des études menées dans ce chapitre réside aussi dans la partie concernant les expérimentations mises en œuvre pour comprendre si le traitement à faible température entraîne une réorientation du métabolisme ou non.

Partie 1. Comparaison des réserves des ES de 8 semaines par rapport aux EZ issus de graines récoltées à différents stades de maturité



Partie 2. Essai d'amélioration de l'accumulation des RFO des ES de 8 semaines par renouvellement du milieu de culture



Partie 3. Essai d'amélioration de l'accumulation des RFO par traitement des ES de 8 semaines à basse température

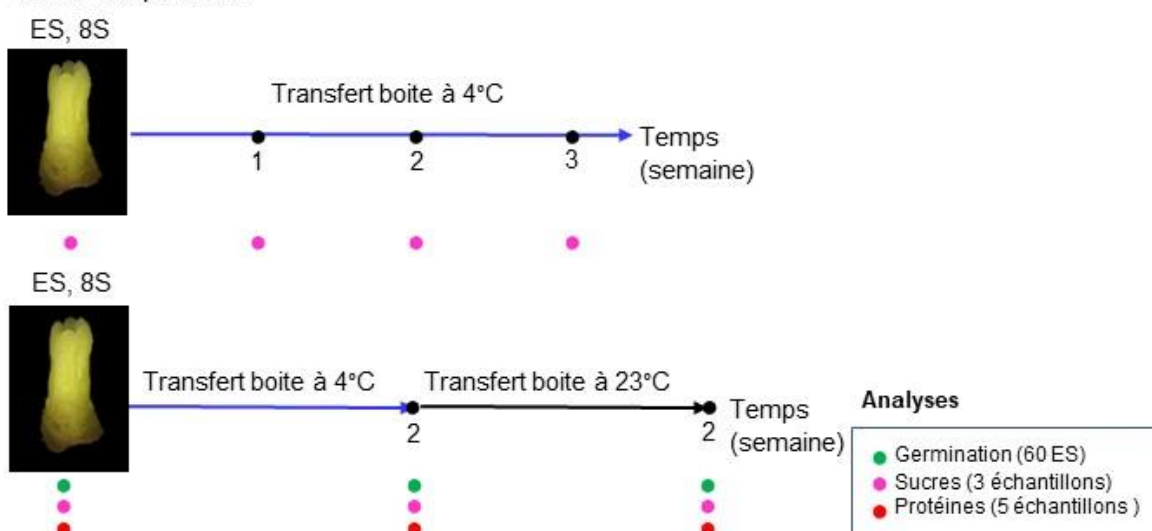


Figure III.1. Plans expérimentaux des analyses réalisées dans le chapitre 2.

### III.1. Comparaison des réserves des ES de 8 semaines par rapport aux EZ issus de graines récoltés à différents stades de maturité

#### III.1.1. Résultats

Le poids sec des ES représente respectivement 43 et 47% du poids frais pour les lignées Q10 et N23 (Figure III.2). Chez les EZ frais leur poids sec atteint 49% du poids frais, tandis que le poids sec des EZ secs représente 88% du poids frais. Par conséquent, le poids sec des ES est donc plus proche de celui des EZ frais du 24 juin que de celui des EZ secs.

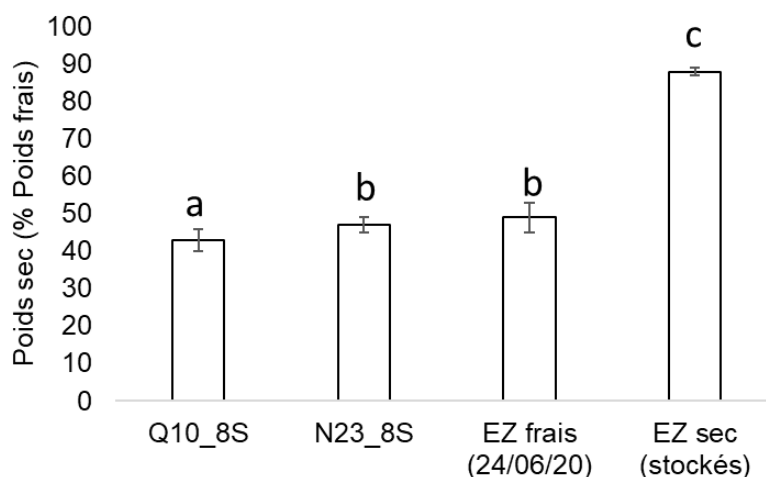


Figure III.2. Poids sec moyens des embryons somatiques de mélèze hybride de 8 semaines (lignées Q10 et N23) et d'embryons zygotiques en fonction de leur date de récolte. Les différences significatives pour  $p < 0.05$  sont indiquées par des lettres (ANOVA, Tuckey).  $n=7$

La teneur en protéines totales des ES atteint environ  $100 \mu\text{g mg}^{-1}$  matière fraîche (MF) quelle que soit la lignée (Figure III.3-A). Concernant les lipides totaux, la lignée Q10 présente une teneur significativement plus élevée que la N23 ( $635$  et  $840 \mu\text{g mg}^{-1}$  matière sèche (MS) respectivement, Figure III.3-B). Les ES des deux lignées présentent une même teneur en amidon (environ  $100 \mu\text{g mg}^{-1}$  MS, Figure III.3-C) et une teneur totale de sucres solubles équivalente ( $180 \mu\text{g mg}^{-1}$  MS, Figure III.3-D). Le saccharose est le sucre le plus abondant chez les ES représentant plus de 90% de la totalité des sucres solubles avec une teneur atteignant  $165 \mu\text{g mg}^{-1}$  MS (Tableau III.1). Viennent ensuite le fructose et le glucose (teneurs environ de  $5 \mu\text{g mg}^{-1}$  MS), puis les inositols et le raffinose avec des teneurs égales à  $3 \mu\text{g mg}^{-1}$  MS (Tableau III.1). Pour les deux lignées, ni le stachyose ni le galactose n'ont été détectés.

Les EZ présentent des teneurs en protéines, lipides et amidon équivalentes quel que soit leur stade de maturité (Figure III.3). Le saccharose et le raffinose constituent les sucres solubles majoritaires (Tableau III.1). Leurs teneurs varient significativement au cours de la maturation des EZ, augmentant significativement entre le 24 juin et le 1<sup>er</sup> septembre. Le stachyose non détecté chez les EZ frais apparaît chez les EZ secs. Pour tous les autres sucres (fructose, galactose, glucose, inositols, pinitol, raffinose, saccharose), les EZ secs présentent des teneurs similaires aux EZ du 24 juin (Tableau III.1).

Comparés au EZ, les ES présentent des teneurs en protéines et en lipides équivalentes au EZ frais. Par ailleurs, les ES présentent des teneurs en amidon 2.5 à

14 fois supérieures aux EZ. En regard de la teneur en sucres solubles totaux, les ES sont plus proches des EZ frais récoltés le 1<sup>er</sup> septembre (Tableau III.1). Néanmoins, le profil des glucides des ES diffère du profil des EZ par une teneur beaucoup plus forte en saccharose, par la présence de fructose et de glucose et par la très faible proportion voire l'absence de RFO (Figure III.3-D).

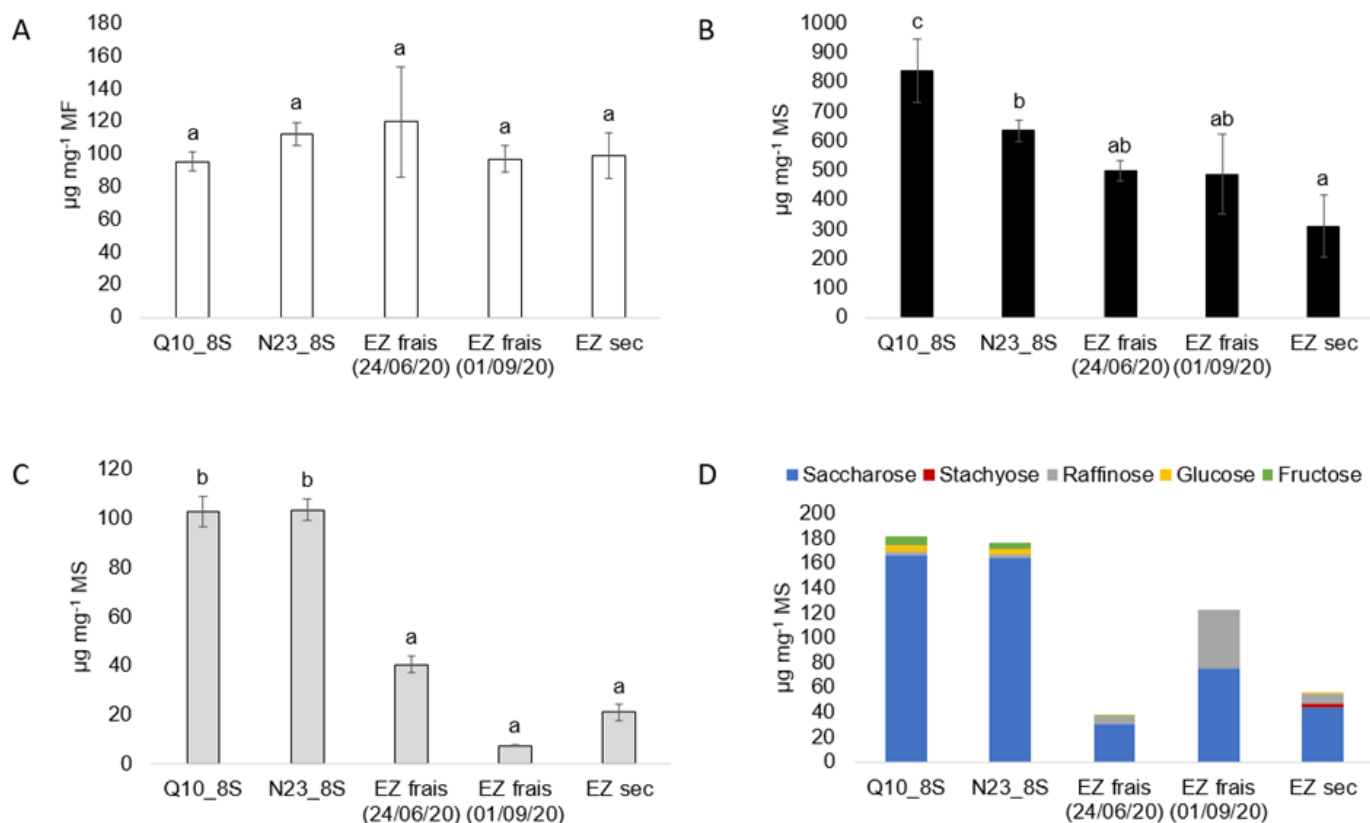


Figure III.3. Caractéristiques biochimiques des embryons somatiques de mélèze hybride de 8 semaines (lignées Q10 et N23) et d'embryons zygotiques cotylédonaire en fonction de leur date de récolte. A : Teneurs moyennes en protéines totales. B : Teneurs moyennes en lipides totaux. C : Teneurs moyennes en amidon. D : Profils moyens de sucres solubles. Les différences significatives pour  $p < 0.05$  sont indiquées par des lettres (ANOVA, Tuckey).  $n=3-5$ .

Tableau III.1. Teneurs moyennes en sucres solubles des embryons somatiques de mélèze hybride de 8 semaines (lignées Q10 et N23) et d'embryons zygotiques cotylédonaire en fonction de leur date de récolte. Les différences significatives pour  $p < 0.05$  sont indiquées par des lettres (ANOVA, Tuckey).  $n=3-4$

Matériel	Fructose	Galactose	Glucose	Inositols	Pinitol	Raffinose	Saccharose	Stachyose	Sucres solubles totaux
Embryons somatiques, Q10	6.12 ± 1.64 <sup>b</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>	5.84 ± 1.68 <sup>a</sup>	3.1 ± 0.36 <sup>c</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>	3.03 ± 0.25 <sup>b</sup>	165.94 ± 13.61 <sup>c</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>	184.04 ± 11.15 <sup>c</sup>
Embryons somatiques, N23	4.57 ± 0.73 <sup>b</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>	4.15 ± 0.42 <sup>a</sup>	3.05 ± 0.13 <sup>c</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>	3.16 ± 0.59 <sup>b</sup>	164.13 ± 8.28 <sup>c</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>	179.05 ± 8.39 <sup>c</sup>
Embryons zygotiques frais (24/06/20)	0.02 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.17 ± 0.29 <sup>a</sup>	0.17 ± 0.16 <sup>b</sup>	1.63 ± 0.24 <sup>a</sup>	0.28 ± 0.12 <sup>a</sup>	5.99 ± 1.81 <sup>ab</sup>	30.41 ± 11.94 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>	38.67 ± 13.98 <sup>a</sup>
Embryons zygotiques frais (01/09/20)	0 ± 0 <sup>a</sup>	1.75 ± 0.29 <sup>b</sup>	0 ± 0 <sup>b</sup>	0.72 ± 0.07 <sup>b</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>	47.02 ± 2.17 <sup>c</sup>	75.81 ± 8.61 <sup>b</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>	125.3 ± 6.79 <sup>b</sup>
Embryons zygotiques secs (graines stockées)	0 ± 0 <sup>a</sup>	0.26 ± 0.23 <sup>a</sup>	0.12 ± 0.21 <sup>b</sup>	0.76 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.13 ± 0.22 <sup>a</sup>	8.99 ± 0.59 <sup>a</sup>	44.14 ± 5 <sup>a</sup>	2.32 ± 0.51 <sup>b</sup>	56.72 ± 5.91 <sup>a</sup>

### III.1.2. Discussion

#### **Caractéristiques des embryons zygotiques (EZ) de mélèze hybride au cours de leur maturation**

Le passage des EZ frais à l'état d'EZ secs est caractérisé par une augmentation significative du poids sec des embryons (de 49% du poids frais pour les EZ frais à 88% du poids frais pour les EZ secs). Cette augmentation a précédemment été rapportée au cours de la maturation d'EZ de pin maritime qui par ailleurs a été partiellement associée à l'augmentation de la teneur en protéines totales (Morel et al., 2014b). Dans le cas du mélèze hybride, l'augmentation du poids sec des embryons ne peut être attribuée ni à une augmentation des réserves ni à une augmentation de la teneur en amidon étant donné qu'aucune différence significative n'a été observée en regard de la teneur en protéines, lipides, sucres solubles totaux ou amidon entre les EZ frais récoltés le 24 juin et les EZ secs. Néanmoins, dans notre cas et également pour le pin maritime, l'augmentation du poids sec des EZ de mélèze hybride peut être la conséquence de la réduction de la teneur en eau qui se déroule durant la transition entre la phase de maturation et la phase de déshydratation des graines (Morel et al., 2014a).

Entre le 24 juin et le 1<sup>er</sup> septembre, la maturation des EZ frais est principalement marquée par une augmentation significative de la teneur en saccharose et en raffinose, l'accumulation de stachyose s'observant uniquement dans les EZ secs. Les RFO, dont le raffinose et stachyose, sont des marqueurs importants de la tolérance à la déshydratation (Oliver et al., 2020). Ils apparaissent tardivement pendant la maturation des graines de légumineuses et sont essentiels à la protection des structures et des composés cellulaires à l'état déshydraté (Corbineau et al., 2000 ; Obendorf et al., 2009 ; Sanyal et al., 2023). Chez les conifères, l'accumulation des RFO a notamment été observée durant la maturation des EZ de *Picea abies* et de *Pinus pinaster* (Gösslová et al., 2001 ; Morel et al., 2014b).

#### **Comparaison des embryons somatiques de 8 semaines (ES 8S) et des embryons zygotiques de mélèze hybride en regard du poids secs et des réserves**

Le poids sec des ES est équivalent ou légèrement inférieur à celui des EZ frais ; il reste très inférieur à celui des ES secs. Des résultats similaires ont été observés pour les ES de pin maritime qui sont plus proches des EZ frais en regard de leur poids sec (Morel et al., 2014b).

Chez les conifères, les protéines et les lipides constituent les principales réserves de la graine. Ils servent de source d'énergie et sont indispensables à la germination (Silveira et al., 2004). La teneur en protéines totales des ES est équivalente à celle des EZ, fait déjà rapporté pour le mélèze hybride (Teyssier et al., 2014). L'accumulation des protéines a été améliorée suite à l'augmentation de la concentration du gélifiant du milieu de culture chez le mélèze hybride (Teyssier et al. 2011) et chez le pin maritime (Morel et al., 2014a). Concernant les lipides totaux, qui sont peu étudiés chez les conifères, les ES présentent une teneur proche de celle des EZ frais mais significativement plus élevée que celle des EZ secs. Pour de nombreuses espèces, il a été observé que la teneur en lipides des ES est généralement inférieure à celle des EZ. C'est le cas chez le colza, le coton (Crouch, 1982 ; Shoemaker et al., 1987) et l'épinette blanche (Joy IV et al., 1991) et l'épicéa commun pour les conifères (Feirer et al., 1989). Pour ce dernier, un manque des réserves lipidiques pourrait avoir des répercussions négatives sur la germination ultérieures des ES (Feirer et al. 1989).

Bien que les ES soient proches des EZ secs au regard des lipides au niveau quantitatif, un manque de connaissance subsiste quant à l'aspect qualitatif car le profil de lipides n'a pas été déterminé. Or, cette information est reconnue pour être un indicateur de la qualité des embryons et mérite d'être explorée (Brownfield et al., 2007 ; Pescador et al., 2012 ; Hudec et al., 2016).

Les ES 8S synthétisent plus d'amidon que les EZ. Nos résultats sont en accord avec les études comparant les ES et EZ de diverses espèces de conifères telles que *Picea glauca* (Joy IV et al., 1991) et *Pinus pinaster* (Tereso et al., 2007). Durant la maturation des graines, la synthèse d'amidon semble être positivement corrélée à la concentration en saccharose dans les tissus de réserve (Bhullar, 1995). Dans les ES, cette synthèse accrue pourrait alors être expliquée par la forte concentration en saccharose du milieu de culture (Lelu-Walter et Pâques, 2009).

Concernant les sucres solubles, les ES ainsi que les EZ contiennent principalement du saccharose et peu d'hexoses. Concernant les RFO, les ES 8S présentent une légère synthèse de raffinose tandis que chez les EZ, après le saccharose, le raffinose représente un des sucres majoritaires et ce quel que soit le stade de maturité. Le stachyose n'a été détecté que chez les EZ secs. Nos résultats sont en accord avec les précédentes études comparant les ES et EZ de *Picea abies* (Gösslová et al., 2001) et *Pinus pinaster* (Morel et al., 2014b). Cependant, au cours de leur maturation les ES de mélèze hybride synthétisent spontanément du raffinose (Savane et al 2023). Dans les graines, la déshydratation commence à la fin de la maturation et entraîne l'accumulation de composés de protection tels que les RFO (Salvi et al., 2022). Ainsi, la synthèse spontanée de raffinose chez les ES pourrait être une réponse au signal émis par la faible déshydratation induite par les caractéristiques du milieu de culture i.e. la concentration élevée en gélifiant du milieu (Teyssier et al., 2011). Néanmoins, la teneur en raffinose mesurée chez les ES reste très inférieure à celle des EZ. Cela pourrait être expliquée par plusieurs hypothèses (1) une moindre efficacité de la raffinose synthase chez l'ES, l'enzyme permettant la conversion du saccharose en raffinose (Sengupta et al., 2015) (2) l'absence de pinitol chez l'ES. Ce sucre est potentiellement un composé directement lié à la synthèse de RFO. Le lien entre pinitol et raffinose a notamment été observé pour les graines de soja en cours de développement où la diminution de pinitol coïncide avec l'accumulation de raffinose (Kuo et al., 1997). Ainsi l'absence de pinitol chez les ES 8S pourrait conduire à une moindre synthèse de raffinose (Gösslova et al., 2001). Par ailleurs, l'absence de stachyose chez nos ES pourrait être expliquée par le fait qu'ils ne le synthétisent pas encore car n'ayant pas totalement terminé leur maturation. Cette hypothèse est renforcée par le fait que les ES 8S sont plus proches des caractéristiques biologiques et biochimiques des EZ frais pour lesquels le stachyose n'a de même pas été détecté. Durant la formation des graines de légumineuses, l'accumulation de stachyose arrive après celle du raffinose (Corbineau et al., 2000 ; Obendorf et al., 2009). Par ailleurs, le stachyose est communément retrouvé dans les graines sèches (Corbineau et al., 2000 ; Tahir et al., 2011). L'absence de déshydratation chez les ES pourrait donc expliquer l'absence de stachyose.

En conclusion, les ES 8S de mélèze hybrides présentent des teneurs en protéines et lipides équivalentes aux EZ secs ; par contre, ils présentent une plus forte teneur en amidon et à l'inverse une moindre quantité de RFO. Du fait de la différence entre ES et EZ, les plants de mélèze hybride obtenus par embryogenèse somatique pourraient présenter un défaut de vigueur initiale ainsi qu'un retard de croissance par rapport aux plants issus de semis comme observé pour le pin maritime (Trontin et al., 2013). Il

s'agira donc par la suite d'essayer d'améliorer la synthèse des RFO par application de traitements aux ES de mélèze hybride. Nous espérons ainsi que les traitements permettront aux ES de se rapprocher des caractéristiques biochimiques des EZ secs. Des essais de traitements seront présentés dans la suite du chapitre.

## **III.2. Essai d'amélioration de l'accumulation des RFO des ES de 8 semaines par renouvellement du milieu de culture**

### **III.2.1. Résultats**

Par rapport aux EZ frais, les ES présentent 15 fois moins de raffinose. Ainsi, afin d'améliorer l'accumulation des RFO nous avons choisi de transférer les filtres avec les ES de 8 semaines sur un milieu neuf de maturation. La durée de culture a été de 2 (8S+2) et 4 semaines (8S+4). Les ES de 10 et 12 semaines constitueront les témoins de cette expérimentation (Figure III.1, partie 2).

Dans cette partie nous avons tenté de répondre à la question suivante : Quelles sont les effets d'un transfert des ES de mélèze hybride de 8 semaines sur un milieu neuf de maturation sur leurs caractéristiques biologiques et biochimiques ?

#### Caractéristiques biologiques

Au regard des caractéristiques biologiques, la germination des ES après 3 semaines de culture, la conversion en plante (après 8 semaines) ainsi que l'aspect morphologique des ES ont été mesurés.

Les ES de la lignée Q10 de 8, 10 et 12 semaines ne présentent aucune différence significative concernant le pourcentage de germination (de 98 à 100 %) et le taux de conversion en plants (de 82 %, à 77 %, Tableau III.2). Cependant, il a été observé l'apparition d'embryons hyperhydriques (Figure II.4) leur nombre restant cependant faible (Tableau III.2). Un transfert des ES de 2 semaines sur milieu neuf n'affecte en rien leur germination et conversion en plant (100 et 85 % respectivement). Comparés aux ES de 10 semaines (témoin sans renouvellement du milieu), les taux de germination et de conversion ne sont pas significativement différents ( $p < 0.05$ ). La fréquence d'apparition d'ES hyperhydrique est similaire entre les ES traités et les témoins. Pour les ES 8S+4, le pourcentage de germination (97 %) et le taux de conversion en plant (76 %) sont équivalents à ceux des ES de 12 semaines. Cependant, ce transfert de 4 semaines a entraîné une augmentation du nombre d'ES hyperhydriques (22% vs 3%).

Pour la lignée N23, le pourcentage de germination atteint 100 % quel que soit la durée de maturation (Tableau III.2). Concernant la conversion en plants, les ES de 10 et 12 semaines présentent des faibles taux de conversion (45 % et 32 % respectivement, Tableau III.2) significativement plus faibles que celui des ES de 8 semaines (93%). Par ailleurs, la période prolongée en maturation entraîne l'apparition d'ES hyperhydriques (Tableau III.2). Les ES 8S+2 ou S+4, ne présentent aucune différence significative (germination, conversion) avec respectivement des ES de 10 et 12 semaines (Tableau III.2). Enfin comme pour la lignée Q10, le transfert sur milieu neuf de 4 semaines a entraîné une légère augmentation du nombre d'ES hyperhydriques par rapport à la condition témoin 12 semaines.



Tableau III.2. Taux moyens de germination et de conversion en plante des ES de mélèze hybride des lignées Q10 et N23 suite à un transfert sur milieu neuf de maturation pendant 2 et 4 semaines. Les différences significatives pour  $p < 0.05$  sont indiquées par des lettres (ANOVA, Tuckey).  $n=6$

Lignée	Age des ES (semaines)	Traitement	Nb total ES mis en culture	Nb ES germés		Nb ES hyperhydriques	Nb plants		
				Total	%		Total	% rapporté au nb ES germés	% rapporté au nb total ES
Q10	8	Aucun	60	60	100 ± 0 <sup>a</sup>	4	49	82 ± 8 <sup>a</sup>	82 ± 8 <sup>a</sup>
	10	Aucun	60	58	100 ± 0 <sup>a</sup>	5	45	75 ± 19 <sup>a</sup>	75 ± 19 <sup>a</sup>
	12	Aucun	60	59	98 ± 4 <sup>a</sup>	2	45	77 ± 22 <sup>a</sup>	75 ± 20 <sup>a</sup>
	8	2S milieu neuf	60	60	100 ± 0 <sup>a</sup>	4	51	85 ± 5 <sup>a</sup>	85 ± 5 <sup>a</sup>
	8	4S milieu neuf	60	58	97 ± 8 <sup>a</sup>	13	44	76 ± 16 <sup>a</sup>	73 ± 18 <sup>a</sup>
N23	8	Aucun	60	60	100 ± 0 <sup>a</sup>	0	56	93 ± 8 <sup>a</sup>	93 ± 8 <sup>a</sup>
	10	Aucun	60	60	100 ± 0 <sup>a</sup>	12	27	45 ± 19 <sup>b</sup>	45 ± 19 <sup>b</sup>
	12	Aucun	60	59	100 ± 0 <sup>a</sup>	13	19	32 ± 12 <sup>b</sup>	32 ± 12 <sup>b</sup>
	8	2S milieu neuf	60	60	100 ± 0 <sup>a</sup>	13	23	38 ± 20 <sup>b</sup>	38 ± 20 <sup>b</sup>
	8	4S milieu neuf	60	59	98 ± 4 <sup>a</sup>	19	12	20 ± 18 <sup>b</sup>	20 ± 18 <sup>b</sup>



Figure III.4. Embryons somatiques de mélèze hybride de la lignée Q10 mis en germination suite à un transfert sur milieu neuf pendant 2 semaines. Les flèches indiquent les embryons somatiques hyperhydriques. Echelle : 1 cm = 0,6 cm.

#### Caractéristiques biochimiques

Au regard des caractéristiques biologiques, ont été mesurées les teneurs en protéines totales, lipides totaux, amidon et glucides (totaux, profils).

Chez la lignée Q10, la teneur en protéines totales est constante au cours de la maturation. La remise sur milieu neuf pendant 2 ou 4 semaines n'a pas eu d'effet significatif ( $p < 0.05$ ) par rapport aux témoins (Figure III.5-A). Pour la lignée N23, la teneur en protéines totales augmente significativement avec le temps de maturation, la teneur maximale étant atteinte à 12 semaines ( $140 \mu\text{g mg}^{-1}$  MF). La remise sur milieu neuf de maturation pendant 2 semaines a entraîné une diminution de la teneur en protéines totales par rapport au témoin 10 semaines sans renouvellement de milieu de culture. Comme pour la lignée Q10, le transfert sur milieu neuf de 4 semaines n'a pas d'effet sur la teneur en protéines par rapport au témoin 12 semaines.

La teneur en lipides totaux des ES de la lignée Q10 ne change pas au cours de la maturation et la remise sur milieu neuf n'a pas d'effet significatif (Figure III.5-B). Pour la lignée N23, la teneur en lipides totaux augmente avec le temps de maturation et atteint son maximum à 12 semaines ( $840 \mu\text{g mg}^{-1} \text{MS}$ ). La remise sur milieu neuf de maturation pendant 2 semaines n'a pas eu d'effet sur la teneur en lipides par rapport au témoin de 10 semaines. Néanmoins, le renouvellement de 4 semaines a entraîné la diminution significative de la teneur en lipides totaux par rapport au témoin de 12 semaines.

Pour les deux lignées, la teneur en sucres solubles totaux est équivalente entre les ES de 8, 10 et 12 semaines (Figure III.5-C et Tableau III.3), et la remise sur milieu neuf de 2 ou 4 semaines n'ayant aucun effet sur les teneurs. Au niveau du profil des sucres solubles, quelle que soit la lignée le temps de maturation n'a que très peu voire aucun effet sur les teneurs en fructose, galactose, glucose, inositols, et saccharose. Par ailleurs, est observée une augmentation significative de la teneur en raffinose au cours de la maturation : elle passe de 3 à  $13 \mu\text{g mg}^{-1} \text{MS}$  et de 3 à  $9 \mu\text{g mg}^{-1} \text{MS}$  pour la lignée Q10 et N23 respectivement (Tableau III.3). Pour la lignée Q10, la remise sur milieu neuf de maturation, pendant 2 ou 4 semaines, entraîne la diminution de la teneur en fructose, glucose et à l'inverse l'augmentation de la teneur en inositols par comparaison avec leurs témoins respectifs les ES de 10 et 12 semaines. Pour la lignée N23, comme pour la lignée Q10 le renouvellement du milieu entraîne la diminution significative de la teneur en raffinose par rapport aux témoins de 10 et 12 semaines (Tableau III.3).

Pour la lignée Q10, le temps de maturation n'a pas d'effet sur la teneur en amidon qui reste constante ( $100 \mu\text{g mg}^{-1} \text{MS}$ , Figure III.5-D). Pour la lignée N23, la teneur en amidon varie légèrement et la teneur maximale est observée après 10 semaines ( $125 \mu\text{g mg}^{-1} \text{MS}$ ). Pour les deux lignées, le renouvellement du milieu de culture entraîne une augmentation significative de la teneur en amidon. Après 2 semaines, la teneur en amidon atteint  $145$  et  $205 \mu\text{g mg}^{-1} \text{MS}$  pour Q10 et N23 respectivement ; après 4 semaines, elle augmente à  $160$  et  $267 \mu\text{g mg}^{-1} \text{MS}$ .

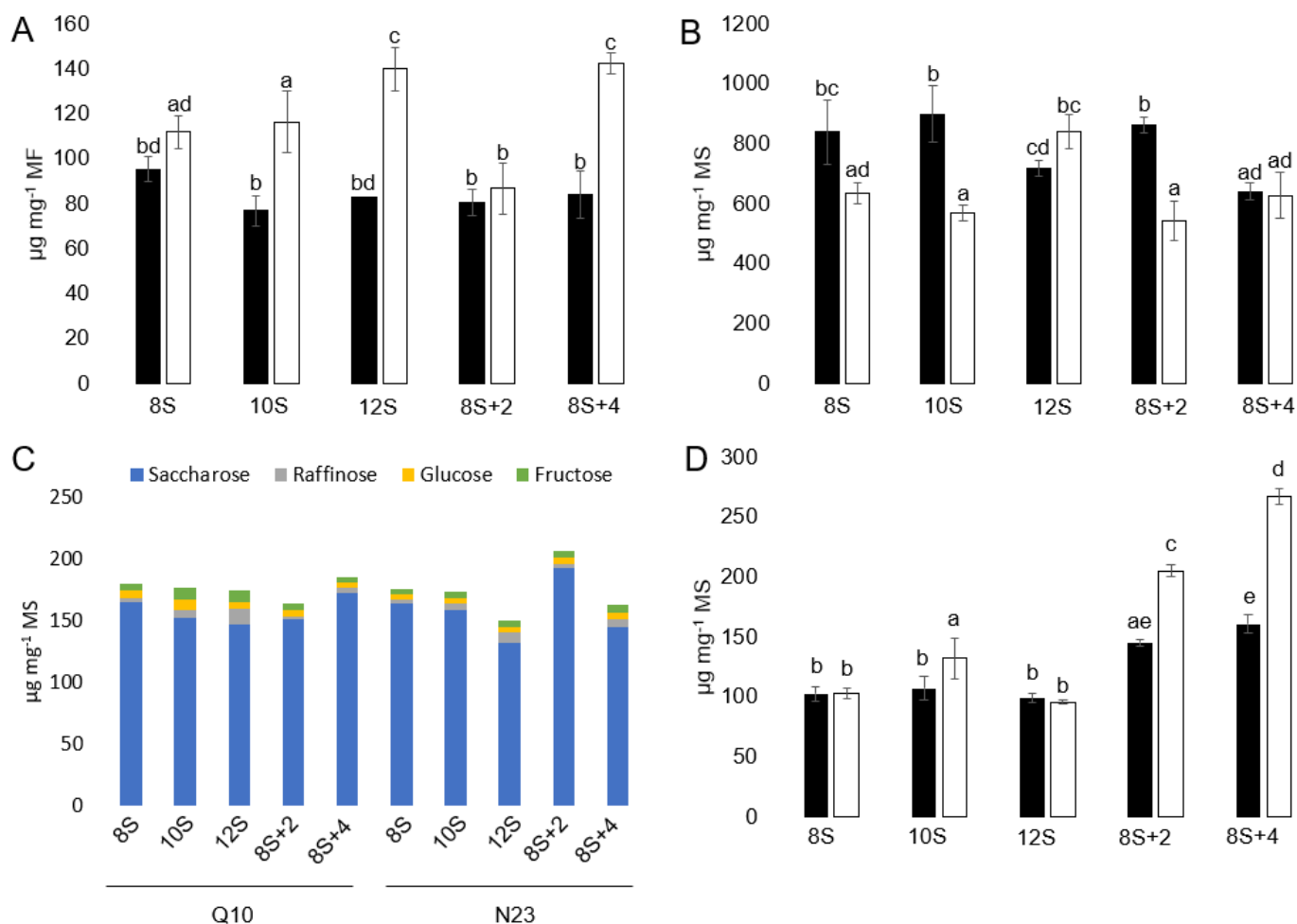


Figure III.5. Caractéristiques biochimiques des ES de mélèze hybride des lignées Q10 (■) et N23 (□) suite à un transfert sur milieu neuf de maturation pendant 2 semaines (8S+2) et 4 semaines (8S+4). A : Teneurs moyennes en protéines totales. B : Teneurs moyennes en lipides totaux. C : Profils moyens de sucres solubles. D : Teneurs moyenne en amidon. Les différences significatives pour  $p < 0.05$  sont indiquées par des lettres (ANOVA, Tuckey).  $n=3-5$

Tableau III.3. Teneurs moyennes en sucres solubles des ES de mélèze hybride des lignées Q10 et N23 suite à un transfert sur milieu neuf de maturation pendant 2 ou 4 semaines. Les différences significatives pour  $p < 0.05$  sont indiquées par des lettres (ANOVA, Tuckey).  $n=3$

Lignée	Age des ES (semaines)	Traitement	Fructose	Galactose	Glucose	Inositols	Raffinose	Saccharose	Sucres solubles totaux
Q10	8	Aucun	6.12 ± 1.64 ac	0 ± 0 a	5.84 ± 1.68 a	3.1 ± 0.36 be	3.03 ± 0.25 be	165.94 ± 13.61 ab	184.04 ± 11.15 ab
	10	Aucun	10.38 ± 0.61 b	0 ± 0 a	8.14 ± 0.92 c	1.92 ± 0.12 ac	6.45 ± 1.85 a	152.72 ± 3.74 ab	179.61 ± 3.77 ab
	12	Aucun	8.93 ± 1.13 bc	0 ± 0 a	5.64 ± 0.58 ab	1.26 ± 0.12 c	12.91 ± 1.01 d	147.22 ± 13.73 ab	175.96 ± 13.05 ab
	8	2S milieu neuf	5.33 ± 1.5 a	0 ± 0 a	4.78 ± 0.56 ab	3.79 ± 0.6 e	2.99 ± 0.3 be	151.19 ± 52.99 ab	168.07 ± 50.36 ab
	8	4S milieu neuf	4.63 ± 0.76 a	0 ± 0 a	3.41 ± 0.31 b	2.83 ± 0.12 bd	4.24 ± 0.7 ae	173.4 ± 6.89 ab	188.52 ± 6.2 ab
	N23	8	Aucun	4.57 ± 0.73 a	0 ± 0 a	4.15 ± 0.42 ab	3.05 ± 0.13 be	3.16 ± 0.59 be	164.13 ± 8.28 ab
10		Aucun	5.02 ± 0.96 a	0 ± 0 a	4.03 ± 0.69 ab	2.57 ± 0.23 ab	5.8 ± 1.71 ab	158.97 ± 20.99 ab	176.39 ± 20.79 ab
12		Aucun	4.58 ± 0.57 a	0.58 ± 0.19 b	4.25 ± 0.59 ab	2.51 ± 0.24 ab	9.35 ± 0.62 c	132.13 ± 10.4 a	153.41 ± 11.96 a
8		2S milieu neuf	5.9 ± 1.02 a	0 ± 0 a	5.06 ± 0.83 ab	3.58 ± 0.5 de	2.56 ± 0.81 e	193.74 ± 4.68 b	210.84 ± 2.75 b
8		4S milieu neuf	6.93 ± 0.84 ac	0.55 ± 0.14 b	4.76 ± 0.24 ab	1.57 ± 0.19 c	6.47 ± 0.64 a	145.36 ± 12.15 ab	165.64 ± 11.91 ab

Tableau III.4. Pourcentage des effets traitement, lignée et interaction traitement:lignée selon l'analyse ANOVA effectuée pour les différentes variables (taux de germination, taux de conversion en plante, teneur en protéines, lipides, amidon et glucides solubles) mesurées chez les ES de mélèze hybride des lignées Q10 et N23 suite à un transfert sur milieu neuf de maturation pendant 2 ou 4 semaines.

Variabiles	Traitement	Lignée	Traitement:Lignée
Amidon	71.6	12.4	14.6
Fructose	17.8	16.5	48.8
Galactose	35.0	23.3	35.0
Germination	9.9	1.2	1.7
Glucose	20.3	15.5	43.6
Inositols	64.1	0.2	26.4
Lipides	12.6	28.8	42.7
Plant	22.7	34.1	17.7
Protéines	34.1	39.7	16.4
Raffinose	85.2	0.5	8.1
Saccharose	22.6	0.0	26.9
Sucres totaux	14.2	0.3	31.6

Pour conclure, nous avons observé que le transfert des ES sur milieu neuf pendant 4 semaines est défavorable à la qualité des ES considérant leur morphologie (augmentation des ES hyperhydriques). Le renouvellement du milieu de culture, quelle que soit la durée, n'a pas eu d'effet majeur au niveau des protéines, lipides et glucides solubles et n'a pas permis d'augmenter la teneur en RFO. Par ailleurs, le traitement a entraîné l'augmentation de la teneur en amidon, les éloignant plus des caractéristiques des EZ.

### III.2.2. Discussion

#### **Effets du renouvellement du milieu de culture sur les caractéristiques biologiques des ES de mélèze hybride**

Aucune différence significative n'a été notée entre les ES témoins et ceux ayant subi un renouvellement du milieu de culture pour leurs taux de germination et de conversion en plant. Néanmoins, un transfert de 4 semaines des ES sur milieu neuf entraîne une augmentation du nombre d'ES hyperhydriques qui représente 22 et 32% pour les lignées Q10 et N23 respectivement. L'hyperhydricité est un trouble physiologique courant en culture *in vitro* (Hazarika, 2006). Elle se caractérise par des perturbations aux niveaux morphologiques, physiologiques et métaboliques qui influencent négativement la qualité des embryons et des plants (Ziv, 1991). Les embryons hyperhydriques présentent des hypocotyles épaissis et des cotylédons fragiles, translucides et enroulés (Gaspar et al., 1995 ; Kevers et al., 2004). Bien qu'il n'y ait pas de consensus sur les causes de l'apparition d'hyperhydricité, plusieurs hypothèses peuvent être émises.

L'hyperhydricité peut être considérée comme une réponse au stress causée par l'environnement de culture (Gaspar et al., 1995). Dans notre cas, après 8 semaines

de maturation des équilibres s'établissent entre les ES et leur milieu de culture. Un renouvellement de milieu entraîne des modifications de l'environnement de culture dans lequel des équilibres gazeux et chimiques étaient en place. Ceci pourrait être perçu par les ES de mélèze hybride comme un stress d'où l'apparition d'ES hyperhydriques. De plus, le brutal changement osmotique dû à la pénétration du milieu de culture dans les tissus de l'embryon, aurait aussi un rôle dans l'apparition d'embryons hyperhydriques (Polivanova et Bedarev, 2022). Le fait de renouveler le milieu de culture pourrait exacerber la pénétration du milieu dans les ES, ceci entraînant par voie de conséquence une hyperhydricité. Bien que les cultures *in vitro* nécessitent des apports en glucides pour subvenir à leurs besoins énergétiques, il a été discuté le fait que des concentrations élevées en saccharose dans le milieu de culture puissent contribuer à l'apparition d'embryons hyperhydriques (Kevers et al., 2004 ; Hazarika, 2006). Or, le milieu de maturation des ES de mélèze est constitué d'une forte concentration en saccharose (0.2M) qui est par ailleurs renouvelée lors du transfert sur milieu neuf.

Une humidité relative élevée dans l'environnement de culture pourrait aussi expliquer l'émergence d'embryons hyperhydriques (Polivanova et Bedarev, 2022). L'hydratation accrue des tissus suite au renouvellement de milieu, pourrait entraîner la présence d'un surplus de liquide dans les espaces intercellulaires. Cela ayant pour effets une diminution de l'adhésion cellulaire et la formation d'espaces entre les cellules, engendrant par conséquence des modifications morphologiques et physiologiques non désirées. Par ailleurs, l'accumulation d'eau dans les tissus conduit à une hypoxie et donc à la synthèse d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Pucciariello et Perata, 2021). L'accumulation de ROS engendre des dommages au niveau des structures cellulaires qui se manifestent par des symptômes associés à l'hyperhydricité (Balén et al., 2009). Des troubles similaires sont observés dans les systèmes de culture d'ES en milieu liquide. Ces derniers favorisent l'apparition d'hyperhydricité en raison de la limitation en oxygène dans l'environnement de culture (Ascough et Fennel, 2004). Cela a notamment été observé lors de micropropagations d'orchidées, de cannes à sucre, de cacaoyers et de conifères (Snyman et al., 2011 ; Pancaningtyas, 2013 ; Egertsdotter et al., 2019 ; Nongdam et al., 2023).

### **Effets du renouvellement du milieu de culture sur les caractéristiques biochimiques des ES de mélèze hybride**

L'objectif du renouvellement de milieu de culture dans notre étude était d'améliorer l'accumulation des RFO dans l'ES. Par ailleurs, bien que les teneurs en protéines et lipides soient équivalentes entre les ES et les EZ, nous avons également étudié l'effet du renouvellement de milieu sur ces réserves. Au regard des protéines et des lipides, le renouvellement de milieu n'a pas eu d'effet chez la lignée Q10 tandis que chez N23 il a entraîné la diminution de leur teneur. Par ailleurs, pour les deux lignées, le renouvellement du milieu de culture a entraîné l'augmentation de la teneur en amidon et à l'inverse la diminution de la teneur en raffinose. A ce jour, il existe peu d'études portant sur l'effet d'un renouvellement de milieu de culture sur les caractéristiques biochimiques des ES. Néanmoins, il est possible de tenter d'expliquer les résultats qui ont été obtenus dans notre étude. Comme discuté précédemment, le renouvellement du milieu de culture peut engendrer un stress aux cultures. Par conséquent, le métabolisme des ES favoriserait l'activation des mécanismes de protection plutôt que la synthèse des réserves. Il serait probable que les mécanismes anti-oxydants soient activés pour éliminer les ROS qui auraient été produits en raison du stress (Balén et al., 2009). Il serait intéressant de mesurer l'accumulation de radicaux superoxyde, de

peroxyde d'hydrogène et de radicaux hydroxyle pour mettre en évidence un potentiel stress chez les ES.

Le raffinose ainsi que l'amidon sont des composés importants impliqués dans la tolérance à la déshydratation des graines (Hell et al., 2019). Ainsi, la réduction de la teneur en raffinose et une accumulation excessive d'amidon pourraient engendrer une vulnérabilité des ES face aux conditions de stress. L'accumulation d'amidon dans les ES peut avoir divers effets sur leur développement et leur viabilité. Ces effets peuvent être positifs mais aussi négatifs. L'amidon sert de source d'énergie et de nutriments chez les plantes (MacNeill et al., 2017). Mais, bien que l'amidon soit une réserve énergétique importante, une accumulation excessive pourrait limiter la disponibilité d'autres composés essentiels et entraver l'accumulation des réserves, d'où l'absence d'effet positif du renouvellement de milieu sur les teneurs en protéines, lipides et glucides. Par ailleurs, l'accumulation excessive d'amidon peut entraîner des troubles morphologiques de l'embryon tels que des cotylédons déformés qui peuvent nuire au développement de plantes de qualité (Polivanova et Bedarev, 2022). Dans notre cas, cet excès d'amidon pourrait être la cause de l'apparition d'ES hyperhydriques. Durant la germination, l'amidon est réduit en sucres simples par les amylases pour fournir l'énergie nécessaire à la croissance de l'embryon (Bewley et Black, 1994 ; Tetlow, 2011). Ainsi une forte teneur en amidon dans les ES pourrait augmenter la disponibilité de ces sucres simples assurant par conséquent un apport suffisant en énergie pour favoriser la croissance de l'embryon. Néanmoins, l'accumulation excessive d'amidon peut entraîner une production excessive de glucose. Or, des études ont démontré qu'une grande quantité de glucose cause une accumulation d'ABA qui va retarder voire inhiber la germination (Price et al., 2003). L'excès d'amidon pourrait par ailleurs empêcher l'action des enzymes permettant sa dégradation en limitant l'accessibilité aux molécules à cause d'un encombrement stérique. Par conséquent cela limite la production des sucres nécessaires à la germination ce qui pourrait entraîner la diminution du nombre de plants obtenus. Dans notre étude, l'accumulation d'amidon causé par le renouvellement du milieu de culture n'a pas eu d'effet ni sur la capacité germinative des ES ni sur le taux de conversion en plantes.

Les échanges entre le milieu de culture et les cultures sont complexes. Ainsi, le changement de milieu pourrait rompre cet équilibre et entraîner une perte de facteurs de régulation présents dans le milieu qui seraient importants pour la maturation des embryons. Néanmoins, pour les espèces présentant des temps longs de maturation telles que *Abies nordmanniana*, *Abies cephalonica*, *Picea abies* et *Pinus pinaster*, le renouvellement de milieu de culture au cours de la maturation est effectué de manière régulière (Find et al., 2002 ; Krajňáková et Häggman, 2009 ; Eliášová et al., 2022 ; Ramarosandratana et al., 2001). Pour ces espèces, l'absence de changement de milieu pourrait entraîner l'accumulation de substances toxiques au détriment du bon développement des ES.

En conclusion, les résultats obtenus dans cette étude suggèrent que le renouvellement du milieu de culture, que ce soit pour une durée de 2 ou 4 semaines, n'a pas été favorable étant donné l'apparition d'ES hyperhydriques. Par ailleurs, ces traitements n'ont pas permis la synthèse de RFO qui était l'objectif de l'étude. Concernant les protéines et les lipides, les analyses réalisées étaient seulement quantitatives. De fait, des analyses qualitatives de ces composés de réserves pourraient fournir des informations complémentaires pour mieux comprendre l'effet d'un renouvellement de culture.

### III.3. Essai d'amélioration de l'accumulation des RFO par traitement des ES à basse température

#### III.3.1. Résultats

Afin d'améliorer l'accumulation des RFO chez les ES pour se rapprocher des teneurs mesurées chez les EZ, nous avons testé l'effet du froid (+4°C). Les boîtes contenant les ES sont transférées à +4°C pendant 1, 2 ou 3 semaines. Les ES traités au froid sont dénommés 1S 4°C, 2S 4°C et 3S 4°C respectivement. Les ES de 8 semaines sont les témoins dans cette expérimentation (Figure III.1, partie 3).

Dans cette partie nous tenterons de répondre aux deux questions suivantes :

- Quels sont les effets d'un traitement au froid sur les caractéristiques biologiques et les glucides des ES ?
- Les modifications observées après traitement au froid peuvent-elles se maintenir dans le temps ?

#### Caractéristiques biologiques et glucides

Dans cette partie, ont été considérés l'aspect morphologique des ES, leur teneur en eau, les glucides solubles et l'amidon après 1, 2 et 3 semaines au froid.

Les ES de 8 semaines sont jaunâtres avec des coiffes racinaires brunâtres, tandis que les ES transférés au froid présentent des coiffes racinaires avec une légère coloration rouge (Figure III.6).

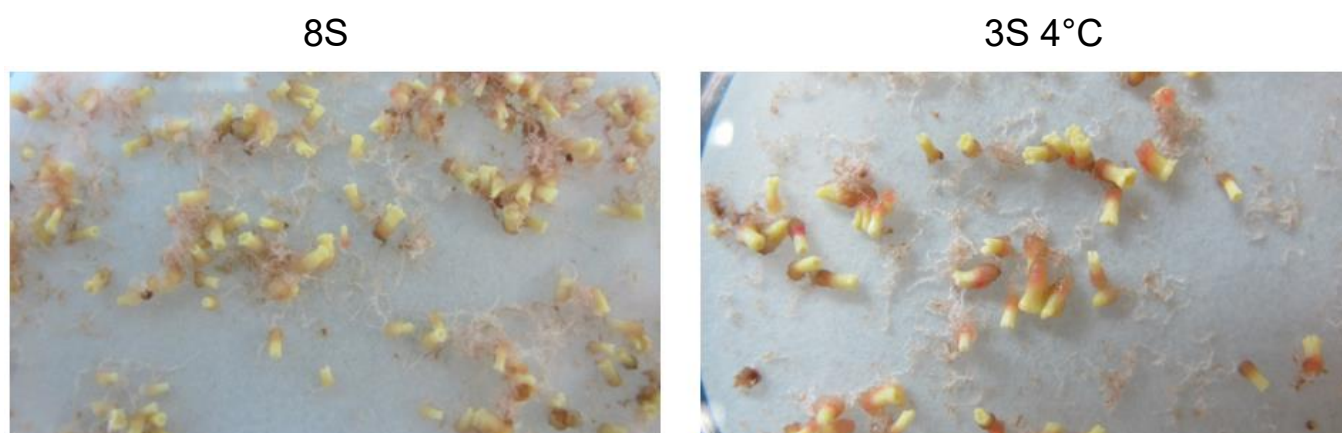


Figure III.6. Embryons somatiques de mélèze hybride de la lignée Q10 à 8 semaines de maturation (8S) et suite à un transfert au froid pendant 3 semaines (3S 4°C). Echelle : 1 cm = 0,7 cm.

La teneur en eau des ES-3S 4°C est de 1.3 et 1.6 g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> MS pour respectivement les lignées Q10 et N23 (Tableau III.5). Ces valeurs sont équivalentes à la teneur en eau mesurée chez les ES témoins de 8 semaines (1.3 g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> MS, Savane et al., 2023). Le traitement à +4°C n'entraîne donc pas de déshydratation des ES et donc les effets observés sont la conséquence d'un effet du froid seul.



Tableau III.5. Teneurs moyennes en eau des embryons somatiques de mélèze hybride suite à un transfert au froid pendant 3 semaines (3S 4°C). n=7

Lignée	Teneur en eau des ES-3S 4°C (g H <sub>2</sub> O g <sup>-1</sup> MS)
Q10	1.3
N23	1.6

Concernant les sucres totaux, le traitement au froid induit une augmentation significative de leur teneur mais uniquement pour les ES de la lignée Q10 (Figure III.7-A et Tableau III.6). Concernant les différents types de sucres, les ES, en particulier ceux de la Q10 montrent une augmentation significative de leur teneur en raffinose : cette teneur est multipliée par 4, 13 et 15 après respectivement 1, 2 et 3 semaines au froid. Pour la N23, la plus forte augmentation est observée chez les ES-2S 4°C soit 7 fois plus que les témoins ES 8s (Tableau III.6).

La teneur en amidon est équivalente entre les ES traités au froid et les témoins ES 8S de la lignée Q10 (Figure III.7-B). Par contre pour la N23 cette teneur diminue significativement chez les ES-1S 4°C et 2S 4°C.

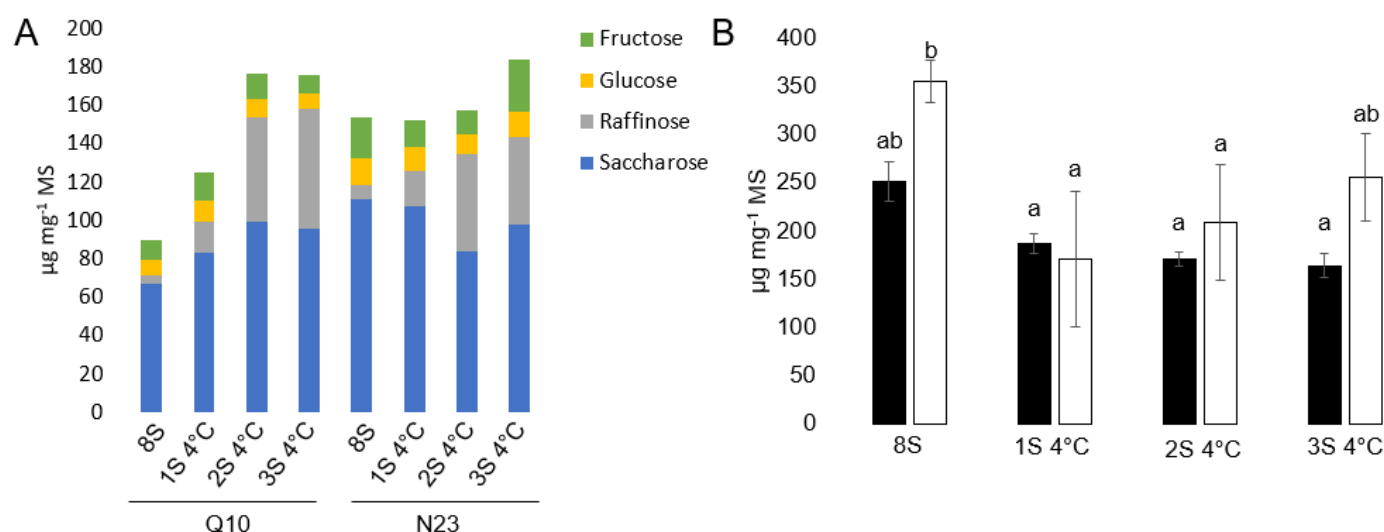


Figure III.7. Analyse des glucides d'ES de mélèze hybride des lignées Q10 (■) et N23 (□) suite à un transfert au froid pendant 1, 2 et 3 semaines. A : Profils moyens de sucres solubles, B : Teneurs moyennes en amidon. Les différences significatives pour  $p < 0.05$  sont indiquées par des lettres (ANOVA, Tuckey). n=3



Tableau III.6. Teneurs moyennes en sucres solubles des ES de mélèze hybride des lignées Q10 et N23 suite à un transfert au froid de 1, 2 et 3 semaines. Les différences significatives pour  $p < 0.05$  sont indiquées par des lettres (ANOVA, Tuckey).  $n=3$

Lignée	Traitement à 4°C (semaines)	Fructose	Galactose	Glucose	Inositols	Raffinose	Saccharose	Sucres solubles totaux
Q10	Aucun	10.6 ± 1.44 <sup>b</sup>	0.3 ± 0.26 <sup>ab</sup>	7.83 ± 1.79 <sup>a</sup>	2.96 ± 1.03 <sup>b</sup>	4.35 ± 1 <sup>e</sup>	67.22 ± 4.7 <sup>a</sup>	93.25 ± 6.1 <sup>c</sup>
	1	14.61 ± 0.93 <sup>ab</sup>	0.7 ± 0.3 <sup>ab</sup>	11.47 ± 0.87 <sup>a</sup>	1.78 ± 0.3 <sup>ab</sup>	15.93 ± 1.5 <sup>a</sup>	83.21 ± 3.7 <sup>a</sup>	127.7 ± 4.4 <sup>ac</sup>
	2	13.16 ± 1.48 <sup>ab</sup>	0.27 ± 0.05 <sup>b</sup>	9.52 ± 1.14 <sup>a</sup>	1.24 ± 0.03 <sup>ab</sup>	54.07 ± 2.7 <sup>b</sup>	99.75 ± 1.0 <sup>a</sup>	178.01 ± 3.2 <sup>b</sup>
	3	9.49 ± 1.27 <sup>b</sup>	0.39 ± 0.28 <sup>ab</sup>	8.42 ± 0.61 <sup>a</sup>	1.41 ± 0.14 <sup>ab</sup>	62.42 ± 1.1 <sup>d</sup>	95.44 ± 0.8 <sup>a</sup>	177.57 ± 1.5 <sup>b</sup>
N23	Aucun	21.73 ± 1.71 <sup>ac</sup>	0 ± 0 <sup>b</sup>	14 ± 1.81 <sup>a</sup>	1.03 ± 0.09 <sup>ab</sup>	7.03 ± 0.5 <sup>e</sup>	111.31 ± 39.4 <sup>a</sup>	155.1 ± 38.9 <sup>ab</sup>
	1	14 ± 4.97 <sup>ab</sup>	1.51 ± 0.36 <sup>a</sup>	1.93 ± 3.88 <sup>a</sup>	2.41 ± 1.1 <sup>ab</sup>	18.8 ± 3.4 <sup>a</sup>	107.33 ± 17.6 <sup>a</sup>	155.98 ± 22.3 <sup>ab</sup>
	2	12.67 ± 3.57 <sup>ab</sup>	3.11 ± 0.89 <sup>c</sup>	10 ± 1.99 <sup>a</sup>	1.57 ± 1.23 <sup>ab</sup>	50.63 ± 2.2 <sup>bc</sup>	84.05 ± 10.7 <sup>a</sup>	162.04 ± 15.2 <sup>ab</sup>
	3	26.72 ± 7.59 <sup>c</sup>	2.99 ± 0.61 <sup>c</sup>	13.32 ± 10.68 <sup>a</sup>	0.67 ± 0.39 <sup>a</sup>	46.12 ± 1.88 <sup>c</sup>	97.64 ± 5.8 <sup>a</sup>	187.64 ± 10.1 <sup>b</sup>

Tableau III.7. Pourcentage des effets traitement, lignée et interaction traitement:lignée selon l'analyse ANOVA effectuée pour les différentes variables (amidon et glucides solubles) mesurées chez les ES de mélèze hybride des lignées Q10 et N23 suite à un transfert au froid pendant 1, 2 et 3 semaines.

Variabes	Traitement	Lignée	Traitement:Lignée
Amidon	51.3	15.7	12.0
Fructose	9.8	29.9	37.9
Galactose	26.5	37.0	28.0
Glucose	3.0	13.9	10.2
Inositols	22.8	5.5	30.6
Raffinose	95.6	0.7	3.2
Saccharose	2.3	13.3	36.0
Sucres totaux	50.7	10.6	19.3

De ces résultats, il ressort que la teneur en raffinose est maximale après 2 semaines à +4°C atteignant 54 et 50  $\mu\text{g mg}^{-1}$  MS pour Q10 et N23 respectivement (Tableau III.6). Nous avons voulu savoir si cette modification apportée par le traitement au froid, pouvait se maintenir dans le temps. Des ES 8S ont été placés 2 semaines au froid (2S 4) puis transférés 2 semaines à +23°C (2S 4 + 2S 23) (Figure III.1, partie 3).

Dans cette partie, ont été considérés la germination et la conversion en plante des ES, les protéines, les glucides solubles et l'amidon après 1, 2 et 3 semaines au froid.

#### Caractéristiques biologiques

Pour la lignée Q10, 2 semaines au froid diminue le taux de germination mais pas la conversion en plants des ES. Le passage des ES à +23°C après traitement à +4°C permet de restaurer le pourcentage de germination à la valeur mesurée chez le témoin de 8 semaines (Tableau III.8). Pour la lignée N23 le pourcentage de germination ainsi que le taux de conversion en plantes ne montrent aucune différence significative entre les différentes conditions.

Tableau III.8. Pourcentages moyens de germination et de conversion en plantes des ES de 8 semaines de mélèze hybride des lignées Q10 et N23 suite à un transfert à +4°C pendant 2 semaines (2S 4) suivi d'un transfert à +23°C pendant 2 semaines (2S 4 + 2S 23). Les différences significatives pour  $p < 0.05$  sont indiquées par des lettres (ANOVA, Tuckey).  $n=6$

Lignée	Traitement	Nb total ES mis en culture	Nb ES germés		Nb plants	
			Total	%	Total	% rapportés au nb ES germés
Q10	Aucun	60	54	90 ± 11 <sup>ab</sup>	34	63 ± 14 <sup>b</sup>
	2S 4	60	45	75 ± 15 <sup>b</sup>	32	72 ± 11 <sup>b</sup>
	2S 4 + 2S 23	60	57	95 ± 8 <sup>a</sup>	49	86 ± 8 <sup>b</sup>
N23	Aucun	60	60	100 ± 0 <sup>a</sup>	23	38 ± 10 <sup>a</sup>
	2S 4	60	60	100 ± 0 <sup>a</sup>	22	37 ± 15 <sup>a</sup>
	2S 4 + 2S 23	60	57	95 ± 5 <sup>a</sup>	21	38 ± 20 <sup>a</sup>

#### Caractéristiques biochimiques

Chez la lignée Q10, la teneur en protéines totales des ES de 8 semaines est de 136  $\mu\text{g mg}^{-1}$  MS (Figure III.8-A). Le transfert des boîtes 2 semaines au froid, suivi ou non d'une remise à 23°C, entraîne une diminution significative de la teneur en protéines totales qui atteint 111  $\mu\text{g mg}^{-1}$  MS. Pour la lignée N23, 2 semaines au froid induit une diminution significative de la teneur en protéines totales (124  $\mu\text{g mg}^{-1}$  MS vs 165  $\mu\text{g mg}^{-1}$  MS chez le témoin ES 8S). La remise des boîtes à +23°C entraîne l'augmentation de la teneur en protéines totales qui atteint la teneur initialement mesurée chez les ES 8S.

Pour les deux lignées et comme précédemment observé, le transfert des ES à +4°C pendant 2 semaines induit la synthèse de raffinose et entraîne en conséquence l'augmentation de la teneur en sucres totaux (Figure III.8-B et Tableau III.9). La remise des ES à 23°C après 2 semaines à 4°C a entraîné une réduction de la teneur en raffinose par rapport aux ES-2S 4. Les teneurs en glucides solubles mesurées chez les ES-2s 4 +2S 23 sont proches des teneurs initialement mesurées chez les ES de 8 semaines.

Concernant l'amidon, aussi bien pour Q10 que N23 aucune variation n'est observée quel que soit les conditions de culture étudiées (Figure III.8-C).

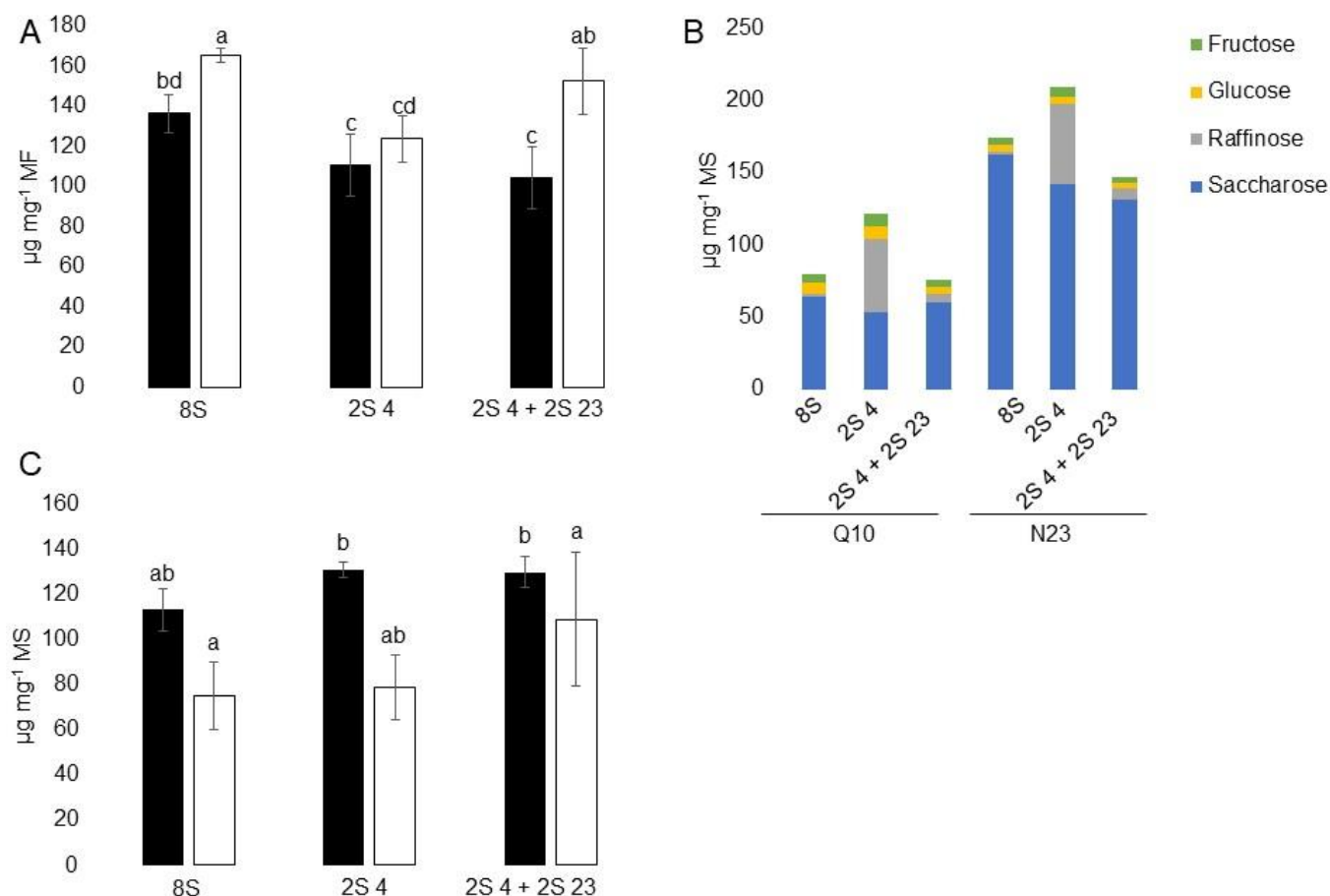


Figure III.8. Analyse de caractéristiques biochimiques des ES de 8 semaines (8S) de mélèze hybride des lignées Q10 (■) et N23 (□) suite à un transfert à +4°C pendant 2 semaines (2S 4) suivi ou non d'un transfert à +23°C pendant 2 semaines (2S 4 + 2S 23). A : Teneurs moyennes en protéines totales. B : Profils moyens de sucres solubles. C : Teneurs moyennes en amidon. Les différences significatives pour  $p < 0.05$  sont indiquées par des lettres (ANOVA, Tuckey).  $n=3-5$

Tableau III.9. Teneurs moyennes en sucres solubles des ES de mélèze hybride des lignées Q10 et suite à un transfert à +4°C pendant 2 semaines (2S 4) et suite à un transfert au froid pendant 2 semaines suivi d'un transfert à +23°C pendant 2 semaines (2S 4 + 2S 23). Les différences significatives pour  $p < 0.05$  sont indiquées par des lettres (ANOVA, Tuckey).  $n=3$

Lignée	Traitement	Fructose	Galactose	Glucose	Inositols	Raffinose	Saccharose	Sucres solubles totaux
Q10	Aucun	6.32 ± 0.86 <sup>bc</sup>	0 ± 0 <sup>b</sup>	7.64 ± 0.92 <sup>bc</sup>	3.25 ± 0.24 <sup>c</sup>	1.89 ± 0.31 <sup>b</sup>	64.24 ± 4.53 <sup>b</sup>	83.35 ± 4.52 <sup>c</sup>
	2S 4	9.47 ± 0.96 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>b</sup>	8.73 ± 1.58 <sup>a</sup>	1.43 ± 0.1 <sup>a</sup>	50.78 ± 3.22 <sup>a</sup>	53.01 ± 4.56 <sup>b</sup>	123.42 ± 10.04 <sup>b</sup>
	2S 4 + 2S 23	4.57 ± 1.82 <sup>bc</sup>	0 ± 0 <sup>b</sup>	5.06 ± 2.43 <sup>ab</sup>	2.29 ± 0.06 <sup>b</sup>	5.9 ± 0.69 <sup>bc</sup>	59.96 ± 4.24 <sup>b</sup>	77.77 ± 3.97 <sup>c</sup>
N23	8s	4.54 ± 0.4 <sup>bc</sup>	0.2 ± 0.18 <sup>b</sup>	4.6 ± 0.56 <sup>bc</sup>	3.43 ± 0.27 <sup>c</sup>	2.43 ± 0.24 <sup>c</sup>	162.27 ± 5.76 <sup>c</sup>	182.47 ± 7.13 <sup>c</sup>
	2S 4	7.14 ± 1.28 <sup>ab</sup>	1.58 ± 0.07 <sup>a</sup>	5.32 ± 1.12 <sup>ab</sup>	2.01 ± 0.24 <sup>ab</sup>	55.49 ± 2.93 <sup>a</sup>	141.65 ± 13.09 <sup>a</sup>	213.2 ± 18.08 <sup>a</sup>
	2S 4 + 2S 23	4.18 ± 0.24 <sup>c</sup>	0.6 ± 0.07 <sup>c</sup>	3.83 ± 0.26 <sup>b</sup>	2.54 ± 0.34 <sup>b</sup>	7.65 ± 0.32 <sup>c</sup>	131.22 ± 12.53 <sup>a</sup>	150.02 ± 12.48 <sup>b</sup>

De ces résultats, il ressort que le traitement à +4°C pendant 2 semaines entraîne la réduction de la teneur en protéines et la synthèse de raffinose tandis qu'il n'a pas eu d'effet sur la teneur en amidon. Par ailleurs, la synthèse de raffinose ne se maintient pas lors d'un changement de l'environnement de culture.

### III.3.2. Discussion

#### **Effet du traitement à +4°C sur la morphologie et biologie des ES de mélèze hybride**

Dans notre étude, l'application d'un traitement à +4°C entraîne le rougissement de la coiffe racinaire embryonnaire des ES de mélèze hybride. Un rougissement de cette coiffe a déjà été reporté chez des ES de mélèze hybride *Larix x marschlinii* lorsque la maturation est réalisée à lumière tandis qu'une maturation à l'obscurité n'induit aucune coloration (von Aderkas et al., 2015). De même, chez *Picea abies*, le rougissement de la coiffe racinaire embryonnaire a été observé suite à un traitement de déshydratation des ES sous régime lumineux (Eliášová et al., 2017). Dans ces deux études, la présence de proanthocyanidines et de catéchines a été mise en évidence au niveau des couches cellulaires à la surface des coiffes racinaires embryonnaires. Les proanthocyanidines et les catéchines sont des groupes de métabolites secondaires polyphénoliques synthétisés chez les plantes (He et al., 2008 ; Bernatoniene et al., 2018). Les composés phénoliques sont impliqués dans la biosynthèse de pigments (Kurauchi et al., 2011) ce qui pourrait expliquer la coloration rougeâtre observée. De manière générale, un rougissement de la coiffe est associé à un signe de stress. Les proanthocyanidines et les catéchines sont notamment connus pour faire face à certains stress abiotiques grâce à leurs propriétés antioxydantes. Ils sont en effet de bons capteurs d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Yu et al., 2023 ; Bernatoniene et al., 2018). La formation de ROS chez les végétaux peut par ailleurs être due à un stress causé par le froid (Dreyer et Dietz, 2018 ; Keller et al., 2021). Une étude menée par Li et al. (2022) chez le riz ainsi qu'une étude menée chez le concombre par Zhu et al. (2017) soulignent notamment l'importance de l'augmentation de la quantité de proanthocyanidines, qui est corrélée à l'amélioration de la capacité antioxydante, pour contrer les dommages induits par le froid.

Chez le mélèze hybride, le traitement au froid n'a pas d'incidence sur la germination comme chez *Picea abies* (Varis et al., 2017) et *Pinus radiata* (Castander-Olarieta et al., 2023). Concernant la conversion en plante, le traitement au froid n'a pas eu d'effet positif pour les ES de mélèze hybride. Chez les ES de camélia, un traitement au froid pendant plusieurs mois a permis d'en augmenter le taux (Janeiro et al., 1995). Cela suggère qu'il est peut-être nécessaire de traiter les ES de mélèze hybride au froid sur des durées plus longues pour espérer augmenter leur taux de conversion en plant.

#### **Effet du traitement +4°C sur les glucides des ES de mélèze hybride**

L'acquisition de la tolérance à la déshydratation a été couplée à l'accumulation des réserves dans les graines de nombreuses espèces (Oliver et al., 2020). Chez *Brassica campestris*, elle a été associée à une augmentation de la teneur en lipides, protéines, saccharose et stachyose et à la diminution de la teneur en amidon (Leprince et al., 1990). Le transfert des ES 1 ou 2 semaines à +4°C entraîne une réduction significative ( $p < 0.05$ ) de leur teneur en amidon pour la lignée N23. Cette diminution a été récemment observée pour des ES de *Picea abies* placés 4 semaines au froid (Välimäki et al., 2022). Chez *Pinus sylvestris*, le stockage des cônes à +5°C induit une réduction de la taille et du nombre de grains d'amidon dans le mégagamétophyte (Häggman et al., 1999). Nos résultats de l'effet du froid sur la teneur en amidon des ES sont donc en accord avec les données de la littérature.

Concernant les sucres solubles, le traitement à +4°C induit la synthèse de raffinose chez les ES des deux lignées de mélèze hybride. La teneur maximale en raffinose a été obtenue après 2 et 3 semaines au froid pour la lignée N23 et Q10 respectivement (soit 30% et 35% des sucres solubles totaux). Les teneurs en raffinose et en saccharose des ES de mélèze hybride traités au froid sont supérieures à celles des EZ frais et secs. La synthèse de RFO notamment de stachyose a été observée chez les ES de *Picea abies* traités 20 jours au froid (Konrádová et al. 2003). Or chez les ES de mélèze hybride, le stachyose n'a jamais été détecté et son absence pourrait représenter un problème. En effet, le stachyose est impliqué dans la tolérance à la déshydratation et son absence chez les ES pourraient entraîner une tolérance insuffisante à un traitement de déshydratation (Horbowicz et Obendorf, 1994 ; Lipavská et Konrádová, 2004). Chez le colza (Anandarajah et al., 1991) et des épicéas (Beardmore et Charest, 1995 ; Pond et al., 2002), le traitement des ES au froid (+2°C ou +4°C) a amélioré cette tolérance à la déshydratation.

Le traitement au froid des ES de mélèze hybride a entraîné la synthèse de raffinose mais aussi la diminution de la teneur en amidon. Bien que toutes les modifications biochimiques liées à l'acquisition de la tolérance à la déshydratation n'ont pas été observées, nos résultats suggèrent qu'un traitement au froid pourrait potentiellement induire une acquisition partielle de la tolérance à la déshydratation des ES de mélèze hybride.

### **Les modifications induites par le froid sont une réponse temporaire au changement d'environnement**

Si le traitement des ES de mélèze hybride 2 semaines au froid induit des modifications au niveau des glucides (amidon, raffinose), il n'a pas d'effet sur la teneur en protéines totales. Chez les ES de *Picea abies* un traitement au froid de 4 semaines entraîne une synthèse de protéines avec une modification qualitative de celles-ci au bout de 8 semaines de traitement (Välimäki et al., 2022). Dans cette étude, le changement du profil de protéines concernait principalement les protéines de réserve de type globulines qui disparaissaient complètement à partir de 6 mois de traitement au froid. Dans le cas des ES de mélèze hybride, l'absence de changement de la teneur en protéines peut être due à une durée de traitement insuffisante.

Afin de savoir si les modifications induites par le froid se maintiennent ou pas, nous avons choisi de transférer les ES traités 2 semaines au froid à +23°C - température habituelle de la maturation. Comparés aux ES traités à +4°C, le transfert à +23°C entraîne la réduction de la teneur en raffinose et a permis de restaurer la teneur en amidon pour les ES N23 jusqu'au niveau initialement mesuré chez les ES témoins de 8 semaines. Ainsi, les modifications dues au froid ne se maintiennent pas et ne sont qu'une réponse au changement d'environnement de culture. Dans notre cas, le traitement au froid n'induit pas une réorientation permanente du métabolisme des ES. Par conséquent, nous n'avons pas réussi à induire durablement la synthèse de raffinose chez les ES de mélèze hybride. Notre étude conduite sur le maintien des modifications dues au froid sur des ES n'a jamais été réalisée. Les résultats obtenus sont inédits et constituent des données importantes pour une meilleure connaissance de la réponse des ES de conifères au froid.

### Conclusion du chapitre III

Pour résumer, nous avons observé que les ES de 8 semaines de mélèze hybrides sont plus proches des EZ frais en regard de leur poids sec et sont encore éloignés des EZ secs qui constituent notre référence. Les ES présentent des teneurs en protéines et lipides équivalentes aux EZ secs mais ils diffèrent par une moindre quantité de RFO. Afin de permettre aux ES de se rapprocher des caractéristiques biochimiques des EZ secs, nous avons essayé d'améliorer la synthèse des RFO par application de traitements post-maturation. Un des traitements appliqués correspondait à un renouvellement du milieu de maturation pour une durée de 2 ou 4 semaines. Ce traitement n'a pas permis de remplir l'objectif d'amélioration de la synthèse de RFO et a eu des effets non désirés sur les ES i.e. l'apparition d'hyperhydrie et la diminution de la teneur en raffinose. Par ailleurs, nous avons testé le traitement des ES au froid. Ce traitement a permis d'augmenter significativement la quantité de raffinose chez les ES. Cependant, cette modification qui était attendue n'était qu'une réponse temporaire au froid et ne s'est pas maintenue lors d'un changement d'environnement de culture. Bien que le traitement au froid a permis aux ES d'accumuler des composés favorables à la tolérance à la déshydratation, il n'a pas permis l'activation d'un signal permettant un basculement du métabolisme des ES vers l'acquisition complète de la tolérance à la déshydratation. Les résultats de cette étude suggèrent donc que ces traitements ne sont pas adéquats pour (1) permettre aux ES de synthétiser des RFO qui se maintiennent lors d'un changement d'environnement (2) permettre aux ES d'approcher les caractéristiques biochimiques des EZ secs. Néanmoins, ces résultats fournissent des informations cruciales permettant potentiellement d'améliorer et de mieux comprendre les protocoles de déshydratation d'ES de conifères. En effet, grâce à l'étude sur le froid, il paraît plus judicieux de réaliser la déshydratation des ES à basse température afin de conserver les bénéfices d'un effet du froid associés aux effets de la déshydratation.

Notre étude sur les effets d'un renouvellement du milieu de culture ainsi que sur l'effet du froid, sur à la fois les caractéristiques biologiques et biochimiques des ES de mélèze hybride, fournit des informations nouvelles. Bien que révélant des résultats qualifiés de négatifs vis-à-vis de l'amélioration de la qualité des ES, cette étude livre des informations très utiles pour comprendre et améliorer les protocoles de traitements post-maturation des ES de conifères.

Pour la suite, afin de compléter l'étude et permettre aux ES de se rapprocher des caractéristiques biologiques et biochimiques des EZ secs, il s'agira de leur appliquer un traitement de déshydratation permettant d'abaisser la teneur en eau des ES. Nous nous intéresserons à l'effet de la température de déshydratation des ES pour mettre en évidence la meilleure condition de déshydratation entre une déshydratation à faible température (+4°C) et une déshydratation à température habituelle de culture (+23°C). Par ailleurs, il s'agira également de caractériser l'effet d'un traitement de déshydratation selon différents degrés d'humidité relative sur les caractéristiques biologiques, biochimiques et moléculaires des ES de mélèze hybride.

## Références

- Anandarajah K, Kott L, Beversdorf W D, McKersie B D** (1991) Induction of desiccation tolerance in microspore-derived embryos of *Brassica napus* by thermal stress. *Plant Sci.* 77, 119-123.
- Ascough G D, Fennell C W** (2004) The regulation of plant growth and development in liquid culture. *S. Afr. J. Bot.* 70, 181-190.
- Balen B, Tkalec M, Pavoković D, Pevalek-Kozlina B, Krsnik-Rasol M** (2009) Growth conditions in *in vitro* culture can induce oxidative stress in *Mammillaria gracilis* tissues. *J. Plant Growth Regul.* 28, 36-45.
- Beardmore T, Charest P J** (1995) Black spruce somatic embryo germination and desiccation tolerance. I. Effects of abscisic acid, cold, and heat treatments on the germinability of mature black spruce somatic embryos. *Can. J. For. Res.* 25, 1763–1772.
- Bernatoniene J, Kopustinskiene D M** (2018) The role of catechins in cellular responses to oxidative stress. *Mol.* 23(4), 965.
- Bewley J D, Black M** (1994) Seeds dans: Bewley J D, Black M (Eds.) *Seeds: physiology of development and germination*. Springer US, Boston, MA, 1–33.
- Bhullar S S** (1995) Bioregulation of starch accumulation in developing seeds. *Curr. Sci.* 68(5), 507-516.
- Brownfield D L, Todd C D, Stone S L, Deyholos M K, Gifford D J** (2007) Patterns of storage protein and triacylglycerol accumulation during loblolly pine somatic embryo maturation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 88(2), 217-223.
- Castander-Olarieta A, Montalbán I A, Moncaleán P** (2023) Multi-strategy approach towards optimization of maturation and germination in radiata pine somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 153, 173–190.
- Coelho C M M, Benedito VA** (2008) Seed development and reserve compound accumulation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Seed Sci. Biotechnol.* 2, 42–52.
- Corbineau F, Picard M A, Fougereaux J A, Ladonne F, Côme D** (2000) Effect of dehydration conditions on desiccation tolerance of developing pea seeds as related to oligosaccharide content and cell membrane properties. *Seed Sci. Res.* 10, 329–339.
- Crouch M L** (1982) Non-zygotic embryos of *Brassica napus* L. contain embryo-specific storage proteins. *Planta* 156, 520-524.
- Dreyer A, Dietz K J** (2018) Reactive oxygen species and the redox-regulatory network in cold stress acclimation. *Antioxidants* 7(11), 169.
- Egertsdotter U, Ahmad I, Clapham D** (2019) Automation and scale up of somatic embryogenesis for commercial plant production, with emphasis on conifers. *Front. Plant Sci.* 10, 109.
- Eliášová K, Konrádová H, Dobrev P I, Motyka V, Lomenech A M, Fischerová L, Lelu-Walter M A, Vondráková Z, Teyssier C** (2022) Desiccation as a post-maturation treatment helps complete maturation of norway spruce somatic embryos: carbohydrates, phytohormones and proteomic status. *Front. Plant Sci.* 13, 823617.
- Eliášová K, Vondráková Z, Malbeck J, Trávníčková A, Pešek B, Vágner M, Cvikrová M** (2017) Histological and biochemical response of Norway spruce somatic embryos to UV-B irradiation. *Trees* 31, 1279-1293.
- EISayed A I, Rafudeen M S, Gollmack D** (2014) Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: protection against abiotic stress. *Plant Biol. (Stuttg)* 16(1), 1-8.

- Fereir R P, Conkey J H, Verhagen S A** (1989) Triglycérides in embryogenic conifer calli: a comparison with zygotic embryos. *Plant Cell Rep.* 8, 207-209.
- Find J, Grace L, Krogstrup P** (2002) Effect of anti-auxins on maturation of embryogenesis tissue cultures of Nordmanns fir (*Abies nordmanniana*). *Physiol. Plant.* 116, 231-237.
- Gaspar T, Kevers C, Franck T, Bisbis B, Billard J P, Huault C, Le Dily F, Petit-Paly G, Rideau M, Penel C, Crèvecoeur M, Greppin H** (1995) Paradoxical results in the analysis of hyperhydric tissues considered as being under stress: questions for a debate. *Bulg. J. Plant Physiol.* 21, 80-97.
- Gösslová M, Svobodová H, Lipavská H, Albrechtová J, Vreugdenhil D** (2001) Comparing carbohydrate status during norway spruce seed development and somatic embryo formation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 37(1), 24-28.
- Häggman H, Jokela A, Krajnakova J, Kauppi A, Niemi K, Aronen T** (1999) Somatic embryogenesis of Scots pine: cold treatment and characteristics of explants affecting induction. *J. Exp. Bot.* 50(341), 1769-1778.
- Hazarika B N** (2006) Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Sci. Hortic.* 108, 105-120.
- He F, Pan Q H, Shi Y, Duan C Q** (2008) Biosynthesis and genetic regulation of proanthocyanidins in plants. *Mol.* 13(10), 2674-703.
- Hell A F, Kretzschmar F S, Simões K, Heyer A G, Barbedo C J, Braga M Rn Centeno D C** (2019) Metabolic changes on the acquisition of desiccation tolerance in seeds of the Brazilian native tree *Erythrina speciosa*. *Front. Plant Sci.* 10, 1356.
- Hoekstra F A, Golovina E A, Tetteroo F A, Wolkers W F** (2001) Induction of desiccation tolerance in plant somatic embryos: how exclusive is the protective role of sugars? *Cryobiol.* 43(2), 140-150.
- Horbowicz M, Obendorf R** (1994) Seed desiccation tolerance and storability: Dependence on flatulence-producing oligosaccharides and cyclitols—review and survey. *Seed Sci. Res.* 4(4), 385-405.
- Hudec L, Konrádová H, Hašková A, Lipavská H** (2016) Norway spruce embryogenesis: changes in carbohydrate profile, structural development and response to polyethylene glycol. *Tree Physiol.* 36(5), 548-561.
- Janeiro L V, Ballester A, Viéitez M, Ana M** (1995) Effect of cold storage on somatic embryogenesis systems of *Camellia*. *J. Hortic. Sci.* 70(4), 665-672.
- Joy IV R W, Yeung E C, Kong L, Thorpe T A** (1991) Development of white spruce somatic embryos: I. Storage product deposition. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 27P, 32-41.
- Keller F, Ludlow M M** (1993) Carbohydrate metabolism in drought-stressed leaves of pigeon pea (*Cajanus cajan*). *J. Exp. Bot.* 44, 1351-1359.
- Keller I, Müdsam C, Martins Rodrigues C, Kischka D, Zierer W, Sonnewald U, Harms K, Czarnecki O, Fiedler-Wiechers K, Koch W, Neuhaus H E, Ludewig F, Pommerrenig B** (2021) Cold-triggered induction of ROS- and raffinose metabolism in freezing-sensitive taproot tissue of sugar beet. *Front. Plant Sci.* 12, 715767.
- Kevers C, Franck T, Strasser R J, Dommes S, Gaspar T** (2004) Hyperhydricity of micropropagated shoots: A typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 77, 181-191.
- Konrádová H, Gricová M, Lipavská H** (2003) Cold-induced accumulation of raffinose oligosaccharides in somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*). *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 39, 425-427.



- Krajňáková J, Häggman H** (2009) Effect of sucrose concentration, polyethylene glycoland activated charcoal on maturation and regeneration of *Abies cephalonica* somatic embryos. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 96, 251-262.
- Kuo T M, Lowell C A, Nelsen T C** (1997) Occurrence of pinitol in developing soybean seed tissues. *Phytochem.* 45(1), 29-35.
- Kurauchi T, Kasai A, Tougou M, Senda M** (2011) Endogenous RNA interference of chalcone synthase genes in soybean: formation of double-stranded RNA of GmlRCHS transcripts and structure of the 5' and 3' ends of short interfering RNAs. *J. Plant Physiol.* 168, 1264-1270.
- Lelu-Walter M A, Pâques L E** (2009) Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix x eurolepis* and *Larix x marschlinii*). Perspective for breeding. *Ann. For. Sci.* 66, 104p1-104p10.
- Lelu M A, Klimaszewska K, Pflaum G, Bastien C** (1995) Effect of maturation duration on desiccation tolerance in hybrid larch (*Larix x Leptoeuropaea dengler*) somatic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol., Plant* 31, 15-20.
- Leprince O, Bronchart R, Deltour R** (1990) Changes in starch and soluble sugars in relation to the acquisition of desiccation tolerance during maturation of *Brassica campestris* seed. *Plant Cell Environ.* 13, 539-546.
- Li J, Feng B, Yu P, Fu W, Wang W, Lin J, Qin Y, Li H, Chen T, Xu C, Tao L, Wu Z, Fu G** (2022) Oligomeric proanthocyanidins confer cold tolerance in rice through maintaining energy homeostasis. *Antioxidants* 12(1), 79.
- Lipavská H, Konrádová H** (2004) Somatic embryogenesis in conifers: The role of carbohydrate metabolism. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 40(1), 23-30.
- MacNeill G J, Mehrpouyan S, Minow M A A, Patterson J A, Tetlow I J, Emes M J** (2017) Starch as a source, starch as a sink: the bifunctional role of starch in carbon allocation. *J. Exp. Bot.* 68(16), 4433-4453.
- Morel A, Teyssier C, Trontin J F, Eliášová K, Pešek B, Beaufourd M, Morabito D, Boizot N, Le Metté C, Belal-Bessai L, Reymond I, Harvengt L, Cadene M, Corbineau F, Vágner M, Label P, Lelu-Walter M A** (2014a) Early molecular events involved in *Pinus pinaster* Ait. Somatic embryo development under reduced water availability: transcriptomic and proteomic analyses. *Physiol. Plant.* 152(1), 184-201.
- Morel A, Trontin J F, Corbineau F, Lomenech A M, Beaufour M, Reymond I, Le Metté C, Ader K, Harvengt L, Cadene M, Label P, Teyssier C, Lelu-Walter M A** (2014b) Cotyledonary somatic embryos of *Pinus pinaster* Ait. most closely resemble fresh, maturing cotyledonary zygotic embryos: biological, carbohydrate and proteomic analyses. *Planta* 240, 1075-1095.
- Nongdam P, Beleski D G, Tikendra L, Dey A, Varte V, EL Merzougui S, Pereira V M, Barros P R, Vendrame W A** (2023) Orchid micropropagation using conventional semi-solid and temporary immersion systems: A Review. *Plants* 12, 1136.
- Obendorf R L, Zimmerman A D, Zhang Q, Castillo A, Kosina S M, Bryant E G, Sensenig E M, Wu J, Schnebly S R** (2009) Accumulation of soluble carbohydrates during seed development and maturation of low-raffinose, low-stachyose soybean. *Crop Sci.* 49, 329–341.
- Oliver M J, Farrant J M, Hilhorst H W M, Mundree S, Williams B, Bewley J D** (2020) Desiccation tolerance: avoiding cellular damage during drying and rehydration. *Annu. Rev. Plant Biol.* 71(1), 435-460.
- Pancaningtyas S** (2013) Evaluation of quantity and hyperhydricity of cocoa somatic embryo obtained from solid culture, liquid culture, and sequence

- subculture. *Pelita Perkebunan* (a Coffee and Cocoa Research Journal), 29(1).
- Pescador R, Kerbauy G B, dos Santos D Y A C, Dal Vesco L L, de Freitas Fraga H P, Guerra M P** (2012) Comparative study of reserve lipid accumulation during somatic and zygotic *Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret embryogenesis. *Acta Physiol. Plant.* 34(2), 771-778.
- Polivanova O B, Bedarev V A** (2022) Hyperhydricity in plant tissue culture. *Plants* 11, 3313.
- Pond S E, von Aderkas P, Bonga J M** (2002) Improving tolerance of somatic embryos of *Picea glauca* to flash desiccation with a cold treatment (desiccation after cold acclimation). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 38, 334-341.
- Price J, Li T C, Kang S G, Na J K, Jang J C** (2003) Mechanisms of glucose signaling during germination of *Arabidopsis*. *Plant. Physiol.* 132(3), 1424-1438.
- Pucciariello C, Perata P** (2021) The oxidative paradox in low oxygen stress in plants. *Antioxidants* 10(2), 332.
- Ramarosandratana A, Harvengt L, Bouvet A, Calvayrac R, Pâques M** (2001) Effects of carbohydrate source, polyethylene glycol and gellan gum concentration on embryonal-suspensor mass (ESM) proliferation and maturation of maritime pine somatic embryos. *In vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 37, 29-34.
- Salvi P, Varshney V, Majee M** (2022) Raffinose family oligosaccharides (RFOs): role in seed vigor and longevity. *Biosci. Rep.* 42(10), BSR20220198.
- Sanyal R, Kumar S, Pattanayak A, Kar A, Bishi S K** (2023) Optimizing raffinose family oligosaccharides content in plants: A tightrope walk. *Front Plant Sci.* 14, 1134754.
- Savane P, Belmokhtar N, Delile A, Boizot N, Ridet C, Lelu-Walter M A, Teyssier C** (2023) Characterisation of hybrid larch somatic embryo maturation by biochemical analyses and by a novel, fast mid-infrared method. *Physiol. Plant.* 175(4), e13966.
- Sengupta S, Mukherjee S, Basak P, Majumder A L** (2015) Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants. *Front Plant Sci.* 6, 656.
- Shoemaker R C, Christofferson S E, Galbraith D W** (1987) Storage protein accumulation patterns in somatic embryos of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Rep.* 6, 12-15.
- Snyman S J, Nkwanyana P D, Watt M P** (2011) Alleviation of hyperhydricity of sugarcane plantlets produced in RITA® vessels and genotypic and phenotypic characterization of acclimated plants. *S. Afr. J. Bot.* 77(3), 685-692.
- Tahir M, Vandenberg A, Chibbar R N** (2011) Influence of environment on seed soluble carbohydrates in selected lentil cultivars. *J. Food Compos. Anal.* 24, 596–602.
- Tereso S, Zoglauer K, Milhinhos A, Miguel C, Oliveira M M** (2007) Zygotic and somatic embryo morphogenesis in *Pinus pinaster*: comparative histological and histochemical study. *Tree Physiol.* 27(5), 661-669.
- Tetlow I J** (2011) Starch biosynthesis in developing seeds. *Seed Sci. Res.* 21, 5-32.
- Teyssier C, Grondin C, Bonhomme L, Lomenech A M, Vallance M, Morabito D, Label P, Lelu-Walter M A** (2011) Increased gelling agent concentration promotes somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix x eurolepis*): a 2-DE proteomic analysis. *Physiol. Plant.* 141(2), 152-165.
- Teyssier C, Maury S, Beaufour M, Grondin C, Delaunay A, Le Metté C, Ader K, Cadene M, Label P, Lelu-Walter M A** (2014) In search of markers for somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix x eurolepis*): global DNA methylation

- and proteomic analyses. *Physiol. Plant.* 150(2), 271–291.
- Trontin J F, Canlet F, Reymond I, Debille S, Durandeu K, Harvengt L, Rousseau J, de Boisseson J, Fraysse J, Alazard P, Bailly A, Teyssier C, Le Metté C, Morel A, Label P, Lelu-Walter M** (2013). L'embryogenèse somatique : une méthode de multiplication végétative du pin maritime pour demain ? FCBA - INFO - Août 2013.
- Välimäki S, Teyssier C, Tikkinen M, Delile A, Boizot N, Varis S, Lelu-Walter M A, Aronen T** (2022) Norway spruce somatic embryogenesis benefits from proliferation of embryogenic tissues on filter discs and cold storage of cotyledonary embryos. *Front. Plant Sci.* 13, 1031686.
- Varis S, Ahola S, Jaakola L, Aronen T** (2017) Reliable and practical methods for cryopreservation of embryogenic cultures and cold storage of somatic embryos of Norway spruce. *Cryobiology* 76, 8-17.
- von Aderkas P, Teyssier C, Charpentier J P, Gutmann M, Pâques L, Le Metté C, Ader K, Label P, Kong L, Lelu-Walter M A** (2015) Effect of light conditions on anatomical and biochemical aspects of somatic and zygotic embryos of hybrid larch (*Larix × marschlinsii*). *Ann. Bot.* 115(4), 605-15.
- Yu K, Song Y, Lin J, Dixon R A** (2023) The complexities of proanthocyanidin biosynthesis and its regulation in plants. *Plant Communications* 4(2), 100498.
- Zhu L J, Deng X G, Zou L J, Zhang D W, Lin H H** (2017) Enhancement of stress tolerance in cucumber seedlings by proanthocyanidins. *Biol. Plant.* 61, 323-332.
- Ziv M** (1991) Quality of micropropagated plants–vitrification. *In Vitro Cell. Dev. Biol.–Plant* 2, 64–69.

## Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis.*

La qualité de l'embryon somatique (ES) est jugée selon sa ressemblance avec l'embryon zygotique (EZ). Ainsi, la qualité de l'ES peut être évaluée selon des critères morphologiques mais aussi selon des variables biologiques et biochimiques. La morphologie et l'anatomie des ES de mélèze est identique à celle des EZ (Von Aderkas et al., 2015). En ce qui concerne les réserves protéiques, les ES sont très proches des EZ (Teyssier et al., 2014). Cependant, une différence marquante a été rapportée en regard de la teneur en eau, celle des ES étant environ 25 fois supérieure à celle des EZ déshydratés (Lelu et al., 1995). Pour permettre aux ES de se rapprocher des caractéristiques des EZ, il convient de trouver une méthode de déshydratation adéquate. Cependant, celle-ci n'est pas indispensable au développement ultérieur des ES de mélèze hybride (germination) contrairement aux ES d'épicéa qui ont un besoin absolu d'être déshydratés pour germer (Roberts et al., 1991; Pond et al., 2002). Néanmoins, la déshydratation des ES de mélèze hybride améliore la synchronisation et le taux de germination et de conversion en plante (Roberts et al., 1990; Lelu et al., 1995).

Le degré et la vitesse de déshydratation dépendent de nombreux facteurs tels que la durée du traitement et le pourcentage d'humidité relative (HR) elle-même dépendante de la température (Lecouteux et al., 1992 ; Meschine, 1995). Chez le mélèze hybride *Larix x marschlinsii*, une déshydratation lente des ES a été développée et consiste en une semaine sous HR élevée (98%) à +4°C (Lelu et al., 1995). Ce traitement conduit à une diminution progressive de la teneur en eau des ES jusqu'à atteindre 0.97g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> MS, teneur qui reste encore supérieure à celle des EZ secs (0.2g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> MS, Lelu et al., 1995). Lorsque que la déshydratation est réalisée sous une faible HR (59%), la teneur en eau des ES diminue drastiquement pour atteindre celle des EZ secs. Cependant, la germination et la conversion en plante des ES sont négativement affectées (73% de germination et 41% de plants) contrairement à une déshydratation sous 98% HR (99% de germination et 71% de plants).

Au niveau cellulaire, la déshydratation peut entraîner des dommages au niveau des membranes ainsi que la concentration du cytoplasme. Cela peut affecter l'intégrité et la fonction des composants cellulaires et par voie de conséquence la viabilité de l'embryon (Vicré et al., 2004). Les analyses histologiques permettent d'observer l'intégrité cellulaire et la distribution des réserves ce qui pourrait fournir des informations expliquant les changements en regard des caractéristiques biologiques des ES (Eliášová et al., 2022). Afin de permettre aux ES de survivre à une déshydratation, des modifications structurelles, biochimiques et métaboliques se mettent en place (Leprince et al., 1993; Olivier et al., 2020). Les glucides jouent un rôle essentiel durant la déshydratation. Ils sont une source d'énergie et des osmoprotectants permettant aux embryons de survivre aux effets négatifs de la déshydratation. Ils participent également à la stabilité des structures cellulaires des embryons (Hoekstra et al., 2001a ; Lipavská et Konrádová, 2004 ; Navarro et al., 2017). Par ailleurs, certaines protéines sont également impliquées dans la survie de

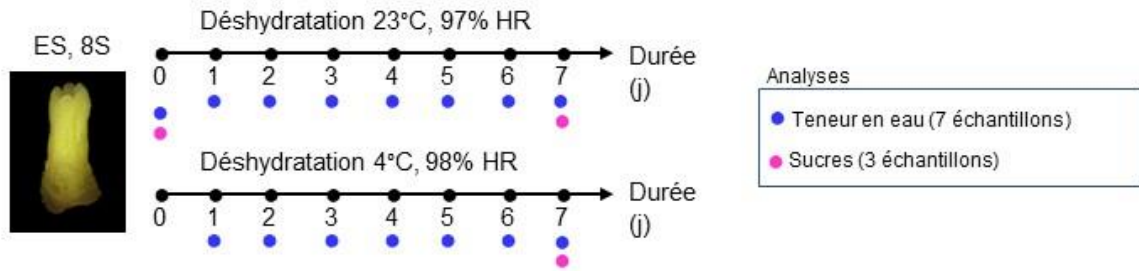
l'embryon en réduisant les dommages induits par la déshydratation (Amara et al., 2014). Parmi elles nous pouvons citer les late embryogenesis abundant proteins (LEA), les heat shock proteins (HSP) et les enzymes antioxydantes (Morse et al., 2011 ; Jing et al., 2017; Eliášová et al., 2022). Ainsi, l'étude de la qualité et de l'abondance des glucides et des protéines est utile pour caractériser certaines modifications induites par la déshydratation. Par ailleurs, la protéomique constitue un outil puissant pour démontrer l'implication de certains processus métaboliques durant la déshydratation (Businge et al., 2013; Jing et al., 2017; Eliášová et al., 2022). Ainsi, la déshydratation est souvent associée à la synthèse et au catabolisme des phytohormones telles que l'acide abscissique (ABA) et les cytokinines (Swamy and Smith, 1999; Zwack et Rashotte, 2015). Chez le mélèze hybride *Larix x marschlinsii*, la déshydratation des ES entraîne la réduction de la teneur en ABA elle-même associée à une amélioration de la germination et de la conversion en plante (Dronne et al., 1997). De même, chez les ES de *Picea abies* leur déshydratation s'accompagne d'un pic de cytokinine et d'un faible ratio auxine/cytokinine, créant des conditions favorables à la germination (Vondrakova et al., 2018). L'étude du statut hormonal des ES se révèle donc intéressant pour mieux comprendre leur réponse à une déshydratation.

Afin de fournir une caractérisation de la déshydratation des ES de mélèze hybride, notre étude a intégré des analyses à la fois biologiques, histologiques, biochimiques et moléculaires. Nous pourrions d'une part dresser un inventaire des modifications qualitatives et quantitatives survenant suite à l'application de traitements de déshydratation sous différentes HR. D'autre part, il s'agira de trouver les meilleurs paramètres (température, HR) pour déshydrater les ES pour leur permettre de se rapprocher des caractéristiques des EZ secs tout en améliorant la germination et la conversion en plante. Dans ce chapitre nous allons étudier (Figure IV.1) :

- (1) les effets de la température de déshydratation des ES 8S de *Larix x eurolepis*, sur leur teneurs en eau et glucides. Pour ce faire, nous avons appliqué la déshydratation précédemment mise au point chez le mélèze *Larix x marschlinsii* consistant en une semaine à +4°C sous une HR élevée (98%). En parallèle, nous avons appliqué une déshydratation d'une semaine toujours sous forte HR (97%) mais à +23°, température couramment utilisée chez les conifères.
- (2) les effets de l'HR sous laquelle est conduite la déshydratation des ES, sur leurs caractéristiques biologiques, biochimiques et moléculaires. Les ES 8S ont été déshydratés une semaine à +4°C sous haute (98%) et sous faible (59%) HR. Nous avons ensuite combiné ces deux déshydratations (1 semaine sous 98% suivie d'une semaine à 59%). Chez les conifères, cette étude de la déshydratation des ES sous haute et sous faible HR par une approche analytique multi-échelles n'a jamais été réalisée et constitue l'originalité du travail et fait l'objet d'un article.

Nous avons travaillé avec deux lignées embryogènes demi-frères (lignées Q10, N23 variété REVE VERT) ainsi qu'avec des EZ de mélèze hybride variété REVE VERT issus de graines fraîches récoltées le 24 juin 2020 et de graines sèches stockées. Le plan des expérimentations ainsi que les analyses réalisées sont présentés dans la figure IV.1.

Partie 1. Etude de l'effet de la température de déshydratation sur la teneur en eau et le profil de glucides des ES



Partie 2. Analyses biologique, biochimique et moléculaire de la déshydratation des ES en fonction du pourcentage d'humidité relative (HR)

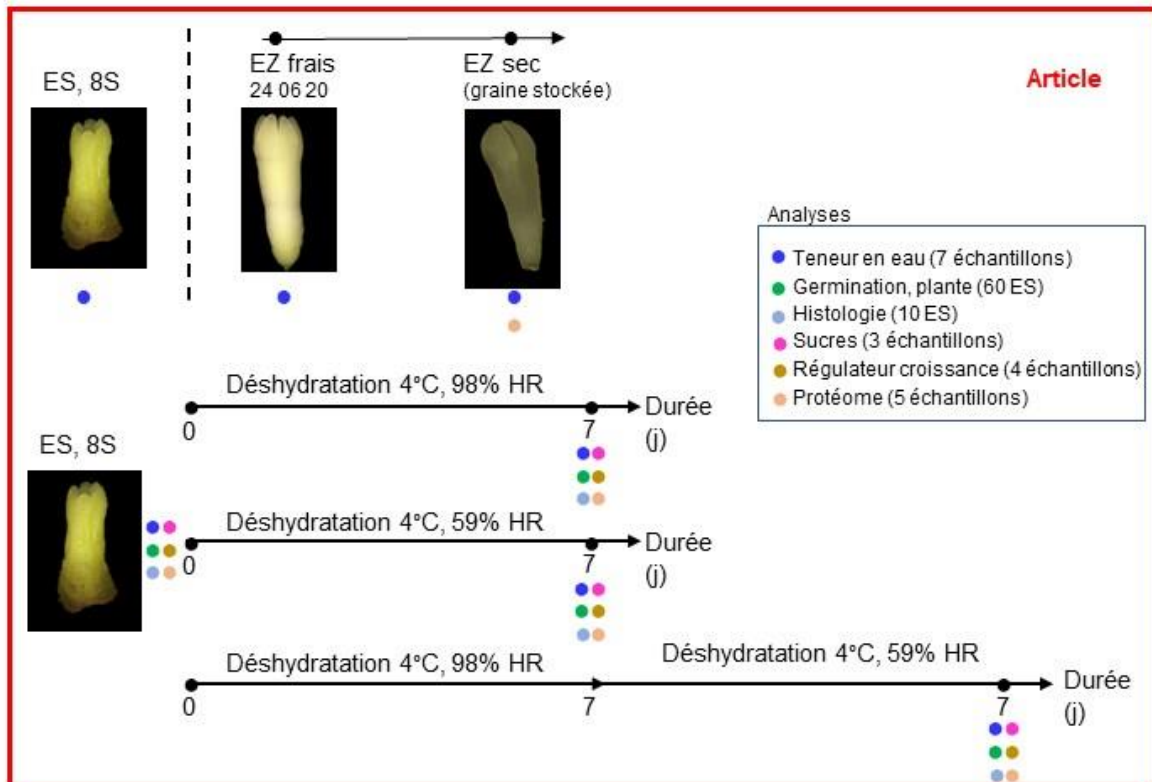


Figure IV.1. Plan expérimental des analyses réalisées dans le chapitre 3 Résultats complémentaires partie 1

## IV.1. Etude des effets de la température de déshydratation sous forte humidité relative

### IV.1.1. Résultats complémentaires

Les ES de 8 semaines présentent une teneur en eau initiale de 1.2 g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> MS (Figure IV.2). Durant la déshydratation sous forte humidité relative (97-98% HR), la teneur en eau décroît progressivement avant de se stabiliser au bout de 4 jours à 0.7 g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> MS quelle que soit la température. L'ANOVA réalisée pour les mesures de la teneur en eau n'a mis en évidence aucun effet significatif ( $p < 0.05$ ) de la température de déshydratation ou de la lignée (Tableau IV.1). En d'autres termes, la cinétique de la perte d'eau au cours du traitement de déshydratation est similaire pour les deux lignées à +4 et +23°C.

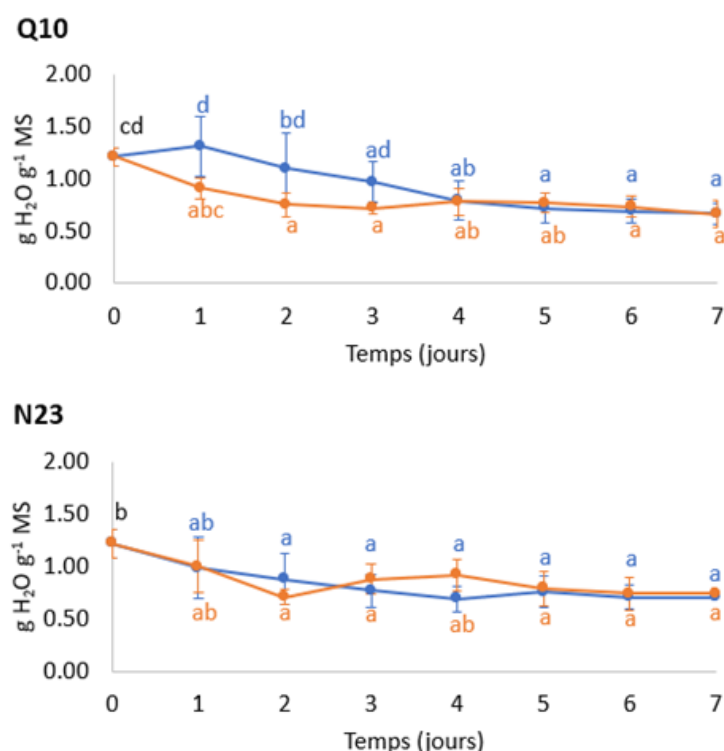


Figure IV.2. Evolution de la teneur en eau des embryons somatiques de mélèze hybride de 8 semaines déshydratés sous haute humidité relative (97-98%) à +4°C (●) et +23°C (●), pour deux lignées embryogènes de mélèze hybride (Q10, N23). Les différences significatives pour  $p < 0.05$  sont indiquées par des lettres (ANOVA, Tuckey). n=6

Tableau IV.1. Pourcentage d'effet selon les analyses ANOVA pour la teneur en eau mesurée chez les embryons somatiques de mélèze hybride de 8 semaines des lignées Q10 et N23 déshydratés sous haute humidité relative (97-98%) à +4°C et +23°C.

Variables	Pourcentage d'effet
Temps	40.8
Température	1
Lignée	0.2
Temps:Température	7.1
Temps:Lignée	2.1
Température:Lignée	3.3
Temps: Température:Lignée	3

La déshydratation sous HR élevée conduit principalement à une accumulation de saccharose et une diminution des teneurs en fructose et glucose indépendamment de la température (Figure IV.3, Tableau IV.2). Pour ces trois types de glucides, l'analyse ANOVA a mis en évidence un effet de la température supérieur à l'effet de la lignée (Table IV.3). Pour le raffinose, la déshydratation n'a aucun effet sur sa teneur quelle que soit la température.

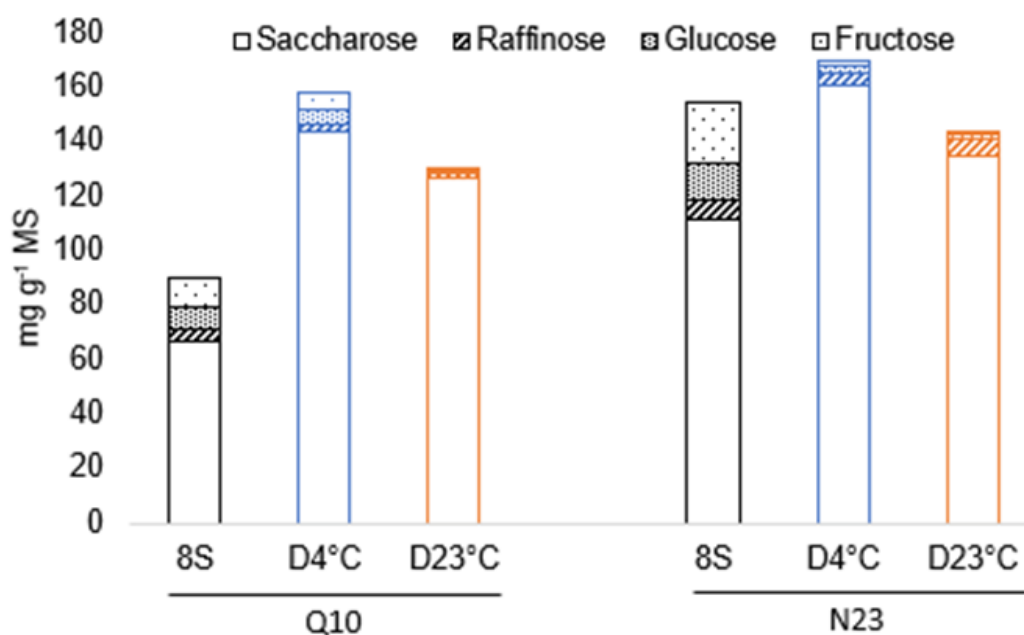


Figure IV.3. Profil des principaux glucides solubles des embryons somatiques de 8 semaines déshydratés sous humidité relative élevée (97-98%) à +4°C (■) et +23°C (■), pour deux lignées embryogènes de mélèze hybride (Q10, N23).



Tableau IV.2. Teneurs moyennes en sucres solubles des embryons somatiques de 8 semaines déshydratés sous humidité relative élevée (97-98%) à +4°C et +23°C, pour deux lignées embryogènes de mélèze hybride (Q10, N23). Les différences significatives pour  $p < 0.05$  sont indiquées par des lettres (ANOVA, Tuckey).  $n=3$

Lignée	Traitement	Fructose	Galactose	Glucose	Inositols	Raffinose	Saccharose	Sucres solubles totaux
Q10	8W	10.6 ± 1.44 <sup>c</sup>	0.3 ± 0.26 <sup>ab</sup>	7.83 ± 1.79 <sup>b</sup>	2.96 ± 1.03 <sup>bc</sup>	4.35 ± 1 <sup>ab</sup>	67.22 ± 4.7 <sup>a</sup>	93.25 ± 6.07 <sup>a</sup>
	D4°C	6.33 ± 1.15 <sup>a</sup>	0.37 ± 0.19 <sup>a</sup>	4.67 ± 1.73 <sup>a</sup>	3.28 ± 0.1 <sup>c</sup>	3.18 ± 0.25 <sup>a</sup>	143.43 ± 6.55 <sup>b</sup>	161.26 ± 9.11 <sup>ab</sup>
	D23°C	0.29 ± 0.1 <sup>b</sup>	0 ± 0 <sup>b</sup>	1.17 ± 0.5 <sup>ab</sup>	3.61 ± 0.23 <sup>bc</sup>	2.03 ± 1.18 <sup>a</sup>	126.56 ± 14.7 <sup>b</sup>	133.66 ± 13.83 <sup>b</sup>
N23	8W	21.73 ± 1.71 <sup>d</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>	14 ± 1.81 <sup>c</sup>	1.03 ± 0.09 <sup>a</sup>	7.03 ± 0.5 <sup>b</sup>	111.31 ± 39.37 <sup>ab</sup>	155.1 ± 38.91 <sup>b</sup>
	D4°C	2.05 ± 0.77 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>	2.66 ± 0.5 <sup>a</sup>	2.95 ± 0.21 <sup>c</sup>	4.48 ± 0.2 <sup>b</sup>	160.56 ± 10.54 <sup>b</sup>	172.7 ± 11.35 <sup>b</sup>
	D23°C	0.4 ± 0.08 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>	1.34 ± 0.24 <sup>a</sup>	4.97 ± 0.44 <sup>ab</sup>	6.68 ± 1.92 <sup>ab</sup>	134.41 ± 9.69 <sup>b</sup>	147.79 ± 11.93 <sup>b</sup>

Tableau IV.3. Pourcentage d'effet selon les analyses ANOVA pour les glucides mesurés chez les embryons somatiques de mélèze hybride des lignées Q10 et N23 déshydratés sous haute humidité relative (97-98%) à +4°C et +23°C.

Variables	Température	Lignée	Température:Lignée
Amidon	<b>90.2</b>	4.4	3.3
Fructose	<b>78.2</b>	2.3	18.1
Galactose	17.5	33.7	17.5
Glucose	<b>78.5</b>	2.4	13.9
Inositols	58.4	1.5	30
Raffinose	15.8	53.5	12.2
Saccharose	<b>61.8</b>	12.1	5.4
Sucres solubles totaux	34.9	23.9	15.1

Initialement les ES de 8 semaines présentent une teneur en amidon atteignant en moyenne 251 mg g<sup>-1</sup> MS pour la lignée Q10 et 354 mg g<sup>-1</sup> MS pour la lignée N23 (Figure IV.4). L'application d'une déshydratation sous HR élevée, entraîne la diminution de la teneur en amidon quelle que soit la température. A +4°C, la teneur en amidon atteinte est en moyenne de 108 et 129 mg g<sup>-1</sup> MS pour Q10 et N23 respectivement, teneurs qui sont 2 fois plus élevées par rapport à celles des ES déshydratés à +23°C. L'analyse ANOVA ( $p < 0.05$ ) a confirmé un effet important de la température (90.2 %) (Tableau IV.3).

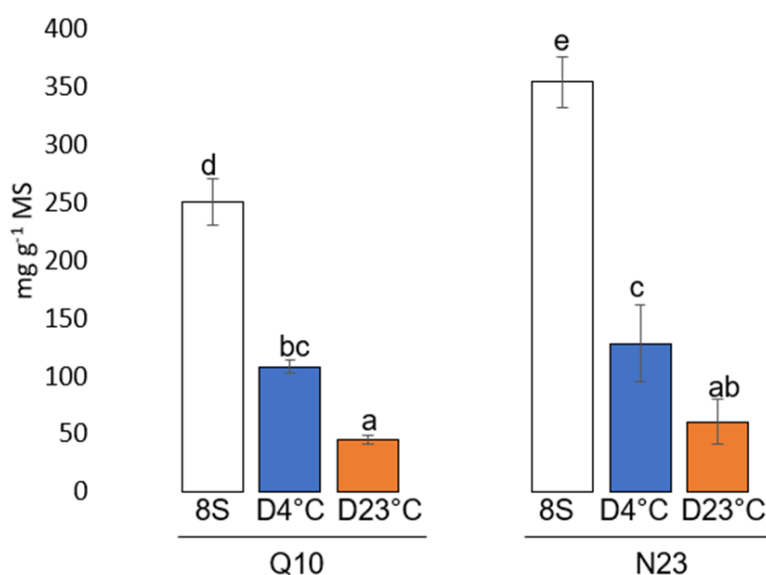


Figure IV.4. Teneur en amidon des embryons somatiques de 8 semaines déshydratés sous humidité relative élevée (97-98%) à +4°C (■) et +23°C (■), pour deux lignées embryogènes de mélèze hybride (Q10, N23). Les différences significatives pour  $p < 0.05$  sont indiquées par des lettres (ANOVA, Tuckey).  $n=3$

#### IV.1.2. Discussion

##### Effet de la température sur l'évolution de la teneur en eau et des glucides des ES de mélèze hybride suite à une déshydratation sous humidité relative élevée (97-98%)

Les cinétiques de la perte en eau des ES, lors de leur déshydratation à +4°C et +23°C sous 97-98% d'HR, ont été établies. L'analyse ANOVA ( $p < 0.05$ ) révèle que l'effet de la température est faible (1%) et non significatif. Cela indique que les cinétiques de perte d'eau sont équivalentes à +4°C et à +23°C, la teneur en eau des ES diminuant progressivement pour se stabiliser au bout de 4 jours à 0.7 g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> MS. Dans nos conditions, le profil de déshydratation suit la même évolution que celle décrite précédemment pour le mélèze hybride *Larix x marschlinsii* (*L. kaempferi* x *L. decidua*), déshydratation réalisée à +4°C sous 98% HR (Dronne et al., 1997). De même, la teneur en eau des ES après déshydratation est équivalente à celle mesurée dans notre étude. Cela montre l'adaptabilité de cette technique de déshydratation à une autre espèce et à des ES obtenus dans des conditions de maturation différentes.

Pour la majorité des conifères, la déshydratation des ES est réalisée à une température variant de +18°C à +27°C (Maruyama et Hosoi, 2012 ; Hazubska-Przybył et al., 2015 ; Jing et al., 2017 ; Fischerová et al., 2022). Cependant, chez le mélèze hybride *Larix x marschlinsii*, la déshydratation des ES est réalisée à +4°C (Lelu et al 1995). L'effet bénéfique d'une déshydratation réalisée à +4°C a notamment été observé lorsque des ES développés en absence d'ABA présentaient un taux élevé de survie (90%) seulement quand la déshydratation était réalisée à +4°C par opposition à une déshydratation à +25°C (Lelu et al. 1995).

Ce bénéfice d'une déshydratation à +4°C pourrait être expliqué par le fait que sous une température positive faible, l'activité métabolique des ES soit réduite dès lors que

la déshydratation est appliquée. Cela minimiserait par voie de conséquence la dégradation des réserves de l'embryon ce qui lui permettrait d'en accumuler davantage pour les processus ultérieurs tels que la germination.

L'acide abscissique (ABA) est connu pour être synthétisé en réponse à un stress froid (Finkelstein et al., 2002). Par ailleurs, l'ABA jouerait également un rôle dans la tolérance à la déshydratation en activant l'expressions de gènes codant pour des protéines impliquées dans la protection des embryons et en stimulant la synthèse d'enzymes antioxydantes (Vishwakarma et al., 2017). Chez les ES de mélèze hybride *Larix x marschlinii*, l'application d'une déshydratation à +4°C sous 98% HR induit notamment la synthèse transitoire d'ABA, améliorant de manière indirecte la tolérance des ES à la déshydratation et favorisant la survie des embryons (Dronne et al., 1997). Néanmoins, les auteurs n'ont pas pu déterminer si cette synthèse d'ABA était la conséquence de la déshydratation et/ou de l'effet du froid.

Nous avons étudié l'impact d'une déshydratation sur le profil des glucides des ES après déshydratation réalisée à +4°C et +23°C. Cela conduit principalement à une accumulation de saccharose et une diminution de la teneur en amidon, la teneur en raffinose n'étant pas modifiée. L'augmentation de saccharose et la diminution d'amidon ont précédemment été rapportées au cours de la déshydratation à +23°C d'ES de *Picea mariana* sous 97% HR (Bomal et al., 2002). Dans cette étude, la tolérance à la déshydratation est évaluée par le pourcentage de germination des ES après une déshydratation rapide, plus le pourcentage est élevé plus les ES sont tolérants à la déshydratation. Une forte teneur en saccharose et la présence de raffinose ont été associées à une tolérance complète (>90% de germination après déshydratation rapide).

La diminution de la teneur en amidon pourrait aussi contribuer à la tolérance à la déshydratation en fournissant du glucose nécessaire à la synthèse du saccharose comme observé précédemment dans les graines de *Brassica campestris* (Leprince et al. 1990), et/ou à la synthèse de RFO comme suggéré par Elango et al. (2022). Cependant, chez les ES déshydratés de mélèze hybride la diminution de la teneur en amidon ne va pas de pair avec une augmentation proportionnelle de saccharose ou de raffinose. Cela suggère que la diminution d'amidon ne suffit pas à expliquer à elle seule l'augmentation de saccharose. Il est possible que la déshydratation entraîne d'autres modifications aboutissant également à la synthèse de saccharose. Il a notamment été mentionné la mobilisation des lipides (Graham 2008).

En résumé, la synthèse de saccharose, la présence de raffinose ainsi que la diminution de la teneur en amidon font parties des éléments qui concourent à l'acquisition de la tolérance à la déshydratation. Chez nos ES déshydratés, ces événements ont été observés et suggèrent que les ES présentent potentiellement une tolérance à la déshydratation. Cependant, les résultats de notre étude ne permettent pas d'affirmer cette hypothèse.

En conclusion, comparée à +23°C une déshydratation réalisée à +4°C entraîne le même effet en regard de la teneur en eau des ES. Par ailleurs, elle permet d'obtenir de meilleurs résultats au niveau quantitatif pour la teneur en amidon. En regard de nos résultats et de ceux obtenus précédemment (Lecouteux, 1992 ; Lelu et al., 1995 ;

Dronne et al., 1997), une déshydratation à +4°C paraît plus bénéfique par rapport à une déshydratation à +23°C. Pour la suite, nous continuerons donc de réaliser la déshydratation des ES de mélèze hybride à +4°C. Néanmoins, il est important de noter que la teneur en eau des ES déshydratés sous HR élevée reste supérieure à celle mesurée chez les EZ secs (0.2 g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> MS, Lelu et al., 1995). Il convient donc de déshydrater les ES de manière plus drastique afin d'atteindre la teneur en eau mesurée chez les EZ secs. Cela fera l'objet de la partie suivante du chapitre.

## IV.2. Publication

Successful combined desiccation treatments of hybrid larch somatic embryos: multi-scale characterizations

### Authors

Savane Parisa<sup>1</sup>, Eliášová Katerina<sup>2</sup>, Dobrev Petre I<sup>2</sup>, Vondráková Zuzana<sup>2</sup>, Delile Armelle<sup>1</sup>, Boizot Nathalie<sup>1</sup>, Rogier Odile<sup>1</sup>, Motyka Václav<sup>2</sup>, Ridet Céline<sup>1</sup>, Claverol Stéphane<sup>3</sup>, Teyssier Caroline<sup>1\*</sup>, Lelu-Walter Marie-Anne<sup>1\*</sup>

1 INRAE, ONF, BioForA, UMR 0588, F-45075 Orléans, France

2 Institute of Experimental Botany of the Czech Academy of Sciences, Prague, Czechia,

3 Plateforme Proteome, University of Bordeaux, Bordeaux, France

\* : equal contribution

### Summary

It is believed that the obtention of somatic embryos (SE) that closely resemble fully mature zygotic embryos (ZE) will enhance the chance to produce plants equivalent to those from seedlings. At the end of their maturation, SE still differ from ZE in terms of their water content and biochemical composition. Therefore, desiccation becomes crucial to reduce SE water content and to initiate biochemical changes that will sustain germination and conversion to plant. We investigated biological, histological, biochemical and molecular changes occurring in hybrid larch SE exposed to desiccation carried out under high relative humidity (RH) (98%), reduced RH (59%) or combination of both. Desiccation under 98% RH (D98) resulted in improved germination frequency, starch reduction and sucrose synthesis and decrease in abscisic acid (ABA) content. These biochemical modifications were associated with desiccation tolerance and proved to be favorable for SE germination. Nevertheless, this treatment did not reduce the water content to a level equivalent to dried ZE, unlike desiccation under 59% RH (D59). However, the latter reduced the germination rate and did not induce beneficial biochemical changes as observed in D98 SE. Furthermore, proteomic results showed that D98 is beneficial for orienting SE metabolism towards the acquisition of desiccation tolerance, whereas D59 was perceived as a signal inducing physical damage to the cell wall and triggering responses to biotic and abiotic stresses. The response of D59 SE was then oriented towards the activation of defense mechanisms, while modifications favoring tolerance to desiccation were repressed. On the opposite a treatment combining successively the two desiccations minimized the effects of D59 on SE germination and plant conversion, while reducing their water content to a level equivalent to that of ZE. The beneficial effect of this treatment on germination was reinforced by the induction of biochemical modifications (ABA decrease, starch reduction, sucrose synthesis) and the amplification of biological processes involved in energy storage and desiccation tolerance at proteomic level. This is the first time that conifer SE desiccation has been studied involving integrated multi-scale analysis, especially for SE submitted to reduced RH combined with desiccation under high RH (D98+59). All together, our results provide new insights into events associated with desiccation of hybrid larch somatic embryo. Moreover, our desiccation treatment resulted in high percentage of germination and conversion to plant.

## Abbreviations

ABA: abscisic acid; 7OH-ABA: 7-hydroxy-ABA; 9OH-ABA: 9-hydroxy-ABA; ABA-GE: ABA-glucosylester; BP: biological process; BzA: benzoic acid; DPA: dihydrophaseic acid; DW: dry weight; EMs; FW: fresh weight; GO: Gene Ontology; kBP: keyword of GO biological process; PA: phaseic acid; PAA: phenylacetic acid; PAAM: phenylacetamide; PSV: protein storage vacuoles; RH: relative humidity; SA: salicylic acid; SE: somatic embryos; ZE: zygotic embryos.

## Introduction

Somatic embryogenesis is a useful vegetative propagation method to massively and rapidly propagate selected material (Park, 2002; Lelu-Walter et al., 2013) and its integration into breeding programs has been considered for different conifer species (Högberg et al 1998; Lelu-Walter and Pâques, 2009). However, it is crucial to ensure the best quality of somatic embryos (SE) before using somatic embryogenesis as a tool for forest trees deployment. Indeed, it is necessary to be able to produce SE that will give rise to somatic plants with at least performances equivalent to seedlings in terms of growth, architecture and wood properties. The quality of SE is based on their resemblance to zygotic embryos (ZE) considering their morphology, biological characteristics and biochemical composition of the storage compounds. In fact, it is believed that the obtention of SE as close as possible to ZE will increase the chance to get plants equivalent to those from seedlings.

Generally, at the end of their maturation SE remain quite different from ZE collected from fully mature dried seeds. In fact, SE look alike more to ZE collected from fresh seeds especially regarding their water content and their biochemical characteristics (Gösslová et al., 2001; Morel et al., 2014). It is therefore necessary to apply a desiccation treatment resulting in a decrease in the water content of SE and as well, to trigger biochemical changes that will sustain further developmental processes leading to the germination and the first steps of the seedling development. Research in desiccation treatment in conifer SE began in the 90's and consisted in partial drying under high relative humidity using water or supersaturated salt solution (Roberts et al., 1990; Attree et al., 1995; Find 1997). For *Picea* sps. partial desiccation of SE is a prerequisite for a successful germination (Roberts et al., 1991; Pond et al., 2002). On the opposite, desiccation of larch SE is not a requirement to get their germination. However, desiccation improved synchronous germination and conversion to plants (Roberts et al., 1990; Lelu et al., 1995). Moreover, desiccating SE is also interesting for their long-term storage allowing to handle plenty already matured SE that are able to germinate at any time (Jayasankar et al., 2005).

The degree and speed of desiccation are strongly dependent on numerous factors such as the duration of the treatment and the relative humidity depending itself on the temperature (Lecouteux et al., 1992). In hybrid larch a slow desiccation treatment has been developed and consisted in one week at +4°C under high relative humidity (RH) (98%) (Lelu et al., 1995). This treatment led to a slow decrease in the water content of SE that still remained high (0.97g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> DW) compared to that of the dried ZE (0.2g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> DW, Lelu et al., 1995). When desiccation treatment was conducted under reduced RH (59%) this led to a sharp decrease in the water content of SE which reached the level measured in dried ZE (0.2g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> DW) but with reduced of both germination and plant frequencies (73 and 42% respectively). This result supported the detrimental effect of the application of desiccation under low RH and the importance of the speed of water loss on SE germination (Hoekstra et al. 2001b).

Desiccation tolerance is generally acquired during the later stages of maturation, as the ZE accumulate their storage and undergo desiccation (Angelovici et al., 2010). It is often associated with structural, biochemical and metabolic changes to withstand water loss and prevent cellular damages caused by limitation of water availability (Leprince et al., 1993; Oliver et al., 2020). At the beginning of this process, ZE notably accumulate numerous specific storage compounds such as carbohydrates and proteins (Smolikova et al., 2020). Desiccation can have many effects, both beneficial and detrimental. On cellular level, desiccation can lead to membrane damages. Indeed, cell membrane can become disrupted resulting in leakage of cellular components (Leprince et al., 2017). Furthermore, the loss of water within the cell causes the concentration of cytoplasm leading to a decrease in cell size that can influence the integrity and functionality of cellular components and affect embryo viability (Vicré et al., 2004). Histological analyses are therefore interesting to visualize the effects of desiccation on SE cellular integrity and location of storage compounds (von Aderkas et al., 2015). Finally, cytological analysis could provide some clues to explain modifications occurring on SE viability and germination capacity.

Carbohydrates play essential roles during embryo desiccation. Among other things, they serve as energy source for the embryo (Lipavská and Konrádová, 2004; Hartmann and Trumbore 2016). Moreover, carbohydrates, particularly sucrose, act as osmoprotectants maintaining osmotic balance and preventing cell shrinkage or damage (Obendorf and Górecki 2012; Navarro et al., 2017). Carbohydrates can also contribute to structural stability of the embryo by setting up bonds with proteins and other molecules to maintain the integrity of their structure (Hoekstra et al., 2001b). They notably protect proteins from denaturation and aggregation caused by desiccation. Raffinose family oligosaccharides (RFO) are in addition useful for replacing water molecules and promote vitrification that leads to the increase of cytoplasm viscosity (Crowe et al., 1992; Leopold et al., 1994).

Many types of proteins are involved in embryogenesis process and play numerous roles. Storage proteins provide energy and are a source of nitrogen for subsequent protein synthesis. During the maturation phase, the accumulation of storage proteins such as vicilin-like, legumin-like and albumin is observed (Flinn et al., 1993; Klimaszewska et al., 2004; Teyssier et al., 2014). Moreover, some proteins can also help protecting cellular structures and maintaining essential metabolic processes during embryo desiccation. Their activities notably ensure the survival of embryos under reduced water condition (Bray, 1993). Various proteins associated with desiccation tolerance highly accumulate at the end of maturation. Among them there are especially late embryogenesis abundant proteins (LEA) and molecular chaperones known as heat shock proteins (HSP) (Jing et al., 2017; Eliášová et al., 2022). As desiccation occurs, the modification of the redox homeostasis induces an accumulation of reactive oxygen species, aggravated by the drop in enzymatic activities in the cell, in particular those involved in their elimination (Chandra and Keshavkant, 2018). Thus, investigating the quality and the abundance of proteins is of major importance to decipher the response of SE to desiccation. Indeed, proteomic analyses are powerful to better understand complex biological processes implicated in desiccation tolerance (Businge et al., 2013; Jing et al., 2017; Eliášová et al., 2022).

In SE, phytohormones play crucial roles regarding embryogenesis process. Auxins, cytokinins and abscisic acid (ABA) are of great importance since they control each step of somatic embryogenesis (Vondrakova et al., 2018). Whereas auxins and cytokinins promote cell division and growth, ABA promotes accumulation of proteins, synchronizes SE development but inhibits their germination (Lelu and Label, 1994;

Gutmann et al., 1996; von Aderkas et al., 2002). Moreover, endogenous phytohormones synthesis and catabolism are often tightly regulated in response to environmental conditions (Tuteja, 2007). ABA and cytokinins are crucial phytohormones involved in stress response including desiccation (Swamy and Smith, 1999; Zwack and Rashotte, 2015). During hybrid larch SE desiccation, a sharp decrease in ABA levels can be observed (Dronne et al., 1997). This result was associated with enhanced germination ability and conversion to plants. In *Picea abies* SE a cytokinin peak was measured at the start of desiccation (Vondrakova et al., 2018; Eliášová et al., 2022). Moreover, during this process, the auxin/cytokinin ratio was low. The effect of changes in auxin and cytokinin levels cause by desiccation is not much documented. Thereby, studying SE phytohormonal status become unavoidable to better understand SE behavior in response to desiccation.

The main objective of this analysis is to investigate histological changes occurring in hybrid larch SE which were exposed to desiccation treatments carried out under high (98%) and reduced (59%) RH. Then we tried to understand the biological, biochemical and molecular modifications taking place in SE after application of these desiccation treatments. We assessed carbohydrates and phytohormones profiles of SE in response to desiccation. Moreover, proteomic analysis reflecting up and down-regulated biological processes were as well considered. This study contributes to extend knowledge concerning conifer SE desiccation. It is the first time that SE desiccation, especially under reduced relative humidity, is studied from a multiscale point of view.

## Material and methods

### Plant material

#### Cotyledonary zygotic embryos

Cotyledonary ZE of hybrid larch *Larix eurolepis* (*Larix decidua* x *Larix kaempferi*) from RÊVE VERT family, were produced crossing one European larch clone with a polymix of 12 Japanese clones (Lelu-Walter and Pâques, 2009). Cones were collected at INRAE Centre Val de Loire, France, on 24<sup>th</sup> of June 2020. Fresh seeds were extracted from the cone scales according to the method previously described (Lelu-Walter and Pâques, 2009). Mature dry seeds of variety RÊVE-VERT, stored at -20°C until required for dissection, were also used for analysis. Fresh and dry cotyledonary ZE were excised from the surrounding megagametophyte. For the determination of the water content, samples were immediately used.

#### Cotyledonary somatic embryos (SE)

Experiments were conducted with two half-sib embryogenic lines of hybrid larch from RÊVE VERT family initiated in 2003 (N23) and 2005 (Q10). Lines cryopreserved, were thawed and matured according to Lelu-Walter and Paques 2009. Briefly, actively growing embryogenic lines were weighed, dispersed into liquid medium with no plant growth regulator, and distributed onto a filter paper disc. Filter paper discs with dissociated EMs (approximately 80-150 mg fresh weight) were transferred onto maturation MSG medium (Lelu-Walter and Pâques, 2009) containing 0.2 M sucrose, 1 µM indolebutyric acid, 60 µM cis-trans (±) ABA and 8 gL<sup>-1</sup> gellan gum. Maturation was conducted in darkness at 23°C. Cotyledonary SE after 8 weeks on maturation medium were harvested and isolated from the rest of the culture. Biological replicates were obtained by harvesting embryos from different Petri dishes containing material at the



same maturation stage. Harvested SE were weighed and directly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until required for biochemical analysis. The samples destined for water content measurements were used immediately after harvest.

### **Desiccation treatment**

For both lines, desiccation of the SE was carried out according to Dronne et al. (1997). Briefly, 8 weeks-old SE were placed onto nylon mesh which were transferred into 3 empty wells of a 6-well plate, the 3 remaining wells were filled with supersaturated salt solutions giving rise either to high (98%, KNO<sub>3</sub>) or reduced (59%, (Mg (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, Dronne et al. 1997) RH at 4°C. The plates were carefully sealed with Parafilm and placed in darkness. SE were subjected to desiccation treatment at 4°C (i) 1 week under high RH (98%), called D98, (ii) 1 week under low RH (59%), called D59 and (iii) 1 week under 98% followed by 1 week under 59%, called D98+59. After desiccation treatment, SE stuck to the supporting nylon filter, were briefly transferred onto germination medium in order to separate them from the filters. Detached SE were then carefully removed and used for analysis.

### **Germination and plantlet obtention**

SE, desiccated or not, were transferred onto plant growth regulator-free MSG medium with 0.1 M sucrose for germination. SE were considered germinated as soon as their radicle emergence. The number of germinated SE was determined after 1, 2 and 3 weeks of culture. Germinated SE developing needles was considered as a plantlet. The number of plantlets was recorded after 4, 5, 6, 7 and 8 weeks of culture on the germination medium. Sixty SE were used per condition.

### **Water content**

For the determination of the water content, harvested embryos were immediately weighed to determine their fresh weight (FW). The dry weight (DW) was determined after oven-drying at +70°C for 24 h. The water content was calculated as follow (FW–DW)/DW and expressed as H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> DW (Dronne et al., 1997). Seven biological replicates (about 15 mg FW) were assayed for each SE and ZE type.

### **Histological analysis**

For histological analysis, 10 SE of both genotypes (N23 and Q10) were collected after 8 weeks of maturation and at the end of each subsequent treatment. SE were processed according to Eliášová et al. (2017) with some modifications. Samples were fixed in a mixture of 2.5% glutaraldehyde and 1.6% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 6.9 for 30 h. The fixative was washed out with buffer and SE were dehydrated in the ethanol series (30%, 50%, 70%, 96% - for at least 2 h at each step, RT; 100% overnight, +4°C; 100% 2 h of gentle rotation at RT). Subsequently, samples were infiltrated with a cold-polymerizing resin Technovit 7100 (Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany) based on 2-hydroxyethyl methacrylate according to the manufacturer's instructions with the following modifications: preparation solution [1 g (= 1 bag) Hardener I + 100 mL base liquid Technovit 7100] / absolute ethanol (100%) 1/3 (v/v); prep. solution/absolute ethanol 1/1 (v/v); prep. solution/absolute ethanol 3/1

(v/v); 2 h of gentle rotation at RT in each step. Then, samples were infiltrated with pure preparation solution, which was changed for the fresh solution after 2 h at RT and led overnight at +4°C. Finally, the samples were embedded in the preparation solution and Hardener II mixture. The polymerised samples were fixed to the holders (Histoblocks, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany) using Technovit 3040 and removed from the embedding mould. Longitudinal sections (4-6 µm in thickness) were cut using a rotary microtome Thermo Shandon Finesse ME+ and glass knives; after drying of sections on slides the staining was carried out.

To observe of the anatomical structure and to detect polyphenolic compounds, 0.05% Toluidine blue O in acetate buffer (pH 4.4) was used. Toluidine blue O is a metachromatic dye which, at low pH, stains cellulose cell walls and nuclei blue and polyphenolic compounds blue-green, green or turquoise (O'Brien et al. 1964; Ruzin 1999).

Histochemical detection of starch and storage proteins was performed using periodic acid/ Schiff's reagent (PAS) reaction in combination with 0.1% Amido Black 10B in 7% acetic acid (Kong and Yeung, 1992; Eliášová et al., 2022). The PAS reaction providing a pink-red colouration indicated the presence of insoluble carbohydrates (i.e., cellulose, starch, mucilage), while a blue colouration of Amido Black indicated proteins. Sections were observed using an Olympus BX63 light microscope (Tokyo, Japan) equipped with an Olympus DP74 CMOS camera. Images were captured and processed using the cellSense Olympus software.

### **Carbohydrates and starch**

Soluble sugars were extracted as described by Välimäki et al. (2022). SE (approximately 50 mg FW) were freeze-dried and ground in 1 mL 80% aqueous ethanol containing 0.25 mg mL<sup>-1</sup> mannitol as an internal standard, and the extracts were heated for 30 min at 80°C. After centrifugation, the supernatants were purified on activated charcoal and polyvinylpyrrolidone to remove proteins and polyphenols. After two successive extractions with 80% ethanol without mannitol, the purified supernatants were combined. After drying under vacuum the residues were resuspended in 100 µL ultra-pure H<sub>2</sub>O. Samples (10 µl) were injected and eluted with ultra-pure H<sub>2</sub>O at a flow rate of 0.6 mL min<sup>-1</sup> and analysed by HPLC (HPLC VWR-HITACHI Chromaster) using a Rezex column (RPM-Monosaccharide Pb<sup>+2</sup>, 8%, 300 x 7.8 mm, Phenomenex) maintained at 85°C, and equipped with an ELSD 85 detector (VWR Hitachi with the following parameters: Temperature 60°C; Gain 5; Offset 0; Filter 6 s; Sampling time 100 ms-10Hz; Nitrogen pressure 3.5 bar). The various sugars were identified by co-elution with standards (Sigma, St Louis, MO, USA). The peak areas were acquired and processed with OpenLAB CDS software version EZChrom. Results were expressed as µg mg<sup>-1</sup> DW and corresponded to the mean of 3 biological repetitions ± SE. Determination of starch content was assayed from the resulting pellets obtained after extraction of soluble sugars. The pellets were dried and incubated for 2 h at 95°C in 0.02 M NaOH. After cooling to room temperature, amyloglucosidase from *Aspergillus niger* (SIGMA) was added to reduce starch to glucose and the samples were incubated for 1 h at 50°C. Starch content was quantified as glucose equivalents from the supernatants (Välimäki et al. 2022). Each sample was assayed in triplicate.

### Phytohormone analysis

The plant hormones were measured as previously described (Prerostova et al. 2021) with some modifications. Samples (ca. 10-20 mg FW) were extracted with 100 µL 1 M formic acid in water with added stable isotope labelled standards at 1 pmol per sample for 1 h. The extracts were centrifuged at 30,000×g at 4°C, and pellets were re-extracted with 100 µL 1 M formic acid. The combined supernatants were applied to SPE Oasis HLB 96-well column plates (10 mg/well; Waters, Milford, MA, USA) conditioned with 100 µL acetonitrile and 100 µL 1M formic acid using Pressure+ 96 manifold (Biotage, Uppsala, Sweden). After washing wells three times with 100 µL water, the samples were eluted with 100 µL 50% acetonitrile in water. The eluates were separated on the Kinetex EVO C18 HPLC column (2.6 µm, 150 × 2.1 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA). Mobile phases consisted of A—5 mM ammonium acetate and 2 µM medronic acid in water and B—95:5 acetonitrile:water (v/v). The following gradient was applied: 5% B in 0 min, 5–7% B (0.1–5 min), 10–35% B (5.1–12 min) and 35–100% B (12–13 min), followed by a 1 min hold at 100% B (13–14 min) and return to 5% B. Phytohormone analysis was performed with an LC/MS system consisting of UHPLC 1290 Infinity II (Agilent, Santa Clara, CA, USA) coupled to 6495 Triple Quadrupole Mass Spectrometer (Agilent, Santa Clara, CA, USA), operating in MRM mode, with quantification by the isotope dilution method. Data acquisition and processing were performed with Mass Hunter software B.08 (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

### Proteomic analyses

Soluble proteins extracts were prepared from five biological replicates for each sample (30 mg FW of frozen SE) with 1 mL of urea extraction buffer (4 M urea, 0.1% v/v SDS 10%, 0.1 M DTT, 80 mM Tris HCl pH 6.8, 10% v/v glycerol).

Five biological replicates per sample were subjected to proteomic and nLC-MS/MS analyses following Gautier et al., (2018). Briefly, each protein sample was loaded onto SDS-PAGE gel and digested with trypsin. The eluted peptide mixture was analyzed using an Ultimate 3000 nanoLC system (Dionex, Amsterdam, The Netherlands) equipped with a C18 PepMap™ trap column (LC Packings) coupled to an Electrospray Q-Exactive quadrupole Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA). Proteins were identified by SEQUEST searches implemented via Proteome Discoverer 2.5 (Thermo Fisher Scientific Inc.) against a *Larix siberica* (12.34 Gbp, 37 004 entries) (Kuzmin et al., 2019). Quantitative data were considered for proteins quantified by a minimum of two peptides and a statistical p-value lower than 0.05. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE (Vizcaíno et al., 2016) partner repository with the dataset identifier XXX.

Gene Ontology (GO) analysis was conducted using the Sma3s software (Casimiro-Soriguer et al., 2017) version 2 using the “goslim” parameter and the reference database UniRef90 based on the UniProt database (<https://www.uniprot.org>) (Consortium Uniprot, 2020). A unique synthetic keyword for GO biological process was often defined to make the interpretation possible.

### Statistical analyses

Statistical analyses were carried out with R software (version 4.1.3, © 2009–2022 RStudio, PBC). Effects of the treatments, lines and times on the DW, water, starch and

carbohydrate content were evaluated using one-way ANOVAs. Variations of these parameters were analyzed with multiple comparisons of means with Tukey contrasts ( $P < 0.05$ ).

For proteomic analysis, differential expression of proteins in the dehydrated SE vs 8W-old SE was analyzed using *t*-test, based on normalized abundance (adjusted  $P < 0.05$ ).

## Results

SE matured 8 weeks (8W) were subjected to 1 week desiccation under high RH (98%) (D98), reduced RH (59%) (D59) and a combination of both desiccation treatments (98% + 59%) (D98+59). We studied the effects of these SE desiccation treatments on histological, biological, biochemical and molecular levels.

### Biological characteristics of SE after desiccation treatments

We studied the effects of SE desiccation on their biological characteristics including water content, germination and conversion to plants. Fresh and dried ZE from stored seeds were used as control of water content.

After 8 weeks of maturation water content of SE was 1.1 and 1.2 g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> DW for Q10 and N23 respectively (Table IV.4). Comparatively, water content of cotyledonary ZE from fresh seeds was 1.1 g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> DW whereas it was reduced to 0.1 g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> DW for ZE collected from stored seed (Table IV.4). For both embryogenic lines, after desiccations water content of SE decreased to 0.7 and 0.2 g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> DW under D98 and D59 respectively (Table IV.4). This later treatment allowed SE to reach dried ZE water content. For the water content the ANOVA analysis ( $P < 0.05$ ) showed a higher effect of the desiccation treatment over the effect of lines (Table IV.7).

For both embryogenic lines, D98 did not affect their germination ability that remained high (97-100%, Table IV.5). For Q10 germination is even faster since 95% of SE are germinated after 7 days while the control showed 87% of germination (Figure IV.5). Concerning the number of plants, it was similar to the control for line Q10 (86%, Table 2) whereas it was slightly reduced for line N23 (68%). No morphological difference was observed between plants obtained from SE desiccated or not (Figure IV.6-A, B).

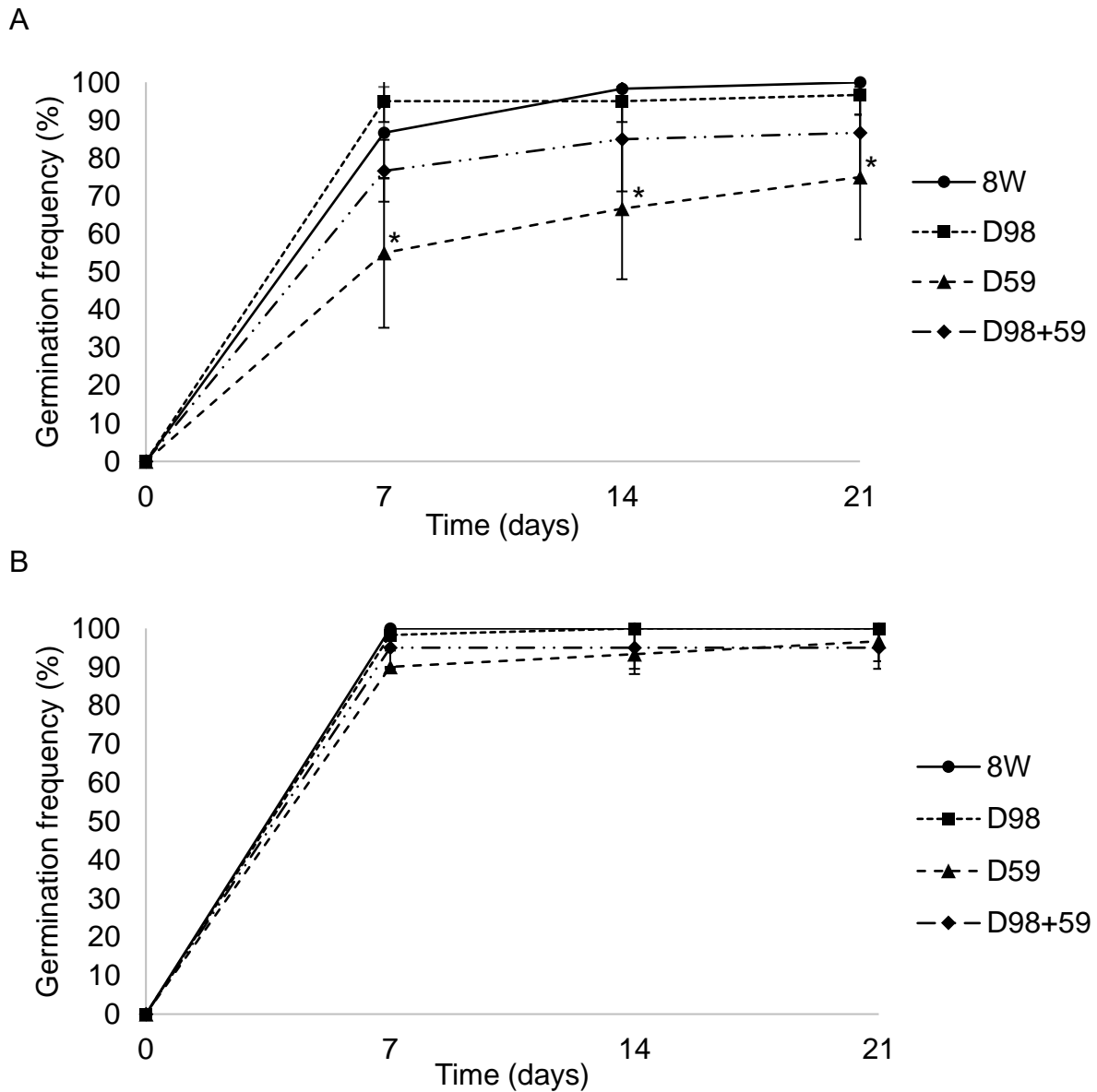
D59 affected the germination only of Q10 SE (75%, Figure IV.5). Considering the number of plants, it was reduced only of N23 SE (54%) compared to the control (78%, Table IV.5).

When D98+59 was applied, the final rate of germination (95%) and the number of plants (91-82%) regenerated were not significantly different from that of the control whatever the embryogenic line (Table IV.5). However, a difference could be observed on the morphology of plant, especially regarding the size of hypocotyls (Figure IV.6-D) that showed a reduced length and a wider size compared to plants obtained from non-dried SE.

**Table IV.4.** Mean water content of hybrid larch zygotic and somatic embryos (lines Q10, N23) subjected to one week desiccation treatments at 4°C under either 98% (D98) or 59% (D59) RH.

Material	Desiccation (% RH)	Water content* (g H <sub>2</sub> O g <sup>-1</sup> DW)
Zygotic embryos (fresh seed)	none	1.1 ± 0.2 <sup>c</sup>
Zygotic embryos (stored seed)	none	0.1 ± 0.02 <sup>a</sup>
Somatic embryos, Q10	none	1.1 ± 0.04 <sup>cd</sup>
	D98	0.7 ± 0.1 <sup>b</sup>
	D59	0.2 ± 0.02 <sup>a</sup>
Somatic embryos, N23	none	1.2 ± 0.05 <sup>d</sup>
	D98	0.7 ± 0.03 <sup>b</sup>
	D59	0.2 ± 0.03 <sup>a</sup>

\* Significant differences at  $P < 0.05$  are indicated by letters (ANOVA, Tuckey).  
n=7

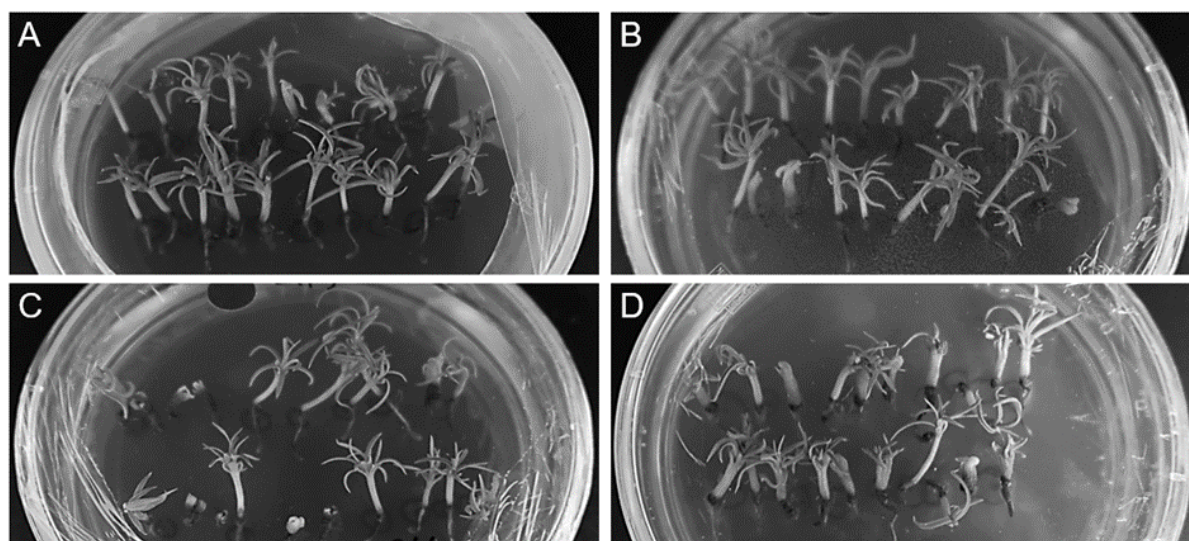


**Figure IV.5.** Germination of hybrid larch somatic embryos 8w-old (● 8W) compared to SE subjected to 1 week desiccation treatments: under 98% relative humidity (■ D98), under 59% relative humidity (▲ D59) and under both (◆ D98+59). (A) embryogenic line Q10 (B) embryogenic line N23. Significant differences at  $P < 0.05$  are indicated by an asterisk (ANOVA, Tuckey).  $n=6$

**Table IV.5.** Plant conversion of hybrid larch somatic embryos (embryogenic lines Q10, N23) subjected to one week desiccation treatments under either 98% (D98) or 59% (D59) RH or both (D98+59) at 4°C.

Line	Desiccation (% RH)	No. of SE used	No. of germinated SE		No. of plants	
			Total	%	Total	%
Q10	none	60	60	100 ± 0 <sup>a</sup>	50	83 ± 19 <sup>b</sup>
	D98	60	58	97 ± 5 <sup>a</sup>	50	86 ± 13 <sup>b</sup>
	D59	60	45	75 ± 16 <sup>b</sup>	40	88 ± 10 <sup>b</sup>
	D98+59	60	52	95 ± 12 <sup>ab</sup>	47	91 ± 8 <sup>b</sup>
N23	none	60	60	100 ± 0 <sup>a</sup>	47	78 ± 10 <sup>ab</sup>
	D98	60	60	100 ± 0 <sup>a</sup>	41	68 ± 16 <sup>ab</sup>
	D59	60	58	97 ± 5 <sup>a</sup>	31	54 ± 12 <sup>a</sup>
	D98+59	60	57	95 ± 5 <sup>a</sup>	47	82 ± 20 <sup>b</sup>

Significant differences at  $P < 0.05$  are indicated by letters (ANOVA, Tuckey). n=6



**Figure IV.6.** Plant development of hybrid larch somatic embryos (line Q10) after 8 weeks on germination medium. (A) 8 weeks-old SE (control) compared to SE subjected to (B) 1 week desiccation under 98% relative humidity (C) 1 week desiccation under 59% relative humidity and (D) 1 week desiccation under 98% relative humidity followed by 1 week 59% relative humidity.

### Histological observations

The effects of three desiccation treatments on larch SE were determined at the histological level. SE of two genotypes, N23 and Q10, which were compared, differed in their basic anatomical arrangement and localization of storage compounds already at the start of experiments, i.e., at the 8<sup>th</sup> week of maturation (8W). N23 SE had short hypocotyl and a long voluminous root cap (Figure IV.7-A, B). Cell files in N23 SE were well arranged along the embryo axis, indicating regular anticlinal divisions during embryo growth. On the contrary, Q10 SE had a much longer hypocotyl and a less

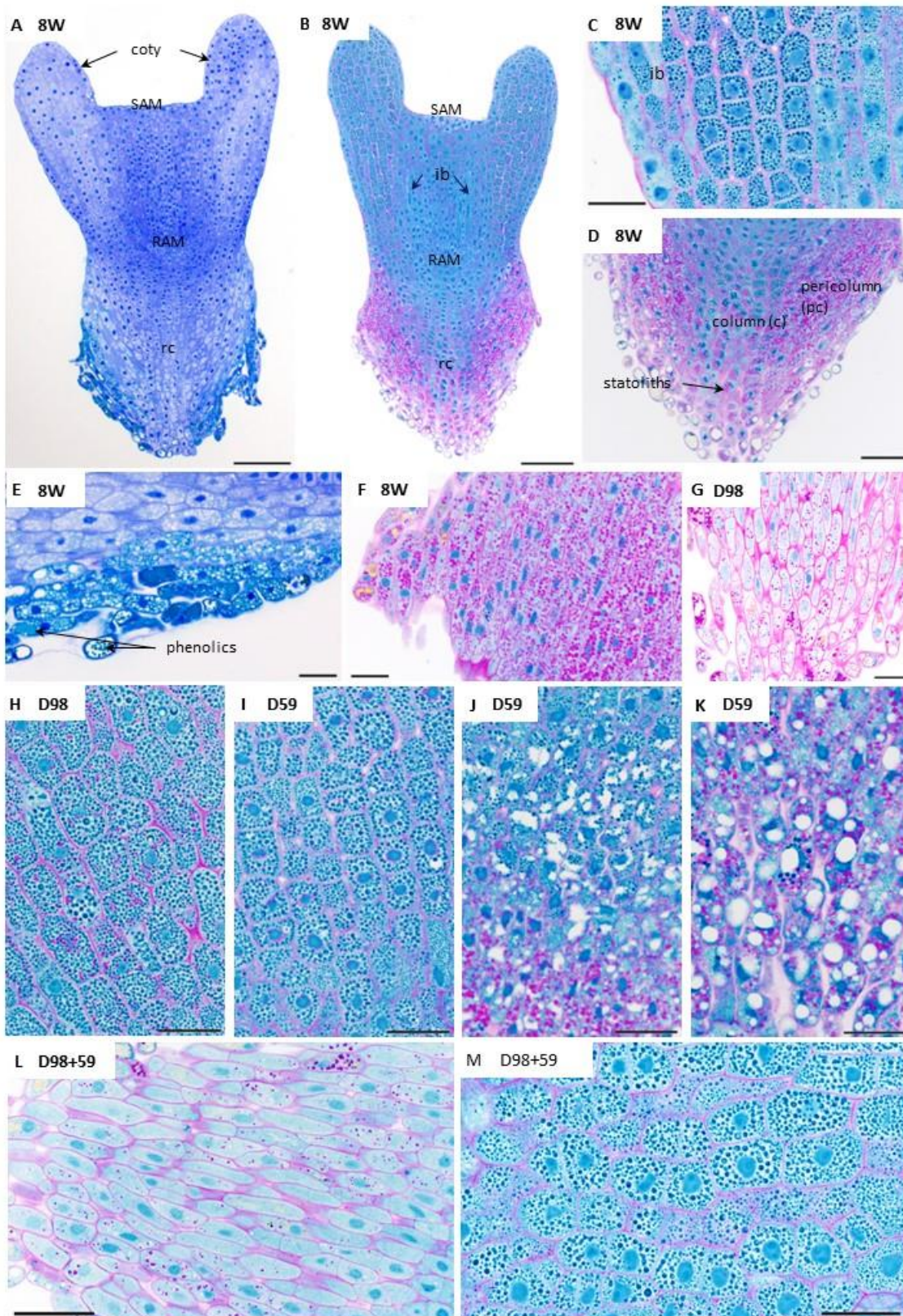
developed root cap (Figure IV.8-A, B). Compared to N23 SE, Q10 had more intercellular spaces in the cortex of hypocotyl. Cell files were arranged rather chaotically, probably resulting from irregular divisions (Figure IV.8-E, H). In both genotypes, idioblasts occurred below the protoderm and in the embryo pith (Figures IV.7-B, C; IV.8-B, C). In Q10, these specialized cells were much longer and occurred more frequently than in N23. Histochemically, we detected polyphenolic compounds (Figure IV.7-A, E; IV.8-A, D), and storage compounds, such as starch and proteins (Figure IV.7-B-M; IV.8-B-L). In both genotypes, polyphenols accumulated in vacuoles as globular inclusions, ribbons lining the tonoplast, or amorphous masses almost exclusively in the root cap pericolumn (Figure IV.7-A, E; IV.8-A, D). In both genotypes, starch was predominantly deposited in the hypocotyl cortex and the root cap pericolumn cells, but it was less abundant in the central embryo pith and the root cap column; starch grains were usually also present in the cells below the shoot apical meristem (SAM) (Figure IV.8-F). In N23, most starch grains accumulated in the root cap (Figure IV.7-D, F) and were almost invisible in hypocotyl (Figure IV.7-C) and cotyledons. Whereas in Q10, they were more evenly distributed throughout the embryo (Figure IV.8-B). In both genotypes, storage proteins were deposited in protein storage vacuoles (PSVs) of different sizes and numbers, predominantly in the hypocotyl and cotyledon cortex (Figure IV.7-C; IV.8-E), less in protodermal cells and the embryo pith. PSVs were not present in the root cap pericolumn but occurred in the column, together with starch grains that probably serve as statoliths, important for gravity-sensing (Figure IV.7-D). In Q10, except for PSVs, proteins also appeared as rod-shaped crystals (Figure IV.8-F). Furthermore, the fainter, more diffused protein-positive staining in the cytoplasm and nuclei of all cells indicated the existence of soluble proteins.

The effects of desiccation treatments on the embryonic cells varied according to the relative humidity used. Despite the variability in the response of individual embryos to treatments, these effects can be generalised. The main change was observed in the number and location of starch grains. Desiccation at a RH of 98% (D98) led to a marked decrease in the number of starch grains preferentially in the root cap (Figure IV.7-G; IV.8-G) but also, in less extent, in other parts of embryos in both genotypes compared to 8W. Desiccation at a relative humidity of 59% (D59) did not sufficiently reduce the number of starch grains in any genotype to be evident at the histological level without detailed quantification (Figure IV.7-I-K; IV.8-I, J). Mild desiccation at a relative humidity of 98% prepared the embryos for the subsequent severe desiccation at 59% (D98+59) during the two-week combined treatment. The number of starch grains decreased similarly to D98% (Figure IV.7-L, M; IV.8-K, L); however, more markedly in N23 embryos than in Q10. In Q10, large starch grains occurred in the hypocotyl cortex below cotyledons; they were also present in cotyledons and other parts of the hypocotyl (Figure IV.8).

Marked changes in the deposition of PSVs were not observed (Figure IV.7-M), except for their enlargement in the hypocotyl cortex and/or cotyledons in some D98+59 SE. This effect, resulting probably from PSVs fusion, was more pronounced in Q10 SE (Figure IV.8-L).

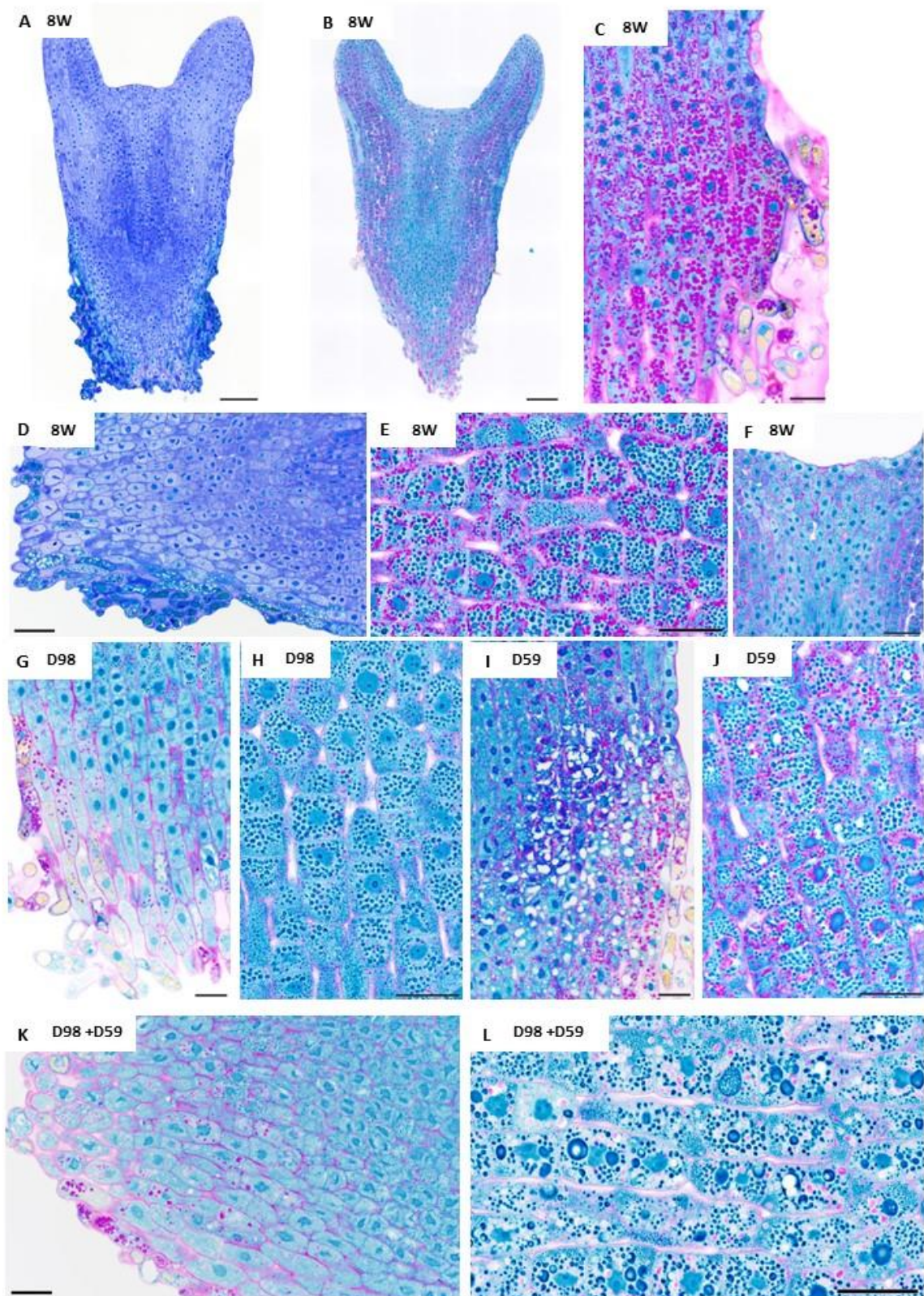
No changes in the accumulation of phenolics occurred after treatments. Besides the above-mentioned effects on storage and phenolic compounds, we observed marked vacuolisation in the cells of the hypocotyl cortex closed to the root cap (Figure IV.7-J; IV.8-I), and in root cap pericolumn (Figure IV.7-K; IV.8-I) in D59 SE of both genotypes. This effect appeared in some SE also in other parts of hypocotyl and in cotyledons (Figure IV.8-J).





**Figure IV.7.** Histology of somatic embryos (SE) of the line N23 after different desiccation treatments. A-F: 8 weeks old SE (control). G-H: SE desiccated under 98% RH. I-K: SE desiccated under 98% RH. L-M: SE desiccated under 98% RH followed by 59% RH. ib: idioblast. RAM: Root apical meristem. SAM: Shoot apical meristem. Scale bar: A-B: 200µm; C-M: 50µm.





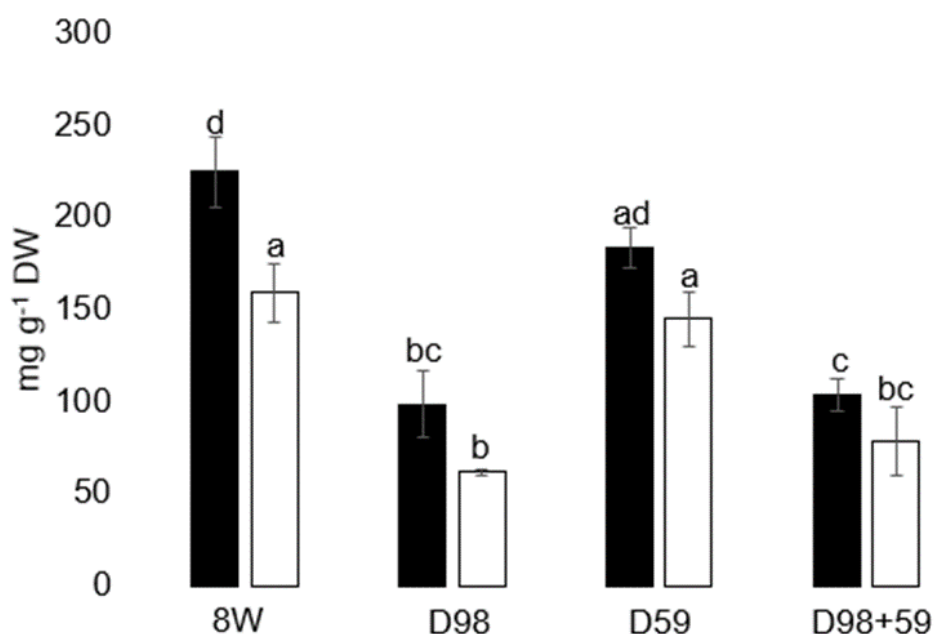
**Figure IV.8.** Histology of somatic embryos (SE) of the line Q10 after different desiccation treatments. A-F: 8 weeks old SE (control). G-H: SE desiccated under 98% RH. I-K: SE desiccated under 98% RH. L-M: SE desiccated under 98% RH followed by 59% RH. ib: idioblast. RAM: Root apical meristem. SAM: Shoot apical meristem. Scale bar: A-B: 200µm; C-M: 50µm.

### Carbohydrates profiles of SE after the application of desiccation treatments

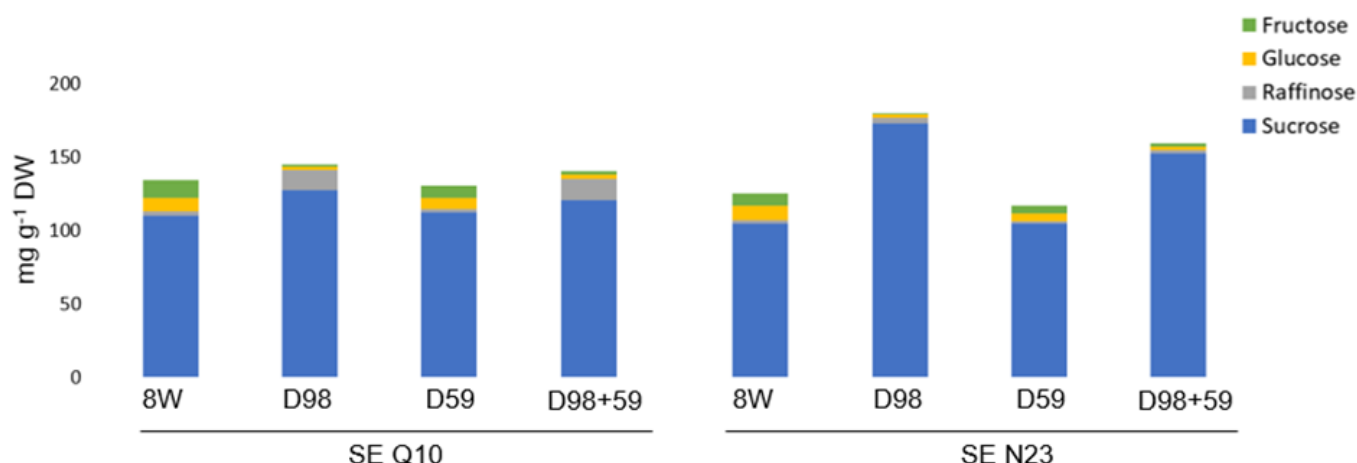
After D98, SE starch content decreased from 224.87 mg g<sup>-1</sup> DW to 98.17 mg g<sup>-1</sup> DW for Q10 and from 159.28 mg g<sup>-1</sup> DW to 61.62 mg g<sup>-1</sup> DW for N23 (Figure IV.9). For soluble carbohydrates, the desiccation led principally to an accumulation of sucrose and a decrease of fructose and glucose content (Figure IV.10, Table 3). No significant differences were observed concerning the raffinose content when comparing desiccated SE with the control.

After D59, SE starch content slightly decreased only for the line Q10 whereas for N23 no significant difference was observed (Figure IV.9). Regarding the profile of soluble carbohydrates, desiccated SE showed a similar profile compared to 8W SE (Figure IV.10, Table IV.6).

When the two desiccation treatments were combined, for both lines the SE starch content showed the same values as D98 SE (Figure IV.9). It was the same observation concerning the soluble carbohydrates profile (Figure IV.10, Table IV.6). For the starch content and for the major soluble carbohydrates including fructose, glucose and sucrose, the ANOVA analysis ( $P < 0.05$ ) showed a higher effect of the desiccation treatment over the effect of lines (Table IV.7).



**Figure IV.9.** Starch content of hybrid larch somatic embryo for two embryogenic lines Q10(■) and N23 (□): 8 weeks-old SE (8W, control) compared to SE subjected 1 week desiccation treatments under 98% RH (D98), or under 59% RH (D59) and under both (D98+59). Significant differences at  $P < 0.05$  are indicated by letters (ANOVA, Tuckey).  $n=3$



**Figure IV.10.** Soluble carbohydrates profile of hybrid larch somatic embryo (SE) for two embryogenic lines Q10 and N23. SE 8w-old (8W, control) compared to SE subjected to 1 week desiccation treatments under 98% relative humidity (D98), under 59% RH (D59) and under both (D98+59).

**Table IV.6.** Soluble carbohydrates profile of hybrid larch somatic embryo for two embryogenic lines Q10 and N23. SE 8w-old compared to SE subjected to 1 week desiccation treatments under 98% RH (D98), under 59% RH (D59) and under both (D98+59). Contents are expressed as mg g<sup>-1</sup> DW.

Line	Desiccation (% RH)	Fructose	Glucose	Inositols	Raffinose	Sucrose	Total soluble carbohydrates
Q10	none	12.36 ± 0.4 <sup>a</sup>	9.12 ± 0.42 <sup>a</sup>	2.66 ± 0.25 <sup>ab</sup>	2.64 ± 0.57 <sup>a</sup>	110.56 ± 7.81 <sup>a</sup>	137.33 ± 8.71 <sup>b</sup>
	D98	1.66 ± 0.78 <sup>c</sup>	2.38 ± 0.73 <sup>c</sup>	2.28 ± 0.33 <sup>ab</sup>	13.25 ± 8.87 <sup>a</sup>	128.07 ± 22.28 <sup>ab</sup>	147.64 ± 12.36 <sup>bc</sup>
	D59	8.7 ± 0.44 <sup>a</sup>	7.34 ± 0.62 <sup>a</sup>	2.96 ± 0.06 <sup>a</sup>	2.53 ± 0.36 <sup>a</sup>	112.33 ± 4.93 <sup>a</sup>	133.86 ± 4.35 <sup>b</sup>
	D98+59	2.29 ± 0.72 <sup>c</sup>	3.15 ± 0.83 <sup>bc</sup>	2.59 ± 0.12 <sup>ab</sup>	14.24 ± 9.56 <sup>a</sup>	121.07 ± 20.52 <sup>ab</sup>	143.34 ± 15.32 <sup>bc</sup>
N23	none	8.66 ± 1.21 <sup>a</sup>	9.9 ± 0.63 <sup>a</sup>	3.10 ± 0.32 <sup>a</sup>	2.4 ± 0.83 <sup>a</sup>	104.48 ± 4.07 <sup>a</sup>	127.83 ± 4.74 <sup>a</sup>
	D98	1.23 ± 0.21 <sup>c</sup>	1.72 ± 0.21 <sup>c</sup>	3.03 ± 0.65 <sup>a</sup>	4.39 ± 2.79 <sup>a</sup>	173.04 ± 21.76 <sup>b</sup>	183.41 ± 17.97 <sup>b</sup>
	D59	5.63 ± 0.74 <sup>b</sup>	4.96 ± 0.62 <sup>b</sup>	3.10 ± 0.41 <sup>a</sup>	1.73 ± 0.1 <sup>a</sup>	104.85 ± 3.66 <sup>a</sup>	120.27 ± 5.47 <sup>a</sup>
	D98+59	2.79 ± 0.61 <sup>c</sup>	2.39 ± 0.91 <sup>c</sup>	2.68 ± 0.72 <sup>a</sup>	1.79 ± 0.41 <sup>a</sup>	152.93 ± 37.26 <sup>ab</sup>	162.58 ± 37.41 <sup>ab</sup>

Significant differences at  $P < 0.05$  are indicated by letters (ANOVA, Tuckey). n=3

**Table IV.7.** Percentage of effect according to ANOVA analyses for water content and carbohydrates content measured in 8w-old somatic embryos subjected to different desiccation treatments, for two hybrid larch embryogenic lines (Q10, N23).

Variables	Line	Treatment	Line:Treatment
Fructose	5	88	5
Glucose	2	92	2
Inositols	17	14	9
Raffinose	20	24	18
Starch	15	78	2
Sucrose	8	44	17
Total soluble carbohydrates	3	44	19
Water content	1	98	0



## **Phytohormones analyses**

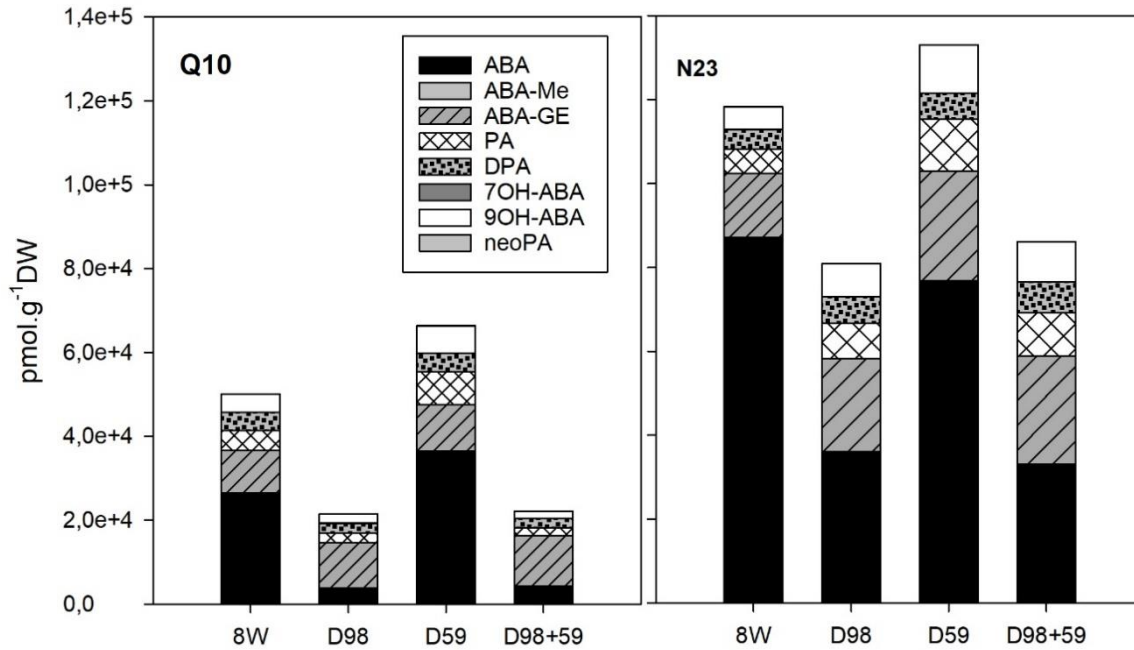
As desiccation affects, in principle, the further development of SE and, consequently emblings, we decided to analyse the changes of fundamental groups of plant hormones and their changes induced by the desiccation treatments.

### **ABA and its derivatives**

The differences in the total content of ABA and its derivatives (collectively referred to as ABA-types) induced by different treatments were similar in both embryogenic lines, and the differences in response to the treatments were found in the concentrations of the derivatives. However, the level of ABA-types in N23 was about twice that in Q10. Free ABA and seven of its derivatives were found in larch SE in all experimental variants in both Q10 and N23 lines (Figure IV.11 and Table IV.S1). ABA itself and its glucose ester ABA-GE were the major components of the total pool of ABA-types, and any changes in this pool were primarily due to changes in the content of these two compounds. The other three ABA derivatives - PA, DPA and 9-OH ABA - were present at lower concentrations, and their contribution to the total pool of ABA-types was not crucial. However, some treatment-related differences in PA, DPA, and 9OH-ABA content were observed (Table IV.S1). ABA-Me, 7OH-ABA, and NeoPA were detected at relatively low concentrations.

The high concentration of ABA in 8W SE decreased to more than half in D98 SE. ABA-GE was minimally affected by mild desiccation in both lines. The reduction of other ABA derivatives occurred in Q10 SE. In contrast, no reduction was observed in D59 SE in the Q10 line, and the total concentration of ABA-types was even slightly higher than in 8W SE. This effect was due to the slight increase in ABA, PA, DPA and 9OH-ABA content. Similarly, a slight increase in the concentrations of PA, DPA, 9OH-ABA and ABA-GE (but not ABA itself) was observed in D59 SE in the N23 line. Another treatment combined mild and intense drying, but the decrease in ABA-types content in D98+59 SE was comparable to that in D98 SE in both lines (Fig. IV.11).

**Figure IV.11. The concentration of ABA and its derivatives** in the hybrid larch 8 weeks-old SE (8W) of two genotypes Q10 and N23 compared to SE subjected to 1-week desiccation treatments under 98% (D98) or 59% (D59) RH or to 1-week treatment under 98% RH followed by one week under 59% RH (D98+59). ABA, abscisic acid; ABA-GE, ABA-glucosylester; PA, phaseic acid; DPA, dihydrophaseic acid; NeoPA, neophaseic acid; 7OH-ABA, 7-hydroxy-ABA; 9OH-ABA, 9-hydroxy-ABA.



**Table IV.S1. The concentration of ABA and its derivatives** in the hybrid larch 8 weeks-old SE (8W) of two genotypes Q10 and N23 compared to SE subjected to 1-week desiccation treatments under 98% (D98) or 59% (D59) RH or to 1-week treatment under 98% RH followed by one week under 59% RH (D98+59). Data are expressed as mean values in pmol/g DW; SD – standard deviation of at least three biological replicates; SD% - standard deviation expressed as a percentage. ABA, abscisic acid; ABA-GE, ABA-glucosylester; PA, phaseic acid; DPA, dihydrophaseic acid; NeoPA, neophaseic acid; 7OH-ABA, 7-hydroxy-ABA; 9OH-ABA, 9-hydroxy-ABA.

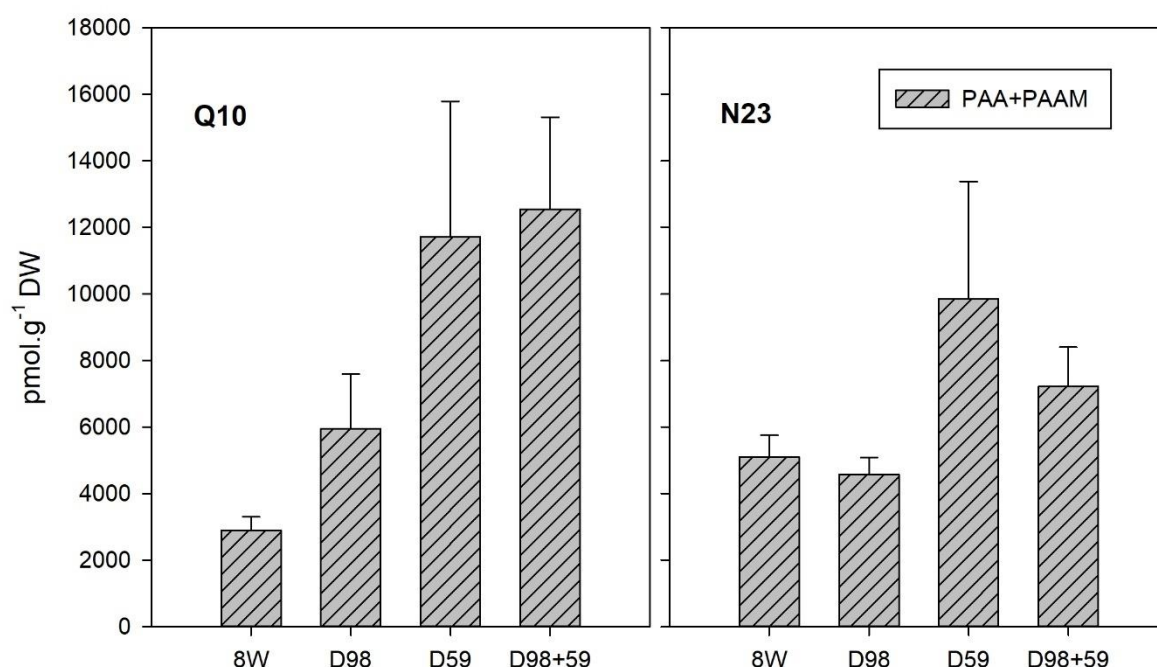
Line	Desiccation RH)	(%	ABA	ABA-Me	ABA-GE	PA	DPA	7OH-ABA	9OH-ABA	NeoPA
Q10	none	mean	26379.57 <sup>b</sup>	114.05 <sup>cd</sup>	10138.84 <sup>a</sup>	4770.61 <sup>cd</sup>	4313.8 <sup>b</sup>	5.94 <sup>a</sup>	4403.25 <sup>bc</sup>	20.61 <sup>b</sup>
		SD	3570.27	22.3	1549.98	252.03	276.65	1.83	232.62	2.02
		SD%	13.53	19.55	15.29	5.28	6.41	30.78	5.28	9.81
	D98	mean	3728.69 <sup>a</sup>	100.82 <sup>bd</sup>	10816.88 <sup>a</sup>	2346.35 <sup>abc</sup>	2288.45 <sup>a</sup>	6.99 <sup>a</sup>	2165.67 <sup>ab</sup>	3.52 <sup>a</sup>
		SD	869.35	23.93	1611.97	705.57	440.17	3.23	651.24	1.05
		SD%	23.32	23.74	14.9	30.07	19.23	46.2	30.07	29.75
	D59	mean	36467.11 <sup>b</sup>	75.77 <sup>abc</sup>	11030.33 <sup>a</sup>	7777.74 <sup>e</sup>	4447.95 <sup>b</sup>	20.53 <sup>a</sup>	6549.03 <sup>c</sup>	19.61 <sup>b</sup>
		SD	8109.4	20.25	2315.97	2381.39	1283.8	3.81	2334.86	0.64
		SD%	22.24	26.73	21	30.62	28.86	18.57	35.65	3.24
	D98+59	mean	4268.56 <sup>a</sup>	115.23 <sup>d</sup>	11928.01 <sup>a</sup>	1866.29 <sup>ab</sup>	2211.06 <sup>a</sup>	27.94 <sup>a</sup>	1722.58 <sup>a</sup>	8.08 <sup>a</sup>
		SD	824.77	9.72	3079.57	449.69	506.58	11.73	415.06	1.2
		SD%	19.32	8.44	25.82	24.1	22.91	41.98	24.1	14.86
N23	none	mean	87051.59 <sup>c</sup>	93.39 <sup>ab</sup>	15244.67 <sup>a</sup>	5819.08 <sup>a</sup>	4655.99 <sup>ab</sup>	36.79 <sup>a</sup>	5370.98 <sup>a</sup>	69.04 <sup>b</sup>
		SD	12871.32	12.86	4622.95	854.82	773.61	8.66	788.99	13.08
		SD%	14.79	13.77	30.33	14.69	16.62	23.54	14.69	18.94
	D98	mean	36012.4 <sup>ab</sup>	130.22 <sup>b</sup>	22081.62 <sup>ab</sup>	8494.44 <sup>ab</sup>	6360.5 <sup>ac</sup>	22.31 <sup>a</sup>	7840.33 <sup>ab</sup>	16.43 <sup>a</sup>
		SD	9098.14	36.36	3782.09	1717.08	1198.34	7.87	1584.86	3.75
		SD%	25.26	27.92	17.13	20.21	18.84	35.27	20.21	22.79
	D59	mean	76793.71 <sup>bc</sup>	114.95 <sup>ab</sup>	26032.64 <sup>ab</sup>	12372.59 <sup>bc</sup>	6179.66 <sup>ac</sup>	62.02 <sup>a</sup>	11419.85 <sup>bc</sup>	79.16 <sup>b</sup>
		SD	16045.81	8.28	7789.77	2257.06	1170.22	6.68	2083.25	6.03
		SD%	20.89	7.21	29.92	18.24	18.94	10.77	18.24	7.62
	D98+59	mean	32967.15 <sup>ab</sup>	134.74 <sup>b</sup>	25886.88 <sup>ab</sup>	10238.49 <sup>ab</sup>	7366.54 <sup>bc</sup>	34.07 <sup>a</sup>	9450.08 <sup>ab</sup>	28.66 <sup>a</sup>
		SD	8445.65	20.84	4903.31	2171.05	743.1	9.83	2003.87	4.83
		SD%	25.62	15.47	18.94	21.2	10.09	28.85	21.2	16.87

Significant differences at  $P < 0.05$  are indicated by letters (ANOVA, Tuckey). n=3-5

### Phenolics - PAA and PAAM, SA, BzA

Based on the analyses conducted, four different phenolic compounds were found, namely phenylacetic acid (PAA) and its amide PAAM, salicylic acid (SA) and benzoic acid (BzA). Most of the first two phenolics pool consisted of PAA, while PAAM accounted for only a few tens of pmol/g DW (Table IV.S2). Although the responses between the two embryogenic lines differed, a marked increase in PAA levels was observed in D59 SE in both lines. In Q10 embryos, the increase was also visible in D98 SE. The high concentration of PAA was maintained in D98+59 SE. The differences between the PAA content in mature and desiccated Q10 embryos were more pronounced compared to N23 embryos, where a substantial increase was observed only after intense desiccation in D59 SE (Figure IV.12).

The content of the other phenolics detected, SA and BzA, was not explicitly affected by any of the treatments (data not shown).



**Figure IV.12.** The total concentration of phenylacetic acid (PAA) and phenylacetamide (PAAM) in the hybrid larch 8 weeks-old SE (8W) of two genotypes Q10 and N23 compared to SE subjected to 1-week desiccation treatments under 98% (D98) or 59% (D59) RH or to 1-week treatment under 98% RH followed by one week under 59% RH (D98+59). Bars represent standard deviations of at least three biological replicates.



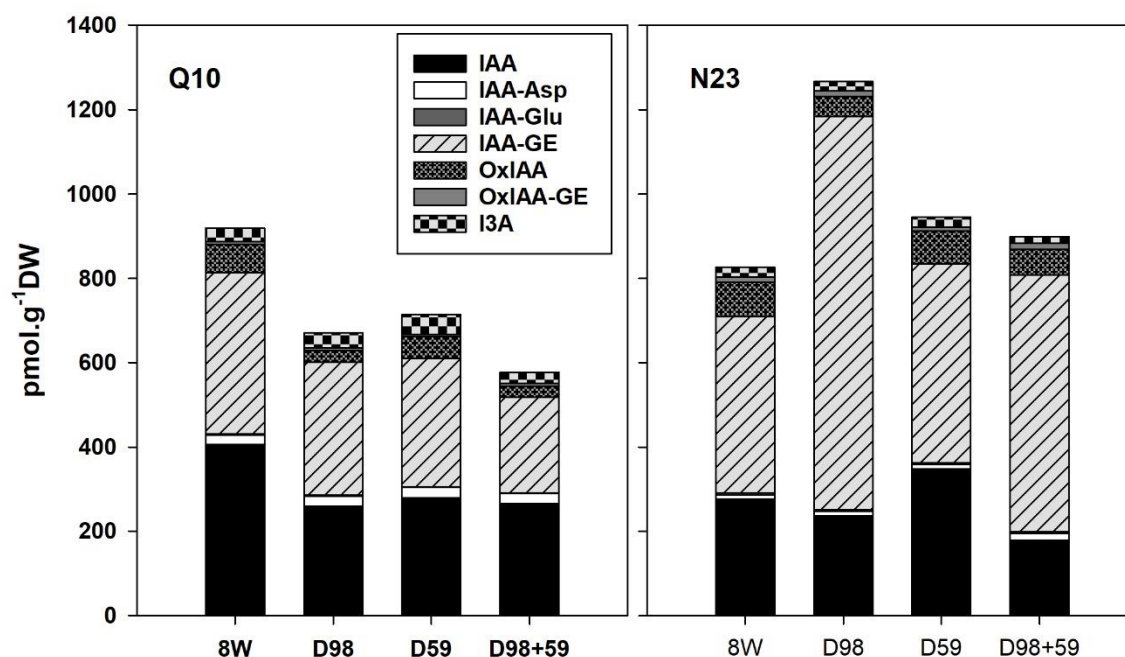
**Table IV.S2. The concentrations of phenylacetic acid (PAA) and its amide PAAM** in the hybrid larch 8 weeks-old SE (8W) of two genotypes Q10 and N23 compared to SE subjected to 1-week desiccation treatments under 98% (D98) or 59% (D59) RH or to 1-week treatment under 98% RH followed by one week under 59% RH (D98+59). Data are expressed as mean values in pmol/g DW; SD – standard deviation of at least three biological replicates; SD% - standard deviation expressed as a percentage.

Line	Desiccation (% RH)		PAA + PAAM
Q10	none	mean	2895.04 <sup>b</sup>
		SD	405.4
		SD%	14.01
	D98	mean	5953.76 <sup>ab</sup>
		SD	1640.43
		SD%	27.56
	D59	mean	11718.63 <sup>a</sup>
		SD	4069.84
		SD%	34.73
	D98+59	mean	12551.98 <sup>a</sup>
		SD	2758.03
		SD%	21.96
N23	none	mean	5096.3 <sup>b</sup>
		SD	660.55
		SD%	12.96
	D98	mean	4577.5 <sup>b</sup>
		SD	506.16
		SD%	11.06
	D59	mean	9851.47 <sup>a</sup>
		SD	3529.45
		SD%	35.83
	D98+59	mean	7220.57 <sup>ab</sup>
		SD	1182.25
		SD%	16.37

Significant differences at  $P < 0.05$  are indicated by letters (ANOVA, Tuckey). n=3-5

## Auxins

A broad spectrum of endogenous auxins, including free IAA and its amino acid conjugates (IAA-Asp, IAA-Glu), primary catabolite (OxIAA), glucose esters (IAA-GE, OxIAA-GE) and aldehyde (I3A), was detected in all experimental variants in both Q10 and N23 lines (Figure IV.13, Table IV.S3). The changes in auxin levels induced by the different treatments were not uniform in both embryogenic lines. While the mature Q10 8W SE had higher total auxin content than the desiccated embryos (regardless of the drying intensity or treatment combination), the total auxin pool in N23 SE was enhanced in all desiccated embryos. However, this genotype showed minimal differences between auxin concentrations in 8W SE and D59 or D98+59 SE.



**Figure IV.13. The concentrations of IAA and its derivatives** in the hybrid larch 8 weeks-old SE (8W) of two genotypes Q10 and N23 compared to SE subjected to 1-week desiccation treatments under 98% (D98) or 59% (D59) RH or to 1-week treatment under 98% RH followed by one week under 59% RH (D98+59).

IAA, indole-3-acetic acid; IAA-Asp, IAA-aspartate; IAA-Glu, IAA-glutamate; IAA-GE, IAA-glucosylester; OxIAA, oxo-IAA; OxIAA-GE, oxo-IAA-glucosylester; I3A, indole-3-aldehyde.

**Table IV.S3: The concentration of IAA and its derivatives** in the hybrid larch 8 weeks-old SE (8W) of two genotypes Q10 and N23 compared to SE subjected to 1-week desiccation treatments under 98% (D98) or 59% (D59) RH or to 1-week treatment under 98% RH followed by one week under 59% RH (D98+59). Data are expressed as mean values in pmol/g DW; SD – standard deviation of at least three biological replicates; SD% - standard deviation expressed as a percentage. IAA, indole-3-acetic acid; IAA-Asp, IAA-aspartate; IAA-Glu, IAA-glutamate; IAA-GE, IAA-glucosylester; OxIAA, oxo-IAA; OxIAA-GE, oxo-IAA-glucosylester; I3A, indole-3-aldehyde.

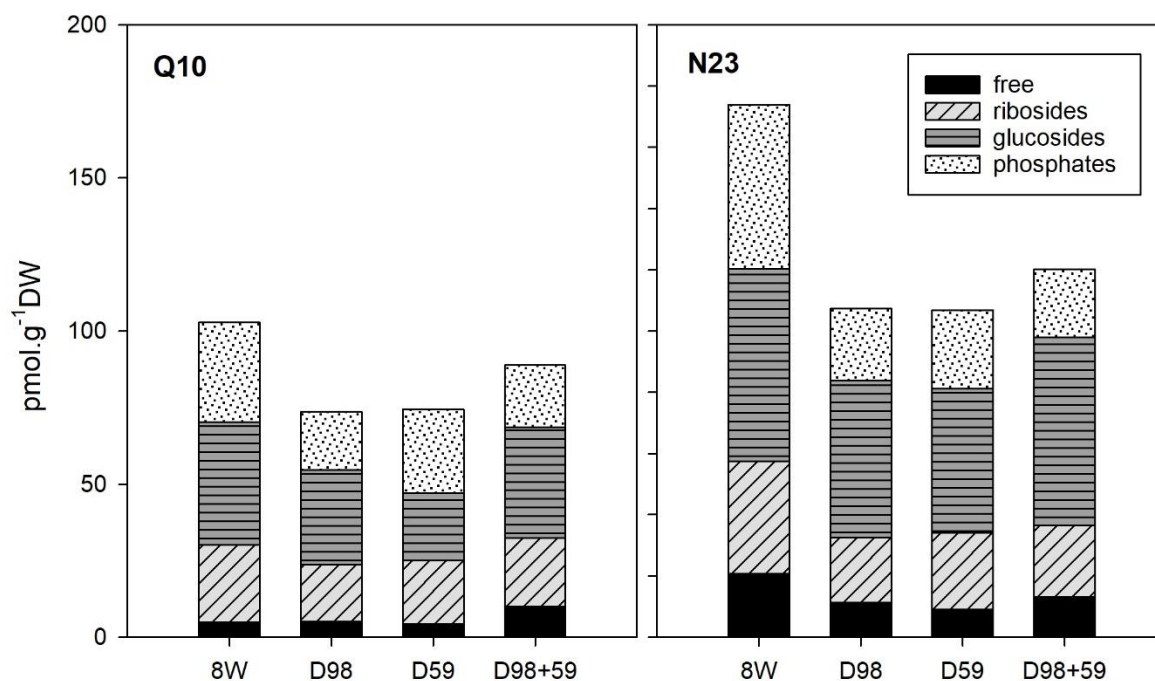
Line	Desiccation (% RH)		IAA	IAA-Asp	IAA-Glu	IAA-GE	OxIAA	OxIAA-GE	I3A
Q10	none	mean	405.43 <sup>bc</sup>	23.68 <sup>a</sup>	2.07 <sup>a</sup>	381.75 <sup>ab</sup>	67.11 <sup>b</sup>	7.68 <sup>a</sup>	31.22 <sup>a</sup>
		SD	69.46	6.37	0.57	123.12	13.44	1.95	0.99
		SD%	17.13	26.88	27.55	32.25	20.02	25.39	3.16
	D98	mean	259.24 <sup>a</sup>	23.55 <sup>a</sup>	2.16 <sup>a</sup>	316.54 <sup>ab</sup>	27.52 <sup>a</sup>	6.71 <sup>a</sup>	34.63 <sup>ab</sup>
		SD	27.84	7.15	0.14	71.36	5.07	0.93	8.71
		SD%	10.74	30.36	6.56	22.54	18.42	13.87	25.16
	D59	mean	278.6 <sup>a</sup>	24.96 <sup>a</sup>	2.26 <sup>a</sup>	304.21 <sup>ab</sup>	51.35 <sup>ab</sup>	6.14 <sup>a</sup>	47.22
		SD	37.69	8.18	0.53	78.17	15.33	1.35	12.53
		SD%	13.53	32.78	23.59	25.69	29.86	21.95	26.53
	D98+59	mean	266.29 <sup>a</sup>	23.72 <sup>a</sup>	1.6 <sup>a</sup>	226.34 <sup>a</sup>	26.84 <sup>a</sup>	6.21 <sup>a</sup>	26.46 <sup>a</sup>
		SD	43.97	4.78	0.24	44.59	2.15	0.91	1.28
		SD%	16.51	20.16	15.25	19.7	8.01	14.59	4.84
N23	none	mean	276.37 <sup>ab</sup>	9.79 <sup>a</sup>	4.85 <sup>a</sup>	418.56 <sup>a</sup>	81.64 <sup>a</sup>	11.8 <sup>a</sup>	22.98 <sup>ab</sup>
		SD	52.27	1.44	0.94	64.04	13.31	2.5	3.95
		SD%	18.91	14.74	19.45	15.3	16.3	21.2	17.2
	D98	mean	237.29 <sup>ab</sup>	10.47 <sup>a</sup>	3.52 <sup>a</sup>	932.62 <sup>bd</sup>	47.34 <sup>a</sup>	13.31 <sup>ab</sup>	21.74 <sup>ab</sup>
		SD	40	1.62	0.49	200.08	6.57	2.57	2.8
		SD%	16.86	15.47	14	21.45	13.88	19.33	12.88
	D59	mean	347.82 <sup>bc</sup>	10.27 <sup>a</sup>	4.42 <sup>a</sup>	471.51 <sup>ab</sup>	77.93 <sup>ab</sup>	9.96 <sup>a</sup>	22.69 <sup>ab</sup>
		SD	70.34	2.22	0.3	158.16	10.93	4.07	3.01
		SD%	20.22	21.57	6.79	33.54	14.02	40.85	13.27
	D98+59	mean	179.31 <sup>a</sup>	14.99 <sup>a</sup>	3.94 <sup>a</sup>	610.22 <sup>abc</sup>	60.69 <sup>a</sup>	14.02 <sup>ab</sup>	15.75 <sup>a</sup>
		SD	30.51	5.05	0.85	115.16	6.02	1.86	4.72
		SD%	17.01	33.72	21.56	18.87	9.93	13.28	29.95

Significant differences at  $P < 0.05$  are indicated by letters (ANOVA, Tuckey). n=3-5

## Cytokinins

A total of 16 CKs were detected in larch SE including three *tZ*-types (*tZR*, *tZROG*, *tZRMP*), four *DZ*-types (*DZ*, *DZR*, *DZOG*, *DZRMP*), five *cZ*-types (*cZ*, *cZR*, *cZOG*, *cZROG*, *cZRMP*), three *iP*-types (*iP*, *iPR*, *iPRMP*), and one methyl-thiolated CK, MeS-ZR. Most of the known groups of CKs were represented, i.e., bioactive forms (free bases), transport forms (ribosides), storage forms (O-glucosides), and CK phosphates, which represent the immediate biosynthetic precursors. Interestingly, no CK N-glucosides (deactivating forms of CKs) were found in SE in either of the two lines.

Detected concentrations of isoprenoid CKs were relatively low, with total CKs ranging from 73 to 103 pmol/g DW in somatic Q10 embryos and from 106 to 174 pmol/g DW in N23. Generally, the total CK content was reduced in all desiccated embryos, regardless of drying intensity or treatment combination (Figure IV.14, Table IV.S4). The differences between the responses of the embryos to the different treatments, expressed by the changes in the total concentration of CKs, were minimal. No general trends were found in the changes in the ratio between the different forms of CKs due to the different desiccation treatments. Although the CK content was lower in Q10 embryos than in N23, both lines responded similarly to the desiccation treatments.



**Figure IV.14. The total concentrations of four cytokinin groups (free bases, ribosides, glucosides and phosphates) in the hybrid larch 8 weeks-old SE (8W) of two genotypes Q10 and N23 compared to SE subjected to 1-week desiccation treatments under 98% (D98) or 59% (D59) RH or to 1-week treatment under 98% RH followed by one week under 59% RH (D98+59).**

The following isoprenoid CK derivatives were detected:

**CK free bases:** dihydrozeatin; *cis*-zeatin; *N*<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenyl) adenine

**CK ribosides:** *trans*-zeatin 9-riboside; dihydrozeatin 9-riboside; *cis*-zeatin 9-riboside; *N*<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenyl) adenosine; 2-methylthio zeatin 9-riboside

**CK glucosides:** *trans*-zeatin riboside *O*-glucoside; dihydrozeatin *O*-glucoside; *cis*-zeatin *O*-glucoside; *cis*-zeatin riboside *O*-glucoside

**CK phosphates:** *trans*-zeatin 9-riboside-5'-monophosphate; dihydrozeatin 9-riboside-5'-monophosphate; *cis*-zeatin 9-riboside-5'-monophosphate; *N*<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenyl) adenosine-5'-monophosphate

**Table IV.S4. The total concentrations of four cytokinin groups (free bases, ribosides, glucosides and phosphates) in the hybrid larch 8 weeks-old SE (8W) of two genotypes Q10 and N23 compared to SE subjected to 1-week desiccation treatments under 98% (D98) or 59% (D59) RH or to 1-week treatment under 98% RH followed by one week under 59% RH (D98+59). Data are expressed as mean values in pmol/g DW; SD – standard deviation of at least three biological replicates; SD% - standard deviation expressed as a percentage.**

The following isoprenoid CK derivatives were detected:

**CK free bases: *trans*-zeatin; dihydrozeatin; *cis*-zeatin; *N*<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenyl) adenine**

**CK ribosides: *trans*-zeatin 9-riboside; dihydrozeatin 9-riboside; *cis*-zeatin 9-riboside; *N*<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenyl) adenosine; 2-methylthio zeatin 9-riboside**

**CK glucosides: *trans*-zeatin riboside *O*-glucoside; dihydrozeatin *O*-glucoside; *cis*-zeatin *O*-glucoside; *cis*-zeatin riboside *O*-glucoside**

**CK phosphates: *trans*-zeatin 9-riboside- 5'-monophosphate; dihydrozeatin 9-riboside-5'-monophosphate; *cis*-zeatin 9-riboside-5'-monophosphate; *N*<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenyl) adeninosine-5'-monophosphate**

Line	Desiccation (% RH)		free bases	ribosides	glucosides	phosphates
Q10	none	mean	4.8 <sup>ab</sup>	25.31 <sup>a</sup>	40.14 <sup>a</sup>	32.52 <sup>a</sup>
		SD	0.67	4.28	11.47	6.23
		SD%	14.99	19.09	30.9	22.4
	D98	mean	4.99 <sup>ab</sup>	18.71 <sup>a</sup>	30.89 <sup>ab</sup>	19.06 <sup>a</sup>
		SD	0.41	2.79	5.79	1.23
		SD%	8.21	14.93	18.73	6.43
	D59	mean	4.24 <sup>a</sup>	20.86 <sup>a</sup>	21.96 <sup>b</sup>	27.33 <sup>a</sup>
		SD	0.64	4.7	6.45	8.02
		SD%	15.06	22.54	29.35	29.37
	D98+59	mean	9.96 <sup>b</sup>	22.35 <sup>a</sup>	36.3 <sup>ab</sup>	20.2 <sup>a</sup>
		SD	2.63	6.54	9.48	2.55
		SD%	26.36	29.26	26.12	12.6
N23	8W	mean	20.76 <sup>a</sup>	36.66 <sup>a</sup>	62.92 <sup>a</sup>	53.55 <sup>a</sup>
		SD	1.56	4.48	17.58	4.96
		SD%	7.51	12.22	27.94	9.26
	D98	mean	11.25 <sup>bc</sup>	21.28 <sup>b</sup>	51.33 <sup>a</sup>	23.43 <sup>b</sup>
		SD	1.94	1.72	9.31	1.7
		SD%	17.2	8.07	18.15	0.07
	D59	mean	9.05 <sup>b</sup>	25.06 <sup>b</sup>	47.06 <sup>a</sup>	25.69 <sup>b</sup>
		SD	2.83	8.02	17.73	4.66
		SD%	31.23	32	37.68	18.14
	D98+59	mean	13.25 <sup>c</sup>	23.2 <sup>b</sup>	61.52 <sup>a</sup>	22.15 <sup>b</sup>
		SD	1.43	4.47	13.09	3.36
		SD%	10.82	19.26	21.28	15.15

Significant differences at  $P < 0.05$  are indicated by letters (ANOVA, Tuckey). n=3-5

## Proteomic

To deepen the impact of desiccation on the proteome, we carried out a proteomic study of SE before (SE 8w-old) and after treatment (D59, D98 or D98+59) leading to 3 different comparisons. In order to reduce the background noise due to the genotypic factor, this study was carried out with the two lines Q10 and N23. A total of 4557 reproducible proteins were identified in the different proteomes, of which 1204 were significant ( $P < 0.05$ ) corresponding to 651 unique proteins. After selection of the proteins common to the two somatic lines, this value was then 101 significant proteins corresponding to 57 unique proteins. The detailed list of these proteins, their characteristics and the results of the statistical analyses are presented in Table IV.S5. Of these 101 proteins, 72 and 27 were upregulated in treated SE and 8-week-old SE respectively. D98+59 modified 39 proteins *versus* approximately 18 in each of the other desiccations.

Table IV.S5 also presents the biological process GO-based classification of these significant proteins, as well as the biological process keyword, called kBP, corresponding to a synthetic biological process to facilitate the proper interpretation of the results. The occurrence of these keywords by proteomic comparison is given Table IV.8. Proteins over-expressed after D98 or D59 were generally also over-expressed with D98+59. The reverse is not true, and many proteins have been observed over-expressed only with D98+59. Through their molecular functions and/or localization, these proteins participate in various kBPs. The kBP trends are then the same as when considering proteins, although with fewer differences between treatments: an increasing number of kBPs are activated with D59, D98 and D98+59 respectively whereas it is D98 which suppresses the most kBP compared to the 2 other treatments. After the application of D98, a modification of the metabolism took place revealed by the kBP "generation of precursor metabolites and energy", "small molecule metabolic process", "secondary metabolic process" with formation of new metabolic intermediates. The level of protein metabolism was not modified although we can note modifications of the "mRNA processing", of the organization of the chromosomes and of the addressing of the proteins. The metabolism is slightly modified with the activation of the synthesis of raffinose (Galactinol--sucrose galactosyltransferase) and starch (Starch synthase, chloroplastic/amyloplastic), while the degradation activity of Cell wall invertase is suppressed. After desiccation treatment, the new physiological conditions of the cells led to changes in the organization of the cytoskeleton.

D59 is the treatment that modified the SE proteome the least. However, it has important kBP "chromosome organization" by the overabundance of Histone H2A and GTP-binding nuclear protein, both involved in chromatin condensation. Furthermore, protein synthesis was activated while a protein involved in the misfolded protein elimination system was repressed. Of the significant proteins activated by desiccation, only 3 were specific to D59. Among these, one is of interest since it is known to be involved in the response to a stimulus (LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase EFR).

Most of the significant proteins modulated by the D98+59 treatment can be grouped into 3 types of biological processes: The first group is represented by the 2S seed storage protein and 11S globulin proteins, corresponding to energy reserve proteins, markers of the maturation of seeds. The 2nd group brings together proteins involved in the regulation of gene expression. This regulation was achieved by modulating the organization of chromosomes (with Histone H4) or RNA (kBP "mRNA processing" and "translation"). This regulation was also achieved by splicing the mRNA with the proteins Pre-mRNA-splicing factor SF2, Serine/arginine-rich splicing factor 4 (also overexpressed with D98) which may have an essential function during early plant

development, Putative heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 1-like, also over-expressed during D98 also associated with a response to water deprivation and the Pre-mRNA-processing factor 39 involved in post-embryonic development and over-expressed in germinating seeds and to a lesser extent in developing seeds.

The 3rd group corresponds to proteins involved in the response to stress, whether biotic or abiotic. It is in this group that we find, among other proteins, the over-expression of a Heat shock protein 70 involved in the folding of proteins during stress. Only the D59 treatment also over-expressed proteins associated with the “response to biotic stimulus” kBP. This character of cellular defense was often oriented towards fungi (Class IV chitinase over-expressed during D59 and D98+59, Ubiquitin-associated/TS-N domain protein, putative over-expressed only during D98). Two enzymes involved in carbohydrate metabolism, for the synthesis of starch and raffinose, were activated during D98+59 as during D98. Desiccation tolerance is one of the biological processes associated with raffinose synthesis enzymes.

Only 19 proteins were under-expressed after the desiccation treatments, of which only 1 was common to the 3 treatments. It is Glycosyltransferase, a protein involved in a metabolic node between several pathways. It was accompanied by under-expression of other proteins involved in metabolic kBP: “Small molecule metabolic process”, “Protein metabolic process”, “Lipid metabolic process”, “Carbohydrate metabolic process”. The other major type of proteins under-expressed by desiccation were associated with embryo development (kBP “Cell growth”, “Cell cycle”, “Embryo development”, “Fruit ripening”). A unique late embryogenesis abundant protein (LEA), the Late embryogenesis abundant protein D-29, was observed in this study, under-expressed during D98+59.

Some of the biological processes modified by the treatments applied to SE are known to participate in a response to environmental changes orchestrated by phytohormones. Thus, ABA modulates the synthesis of the observed proteins Hydroxymethylpyrimidine phosphate synthase and Histone H1, and jasmonate that of the protein 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase. The RNA-binding KH domain-containing protein RCF3 is known to participate in the defense response orchestrated by jasmonate.



**Table IV.8.** Biological process keyword occurrence in relation to the desiccation treatment applied to 8 weeks-old SE. Up and down correspond to over- and under expression in the traited SE, by the desiccation treatment either 98 (D98), 59% (D59) or 98% and then 59% (D98+59) RH or in comparison to 8 weeks-old SE.

Biological process keywords (kBP)	up			down		
	D98	D59	D98+59	D98	D59	D98+59
anatomical structure development	1		1			
carbohydrate metabolic process	2		2	1		
cell cycle						1
cell death			1			
cell growth				1		
cell wall organization		1				
chromosome organization	1	4	6			
cytoskeleton organization	2					
desiccation tolerance	1		1			
embryo development					1	1
lipid metabolic process				2		1
mRNA processing	3	3	5			
mRNA processing;post-embryonic development			1			
protein catabolic process					1	
protein metabolic process		1		1	2	
protein modification process					1	
protein targeting	2					
regulation of gene expression			1			
regulation of macromolecule metabolic process		1	1			
response to abiotic stress				1		
response to biotic stimulus		3	3	1		
response to stress;protein folding			1			1
rna metabolic process	1		3			
secondary metabolic process	1		2			
seed development						1
seed maturation			2			
small molecule metabolic process	3			4	2	3
translation	1	2	9			
transport				1		

## Discussion

### **Desiccation under different percentage of RH reduce the level of water content and affect germination and plant conversion in hybrid larch SE.**

Eight weeks-old SE showed a water content equivalent to that of the fresh ZE (1 g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> DW) which remained however higher than that of the dried ZE (0.1 g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> DW for dried ZE). As for many conifer species, the water content at the end of SE maturation remains high since SE do not undergo desiccation. Similar results were observed for hybrid larch (*Larix x marschlinsii*) (Lelu et al., 1995), wester larch (Dumont-Béboux et al., 1996), loblolly pine (Pullman et al., 2003) and maritime pine (Morel et al., 2014). However, compared to these species water content of our SE was relatively lower. This difference could be explained by the high gelling agent concentration of our maturation medium which reduces water availability to the SE (Klimaszewska et al., 2000) and consequently leads to a decrease in their water content (Teyssier et al., 2011). D98 led to a decrease of their water content to 0.7 g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> DW while under D59 it reached that of the dried ZE i.e. 0.2 g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> DW. Our results are similar to those previously reported by Dronne et al., (1997) for another hybrid larch (*Larix x marschlinsii*). This shows the adaptability of this desiccation method to another specie and to SE obtained under different maturation conditions.

In conifers, many studies have reported a positive effect of desiccation on SE germination and conversion to plant (Roberts et al. 1990; Lelu et al., 1995 ; Hogberg et al. 2001; Pond et al. 2002; Szczygieł et al. 2007; Maruyama and Hosoi 2012). In general, desiccation has been realised under high RH like >95% for interior spruce (Roberts et al 1990), 95-97% for Norway spruce and silver fir (Szczygieł et al.,2007) and 98% for three Japanese pines (Maruyama and Hosoi 2012). This resulted in an improvement in the germination frequency up to 95% for interior spruce (Roberts et al 1990). After desiccation, germination frequency reached 80% and 69-79% for Norway spruce and silver fir respectively (Szczygieł et al., 2007). For Japanese pines, germination increased from 19 to 81% while the conversion rate rose from 15 to 77% (Maruyama and Hosoi 2012). In our case, D98 resulted in 97-100% of germination. In addition, germination is synchronized (100% germinated SE after 7 days) resulting in homogenous SE development. These results stressed the beneficial effect of a desiccation under high RH on SE germination.

Since D59 permitted the reduction of the water content to that of dried ZE, we investigated the effect of the treatment on SE biological characteristics. For carrot SE, desiccation under 30% RH and 13% RH improved the germination which reached 49% and 40% respectively (Tetteroo et al., 1995). For many conifer species such as interior spruce, Norway spruce and Siberian spruce desiccation carried out under around 80% RH proved to be detrimental to SE germination (Roberts et al., 1990; Hazubaska-Przybył et al., 2015). This suggests that SE of different species and lines respond in different ways to desiccation which could be benefit or detrimental depending on the RH of the treatments. In our case, after D59, the germination was reduced compared to 8W SE but remained high (75% of germination for desiccated SE and 100% for 8W SE) for the embryogenic line Q10. For line N23, D59 did not have any effect on SE germination capacity. The different behavior regarding the germination of the line N23 compared to the line Q10 suggest that N23 is less sensitive to the effects of desiccation. This could be explained by the difference in the anatomical arrangement and/or localization of storage compounds we observed between Q10 and N23. According to our histological analyses, embryonal root cap (ERC) is more developed in 8W SE from line N23 than from Q10. The function of ERC is to protect the root apical

meristem by developing continuously and by secreting mucigel to help root penetration into the soil (Tillman-Sutela and Kauppi, 2000). Thus, a bigger ERC size could better protect the root apical meristem of SE by preventing important damages caused by water loss. This therefore resulting in no change of the germination capacity after desiccation. Conversion to plant seemed also to be affected since for some of dried-SE we observed the absence of the plant aerial part. The rapidity of water loss is a crucial factor responsible for the decrease of embryo viability (Tetteroo et al., 1995). In hybrid larch (*Larix x marschlinsi*), a desiccation under 59% RH led to a drastic decrease of the water content within 16h (Dronne et al., 1997). As a consequence, this rapid water loss could damage the shoot apical meristem resulting in an unsuccessful conversion to plant. It is also possible that the shoot apical meristem entered a dormant or a quiescent state as a result of the desiccation. The dormant and quiescent state of the shoot apical meristem is implemented particularly when cells are desiccated (van der Schoot and Rinne, 2011). All together, these results showed that desiccation under reduce RH leading to fast and drastic desiccation can lower the germination capacity and the conversion to plants of hybrid larch SE as it is the case for many other conifer species.

Improvement of fast desiccation tolerance following the prior application of a desiccation under high RH was previously reported in carrot and black spruce SE (Tetteroo et al., 1995; Bomal et al., 2002). In order to improve the germination capacity of SE subjected to D59, we studied the effect of a successive desiccation under 98% RH followed by desiccation under 59% RH. For both lines, when D98+59 was applied the final germination rates (95%) and the numbers of plant regenerated (82-91%) were not significantly different from the control and from dried D98 SE. For N23 D98+59 significantly improved plant conversion compared to D59 SE (from 54 to 82%). Applying a slow drying first could be enough to allow SE to overcome then fast and drastic desiccation which alone negatively affected both germination and conversion to plant. During slow desiccation biochemical modifications must occur to allow SE to sustain drastic water loss. Our results of germination agree with those previously obtained for carrot and black spruce SE.

### **Desiccation of hybrid larch SE triggers desiccation tolerance by inducing changes in carbohydrate profile**

We studied the effect of desiccation on carbohydrate profile of SE to light the modifications occurring.

Compared to 8W SE, D98 mainly led to a decrease in starch content, accumulation of sucrose for Q10 and N23, accumulation of raffinose content but only for N23 SE. These modifications in carbohydrate profile were previously reported in black spruce for SE desiccated under 97% RH (Bomal et al., 2002) and were correlated to desiccation tolerance. In Norway spruce after a 3 weeks slow desiccation treatment SE accumulated RFO i.e. raffinose and stachyose (Konrádová et al., 2003). Many studies have indicated that RFOs are closely linked to the desiccation tolerance resulting in higher survival rate after desiccation under reduce RH and improved germination (Bomal et al. (2002); Lipávká et al., 2004; Businge et al., 2013). Bomal et al. (2002) stated that increasing sucrose content alone did not improve desiccation tolerance, but when associated with raffinose accumulation, it did. In hybrid larch, even if the raffinose content did not increase, the desiccated SE showed improved germination. Therefore, the decrease in starch content, sucrose accumulation and the small raffinose content in hybrid larch SE appear to be sufficient, at least partially, to establish desiccation tolerance.

In ZE obtained from mature dried seeds of *Piceas abies* and *Pinus pinaster*, high RFO accumulation is observed (Gösslová et al., 2001; Morel et al., 2014b). Although the germination capacity of hybrid larch SE is not affected by the absence of RFO accumulation, this later could impact further developmental processes. Indeed, SE with biochemical characteristics different from those of ZE could give somatic plants that are not equivalent to plant obtained from seedlings in terms of growth, architecture or wood properties.

According to histological analyses, starch accumulated preferentially in the hypocotyl cortex and the root cap pericolumn cells of SE as observed in our results and as reported by Gutmann et al. (1996) and von Aderkas et al. (2002). The ERC is known to play an important role in the storage of proteins, lipids, and starch that will be mobilized during germination of white spruce and larch embryos according to Yeung et al. (1998) and von Aderkas et al. (2002). The ERC is of major importance since SE does not dispose of big reserves unlike ZE. In fact, SE is solely dependent on the reserves provided within organs (cotyledons, hypocotyl) of the SE itself and the culture medium. The breakdown products of starch can notably provide the energy for the developmental process since starch is considered as a readily available energy source (Yeung et al., 1998). Because N23 SE accumulate more starch around the ERC whereas starch grains are distributed throughout the embryo and in less quantity for line Q10, it is possible that this difference in starch distribution and abundance could influence the root growth resulting in a difference of germination capacity between the two lines.

The decrease in starch content, which was also observed in histological analyses, could contribute to desiccation tolerance by providing glucose necessary for the synthesis of sucrose as previously observed in the seeds of *Brassica campestris* (Leprince et al. 1990). Nevertheless, the increase in sucrose content could also be the result of other modifications triggered by desiccation such as the mobilization of lipids (Graham 2008). Increase in sucrose content contributes to desiccation tolerance. The protective action of sucrose has been attributed to its capacity to stabilize proteins and membranes (Crowe et al., 1992; Hoekstra et al., 2001b).

Black spruce SE subjected to fast desiccation did not show any changes of carbohydrate content (Bomal et al., 2002). In our case, desiccation under 59% RH had no effect on starch content and neither on soluble carbohydrates profile. Hybrid larch SE after desiccation under 59% RH underwent significant water loss reaching a level equivalent to that of ZE collected from dried seeds. At this water content, it could be possible that SE undergo a slow down or an arrest of the metabolism. Water serves as a medium for the transport of essential compounds throughout the embryo. Reduced water content can hinder the movement of these compounds resulting in a slow-down or an arrest of the metabolism. As many enzymatic reactions depend on water (Ballesteros et al., 2020), reduced water content can impact the activity of enzymes, disrupting metabolic pathways functioning. In consequence it could be also possible that SE enters a quiescent state that refers to an inactivity in its development (Marescal and Cheeseman, 2020). In many orthodox seeds, quiescent state typically occurs during seed development (Yulianti et al., 2020) leading to the temporary suspension of metabolic processes in the embryo (El-Maarouf-Bouteau, 2022). When a seed is fully mature, the embryo enters the quiescent state by slowing down its metabolic activities and growth processes and by conserving energy and resources. These mechanisms notably prevent precocious germination.

In D98+59 SE, the starch content and the soluble carbohydrates profile were equivalent to that of D98 SE. Reductions of starch accompanied by an increase of

sucrose content during the first step of the desiccation treatment seem to help SE to sustain severe desiccation. Lipavská et al., (2004) stated that initial slow desiccation leads to partial water loss, which is thought to be a signal setting up the events by which desiccation tolerance (including tolerance to subsequent fast desiccation) is established. According to Bomal et al. (2002), partial water loss was coupled with changes of carbohydrate metabolism resulting in a decrease of starch content, sucrose accumulation, and raffinose synthesis. Our results are partially in accordance with Bomal et al. (2002) observations. These changes in the carbohydrate profile of hybrid larch SE i.e. decrease in starch content and accumulation of sucrose could contribute to the high percentage of germination after D59.

Although we were able to induce biochemical modifications thanks to D98 i.e. decrease in starch content and increase in sucrose content, we did not fulfill to approach the biochemical characteristics of ZE in terms of RFO content. Nonetheless, D98 seems to permit SE to tolerate more the low water availability by lowering the negative effect of D59 on SE germination.

### **Modifications of phytohormone profile**

The responses of Q10 and N23 embryos to desiccation treatments were very similar, although the total phytohormone content in Q10 and N23 differed. The observed differences can be attributed to genotypic specificity. This highlights the implication of mild desiccation on the subsequent somatic embryo development. More intense drying leads to stress, as demonstrated in Norway spruce during desiccation at higher temperature (Fischerová et al., 2022) and in larch at 4°C in this study.

Our results, in accordance with a number of literature data, emphasize the important role of ABA in somatic embryo development. ABA is required as a substance that can stop the proliferation of embryogenic culture and initiate the maturation process of SE (Label and Lelu, 2000; Von Arnold et al., 2002). In orthodox seeds, ABA promotes the accumulation of storage reserves and the acquisition of desiccation tolerance during seed ripening (Finkelstein et al., 2002; Kagaya et al., 2005; Kalemba et al., 2009), and this role is supposed to play also during the maturation of SE (Eliášová et al., 2022; Von Aderkas et al., 2002). A high content of ABA in orthodox seeds is also essential for maintaining dormancy during the winter season, and a decrease in the content of ABA is a prerequisite for dormancy breaking and seed germination in spring (Hilhorst et al., 2010; Koornneef et al., 2002; Vondráková et al., 2020). The primary role of desiccation is to prepare somatic embryos for germination. Reducing ABA content in embryos could be one of the most important benefits of desiccation treatment for successful rooting. Nevertheless, drying (and chilling) is also a significant stress factor. From both points of view, ABA, which is known as a stress hormone (Parwez et al., 2022; Pashkovskiy et al., 2022), and an inhibitor of plant rooting (Luo et al., 2022; Zhang et al., 2010), and its metabolites, which maintain ABA homeostasis, are important hormonal players acting during desiccation. Mature embryos contain a high concentration of ABA obtained from the maturation medium. However, a low level of ABA in embryos is essential for optimal root development. According to our results, only mild desiccation of larch SE can lead to a sharp decrease in the concentration of ABA. The decline of ABA level in Norway spruce SE has been described previously (Eliášová et al., 2022; Vondrakova et al., 2018). In Norway spruce SE kept under conditions of 23°C, the decrease in ABA content started at the end of maturation and continued during three weeks of mild desiccation. The changes in the content of ABA-types were mainly caused by the changes in the concentration of free ABA, and the main components of ABA-types were DPA, which decreased primarily during

maturation, and ABA-GE, the potential storage form of ABA. In larch SE desiccated under lower temperature, the level of ABA-GE was relatively fixed, and all changes were caused primarily by ABA.

Intense desiccation did not lead to a decrease in ABA-types as mild desiccation. The level of ABA-types in embryos at low RH was even higher than in mature embryos – i.e., an opposite effect was observed in embryos treated with mild and intense desiccation. In Q10 SE, the main reason for the difference between the effects of the different desiccation treatments is the change in the free ABA level. The other discovered derivatives of ABA - PA, DPA, and 9-OH ABA – do not appear to be crucially involved in response to desiccation. However, some differences in their levels were observed depending on the treatment. Thus, we can assume that the dominant stress effect was pronounced mainly by an increase in free ABA. In N23 SE, free ABA contributed less to the overall increase in ABA-types after intense desiccation. We can speculate that this is due to the different dynamics of ABA metabolism in the two genotypes. Previously, a transient increase in ABA was observed during the first 24 h of both mild and intense desiccation (Dronne et al., 1997). The subsequent decrease in free ABA could be slowed down differently in the two genotypes by intense drying. A combined treatment, i.e., D98+59, resulted in a comparable decrease in the content of ABA and its metabolites as mild desiccation itself. Thus, embryos were acclimated to intense desiccation during the first week of mild desiccation, and the stress response was not evident at the ABA-types level.

Stress conditions during desiccation may also alter factors other than ABA-types, i.e., phenolics. Analyses of the content of PAA, a non-indole phenolic compound with weak auxin activity, and its amide PAAM can provide information on stress intensity. The increase in these compounds observed after intense drying is consistent with the assumption of a stress response. However, the effect of combined treatment, in contrast to the changes in ABA-types, was comparable to the impact of intense drying itself.

Desiccation treatments had no appreciable effect on auxin and cytokinin concentrations in embryos. The correlation between auxin concentrations and desiccation treatments was not linear. A broad spectrum of endogenous indole auxins was found; however, the ratio between the content of IAA and its derivatives remained approximately the same in SE of both lines after all treatments. The phytohormone auxin plays a central role in plant development, and its cellular homeostasis is tightly regulated at the biosynthetic level and by its inactivation. In *Arabidopsis* or tobacco, IAA is conjugated to IAA-amino acid conjugates (preferentially IAA-Asp and IAA-Glu) or glucose conjugates (IAA-GE), all of which can be reverted to free IAA. Conjugates can be further inactivated by oxidation to oxIAA-Asp/oxIAA-Glu or oxIAA-GE. The final inactivation product is oxIAA (Hayashi et al., 2021; Müller et al., 2021). It has been shown that oxidation of IAA-amino acid conjugates in seedlings of Norway spruce, Scots pine, and lodgepole pine is a minor metabolic route and that the conjugative pathways contribute much more to IAA homeostasis (Brunoni et al., 2020; Brunoni et al., 2023). It is worth noting that among all detected metabolites, IAA-GE was the most abundant IAA derivative in larch SE and that oxIAA was more abundant than IAA-Asp or IAA-Glu.

Cytokinins play an essential role in the initiation and progression of embryogenic cultures, as evidenced by the need for the exogenous addition of CKs to the media during the induction of somatic embryogenesis and subsequent proliferation of conifers. During maturation, exogenous CKs are not essential. However, a broad spectrum of endogenous CKs was found in 8 weeks-old SE and SE subjected to

desiccation treatments. The total CK pool did not change significantly under the different desiccation conditions compared to 8 weeks-old SE. The same results were obtained for the free bases (i.e., bioactive cytokinins) and other CK forms. The storage CK forms, O-glucosides, are the most abundant group of CKs in the larch embryos studied, which is consistent with our previous data from Norway spruce SE (Vondráková et al. 2018), as is the observed absence of the CK deactivating forms, the N-glucosides.

According to the data obtained in Norway spruce embryos (Vondráková et al. 2018), the vital role of auxins and CKs can be predicted later during embling growth and development.

### **Desiccated SE showed differential regulation of protein expression depending on the treatment RH**

The comparison of the different proteomes of desiccated SE showed notable variations in the number of proteins showing differential accumulation and in the number and type of kBP induced, depending on the RH of desiccation. This difference in the proteome supports the differential effect of the 3 desiccation treatments at the biochemical and hormonal level. D98 and D98+59 SE showed many similarities in terms of associated kBP whether up or down regulated. It is unsurprising since these treatments shared both the same D98 treatment. Nevertheless, the adding of a D59 right after D98 resulted in the activation of supplementary kBP. D59 SE shared very few common kBP with the other two desiccation treatments and low number of up-regulated proteins. This suggests that D59 SE metabolism was oriented toward other functions compared to D98 or D98+59 SE and indicated lower metabolic activity. This latter could be the result of the low water content leading to a quiescent state and a temporary suspension of metabolic processes and enzymatic reactions in the embryos (Ball, 2008 ; El-Maarouf-Bouteau, 2022). This hypothesis is supported by the absence of modifications in biochemical composition of D59 SE and the proximity of hormones profiles between D59 SE and non-desiccated SE. Nevertheless, the activation of kBP associated to “response to biotic stimulus”, “cell wall organization” and “chromosomes organization” suggest that before the embryo slowed down its metabolic activities, the decrease of the water content was perceived. In D59 SE the kBP associated to the “response to biotic stimulus”, notably for a Chitinase were amplified. Desiccation under reduce RH undoubtedly led to parietal damage since “cell wall organization” kBP was up-regulated. Thus, it could be possible that this damage is perceived as a pathogen attack by our SE, resulting in induction of pathogen defense i.e. induction of Chitinase (Vaghela et al., 2022). Chitinase overexpression could as well be the result in osmotic pressure which can be triggered by desiccation (Vaghela et al., 2022). In other hand, cell wall modification is also a crucial aspect in the response to desiccation to overcome cell shrinkage which has negative effects on cellular structure and function. The cell wall, composed of complex carbohydrates and structural proteins, undergoes modifications to enhance its protective function during desiccation (Walters et al., 2007). As the water content decreases, the cell wall amplifies its rigidity and strengthens. This reinforcement notably helps prevent cells collapsing (Chen et al., 2020). D59 SE showed specifically amplification of secondary metabolic process. This could be associated to the synthesis of lignin and/or suberin since this drastic and fast desiccation led to modification of cells structure as we saw in our histological analyses. As products of secondary metabolism, lignin and suberin, which are hydrophobic polymers, can be deposit in the cell wall. Lignin provides additional strength and resistance to mechanical stress while suberin acts as a barrier to prevent water loss

(Graça 2015; Liu et al., 2018). Furthermore, the modification of chromosome organization is a common process during seed desiccation (Sano et al., 2022). In seed, the low water content induces cellular and nuclear shrinkage resulting in a reorganization of the chromatin (van Zanten et al., 2012). Moreover, the structural arrangement of chromatin involves modification that impact gene expression levels and overall cellular activity (Bhadouriya et al., 2021). As water content decreases, chromatin undergoes structural changes making inaccessible certain regions resulting in the repression of genes expression. The modulation of chromatin organization is therefore of great importance for the regulation of gene expression and for successful protection of genetic material in reduced water availability environment (Sano et al., 2022).

Since D98 SE shared common expressed-BP with D98+59 SE and that conclusions obtained from D98 and D98+59 treatments were similar, we decided to focus our discussion more on D98+59 treatment. In D98+59 SE up-regulated kBP were mainly “translation”, “mRNA processing” and “organization of chromosomes”. These 3 kBP could be associated to genetic reprogramming and a metabolic shift toward SE preparation for germination (Wang et al., 2015). It is possible that D98+59 triggered the up-regulation of these kBP in order to make the cellular machinery available and ready when germination begins. Moreover, the up-regulation of the proteins Starch synthase, 11S globulin and 2S seed storage protein (an albumin) supported the metabolic shift in D98+59 SE toward preparation to germination. In seeds and SE, storage proteins serve as significant sources of nitrogen and carbon, supplying essential nutrients for subsequent germination and initial growth of plants. Among the storage proteins of conifers, globulin and albumin represent the major types of storage forms (Hakman 1993; Teyssier et al., 2011; Morel et al., 2014b). The synthesis of these proteins undoubtedly begins before desiccation as showed in maritime pine and hybrid larch SE (Teyssier et al., 2014; Morel et al., 2014b).

As we saw in our results, D98 and D98+59 SE presented an increase in sucrose content but no significant RFO accumulation. However, surprisingly, the analysis of the proteome showed that Galactinol-sucrose galactosyltransferase is overexpressed in D98 and D98+59 SE. This enzyme catalyzes the chemical reaction resulting in the production of myo-inositol and raffinose (Sengupta et al., 2015). Raffinose are implicated in desiccation tolerance and helps embryo to overcome damages triggered by water loss through various mechanisms (Hoekstra et al., 2001b ; Obendorf and Górecki 2012; Navarro et al., 2017). Some specific proteins also contribute to the protection of cellular structures and to the maintaining of essential metabolic activities during embryo desiccation. In the proteome of D98+59 SE LEA and HSP70 appeared but were down regulated when the proteome was compared to the one associated to non-desiccated SE. This could be explained since the maximum level of whether LEA and HSP is at the end of embryogenesis prior to desiccation. This has been shown for *Arabidopsis thaliana* in which LEA and HSP are highly synthesized during seed development, as a part of the embryogenesis (Wehmeyer et al., 1996; Wehmeyer and Vierling 2000; Kalemba and Pukacka 2007).

To summarize, desiccation triggered various mechanisms allowing the functional reprogramming of SE metabolism toward germination process and response to stress. Depending on the desiccation treatment, SE responded in different ways. The treatment can be beneficial or detrimental depending on the RH. D98 and D98+59 shared very similar kBP and seem to be beneficial since it triggered SE preparation to germination and mechanisms allowing SE to overcome desiccation-induced stress. This was particularly improved in D98+59 SE. In contrary, desiccation under 59% RH



seemed to be detrimental since it was perceived as pathogen attack or as signal transmitted by parietal damage. Thus, the kBP activated were more oriented toward the protection of SE and less disposed to the preparation for further germination.

---

### **Conclusions**

This work revealed that SE characteristics were modified during their desiccation depending on its RH. D98 SE showed biochemical and molecular changes i.e. decrease of ABA, starch reduction, sucrose synthesis and up-regulation of specific biological processes, but with a water content equivalent to fresh ZE. D59 led to a reduced water content in SE equivalent to dried ZE. However, this resulted in reduced SE germination and did not trigger any other beneficial biochemical modifications on all levels studied. D59 was perceived as a harmful signal triggering undesired down-regulation of carbohydrate metabolism and up-regulation of response to abiotic stress. The modifications observed in D98+59 SE, were very similar to those occurring in D98 SE. We suggest that the progressive desiccation obtained by D98+59 benefits SE tolerance to desiccation under reduce RH and germination. As well this treatment not only contributes to successful SE germination and conversion to plant but could also be considered as a potential method of SE storage. To complete the characterization of desiccated SE, this study should be completed with further *ex vitro* experiments demonstrating somatic plants behavior in field.

Table IV.S5. Characteristics of differentially expressed proteins in hybrid larch SE proteomic study comparing the impact of the desiccation treatments (D98, D59 or D98+59) on 8 weeks-old SE to the absence of treatment. a: The protein accession numbers and assignments were retrieved from *Larix siberica* assemblage data base. b: *link should be given*. c: an empty cell corresponds to the absence of attributed biological process. d: biological processes keywords (kBP) corresponding to a synthetic biological process. e: identify the statistically significant proteins common to the both cell lines N23 et Q10. f: the abundance is considered up or down with reference to the abundance ratio of desiccated/untreated proteomes.

Accession <sup>a</sup>	Uniprot	Assignment <sup>a</sup>	Pathway <sup>b</sup>	kBP <sup>d</sup>	N23-Q10 common <sup>e</sup>	D59 N23 <sup>f</sup>	D59 Q10 <sup>f</sup>	D98 N23 <sup>f</sup>	D98 Q10 <sup>f</sup>	D98+59 N23 <sup>f</sup>	D98+59 Q10 <sup>f</sup>
LS_100214- 0.1-mRNA-1	Q43125	Cryptochrome 1				2.572			0.612	2.244	
LS_10023- 0.6-mRNA-1	Q9FNX5	Phragmoplastin DRP1E		cell organization or biogenesis		0.359			1.964		
LS_100951- 0.1-mRNA-1	A7QEU4	Peroxidase					0.639		0.592		0.448
LS_101080- 0.0-mRNA-1	F4JIR8	Short-chain dehydrogenase, putative					0.599				
LS_10138- 0.3-mRNA-1	PODKK7	60S ribosomal protein L7a		translation			1.788		1.524		1.926
LS_101532- 0.0-mRNA-1	P49237	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase	Glycan metabolism	seed maturation			0.673		0.556		0.501
LS_10175- 0.3-mRNA-1	Q9C5Q8	HEN1		rna metabolic process	common		1.666	1.826		1.966	1.809
LS_101845- 0.1-mRNA-1	Q5VQ78	Coatomer subunit beta							0.642		

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_101925-0.0-mRNA-1	Q9LKA4	Nucleotide-binding, alpha-beta plait	cell death	common	1.385	1.281
LS_102538-0.0-mRNA-1	Q8S628	ATP-binding cassette transporter			1.708	
LS_10312-0.2-mRNA-1	Q9SAK4	Aldehyde dehydrogenase	Amine and polyamine biosynthesis;Amino-acid degradation		2.344	
LS_103635-0.1-mRNA-1	Q9SZA7	Probable disease resistance protein At4g33300			0.636	1.429
LS_104027-0.1-mRNA-1	Q9SVE7	Multidrug and toxic compound extrusion protein			0.438	
LS_10437-0.1-mRNA-1	Q42885	5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate phospholyase	Metabolic biosynthesis	intermediate		0.445
LS_104568-0.2-mRNA-1	F4KBW6	BnaA07g12820D protein			1.777	

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_104735-0.2-mRNA-1	Q9M571	Phosphoethanolamine N-methyltransferase 3	Phospholipid metabolism		0.688	0.697	
LS_10501-0.7-mRNA-1	P0C5C9	Peroxioredoxin-6					1.389
LS_10506-0.0-mRNA-1	P00303	Basic blue protein					2.27
LS_106091-0.3-mRNA-1	Q9FHW7	SKP1-like protein 1B	Protein modification	embryo development		0.693	
LS_106892-0.1-mRNA-1	Q9FIK2	Nuclear inhibitor of protein phosphatase 1					1.686
LS_107222-0.3-mRNA-1	Q9SIP7	40S ribosomal protein S3			2.16	0.588	
LS_1078-0.0-mRNA-1	Q9M5L0	60S ribosomal protein L35			1.559		1.607
LS_108358-0.1-mRNA-1	Q5YLB5	DNA gyrase subunit A, chloroplastic/mitochondrial				1.683	
LS_108863-0.1-mRNA-1	Q9Y263	Phospholipase A-2-activating protein					1.753
LS_109562-0.0-mRNA-1	Q5MAU8	Purple acid phosphatase			0.524	0.63	0.521
LS_109563-0.1-mRNA-1	P80553	Histone H3.3			1.5		1.38

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_109673-0.4-mRNA-1	P34106	Alanine transaminase	Amino-acid degradation;Glycan metabolism;Photosynthesis						0.457
LS_10979-0.1-mRNA-1	O82647	Pyruvate decarboxylase 1	Carbohydrate metabolism	small molecule metabolic process	common			0.483	0.475
LS_110264-0.2-mRNA-1	Q6ZLK0	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase	Protein modification	protein modification process				1.384	
LS_110314-0.3-mRNA-1	Q6K4N0	Arginine/serine-rich splicing factor transcript II	RSZ23					2.293	
LS_110604-0.1-mRNA-1	O81826	Histone H2A		chromosome organization	common	2.164		0.652	1.547
LS_11210-0.0-mRNA-1	P48809	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 27C						0.615	
LS_112385-0.1-mRNA-1	O82143	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4		protein catabolic process		2.339			

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_1137-0.4-mRNA-1	O04350	Tubulin-folding cofactor A								0.498	
LS_11500-0.1-mRNA-1	P26792	Beta-fructofuranosidase, isoenzyme 1	insoluble	Glycan biosynthesis						0.718	0.637
LS_11548-0.1-mRNA-1	Q9SR13	Flowering locus K homology domain			anatomical structure development	common	1.662	1.573	2.489	1.699	2.02
LS_11548-0.5-mRNA-1	Q9SR13	K Homology domain-containing protein			regulation of gene expression	common			2.131	1.418	1.633
LS_11739-0.0-mRNA-1	F4KHD8	Nuclear pore complex protein GP210								1.403	
LS_119392-0.1-mRNA-1	Q9F234	Alpha-glucosidase 2					0.577		0.505		
LS_11944-0.1-mRNA-1	Q8W4B1	RNA-binding KH domain-containing protein RCF3			response to biotic stimulus	common	3.696			2.955	1.901
LS_120955-0.0-mRNA-1	O22860	60S ribosomal protein L38			translation						2.022
LS_126700-0.2-mRNA-1	F4IS91	Protein SHORT ROOT IN SALT MEDIUM 1					2.091		2.182		

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_127105-0.1-mRNA-1	P49292	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	Carbohydrate biosynthesis	carbohydrate metabolic process		0.722				0.643
LS_127249-0.1-mRNA-1	Q8RWM2	Nicotinate phosphoribosyltransferase	Cofactor biosynthesis	small molecule metabolic process		2.826	0.491	2.541		2.932
LS_127437-0.1-mRNA-1	Q9M069	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, putative							0.588	0.468
LS_13120-0.1-mRNA-1	Q9U7D0	Histone H4		chromosome organization	common				0.498	1.419
LS_133102-0.1-mRNA-1	P93680	Class IV chitinase		response to biotic stimulus	common				1.405	
LS_13453-0.1-mRNA-1	Q179T2	Exonuclease mut-7 homolog		regulation of macromolecule metabolic process	common	2.627	1.836			1.952 1.988
LS_135049-0.1-mRNA-1	A3C6D7	Actin		cytoskeleton organization	common					1.977
LS_135196-0.2-mRNA-1	P74391	DNA repair protein RadA							0.547	
LS_13524-0.0-mRNA-1	Q0JNR2	Cysteine proteinase inhibitor							0.544	0.54
LS_137240-0.0-mRNA-1	O04203	Phi class glutathione S-transferase							0.679	

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_13807-0.4-mRNA-1	Q9LX74	Exosome complex exonuclease homolog	RRP46		0.497	0.59	0.525	
LS_13870-0.4-mRNA-1	Q9LLC1	Biotin carboxyl carrier protein subunit		Lipid metabolism	lipid metabolic process	0.605	0.67	1.342
LS_14164-0.3-mRNA-1	P46101	Dipeptidyl aminopeptidase-like protein 6				0.742	0.63	0.599
LS_14646-0.3-mRNA-1	Q17963	Angio-associated migratory cell protein				2.784		
LS_14760-0.0-mRNA-1	Q8GYB8	12-oxophytodienoate reductase 1		Lipid metabolism		0.737	1.492	
LS_14847-0.0-mRNA-1	B2RX12	Predicted protein					0.36	
LS_14927-0.2-mRNA-1	F1BVB6	Reticuline oxidase-like protein				1.533	2.136	
LS_1493-0.2-mRNA-1	Q9LFU5	N(2),N(2)-dimethylguanosine methyltransferase, putative	tRNA			0.538	0.696	0.603



Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_15039-0.2-mRNA-1	Q9FR99	1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase	alkene biosynthesis					0.453
LS_15274-0.4-mRNA-1	Q5NTA4	Class IV chitinase		response to biotic stimulus	common	2.025	2.016	1.907
LS_15429-0.5-mRNA-1	Q8RUF8	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase protein					1.949	
LS_15980-0.1-mRNA-1	Q9FG33	Kinase, putative				1.896		
LS_16074-0.3-mRNA-1	Q9ZVT7	BnaC05g01900D protein				0.447	0.47	
LS_16199-0.1-mRNA-1	P22242	Desiccation-related protein PCC13-62	Lipid metabolism			0.542	0.548	0.515
LS_16308-0.0-mRNA-1	Q9FMP3	Dihydropyrimidinase						2.059
LS_16483-0.0-mRNA-1	A1XQR9	Small nuclear ribonucleoprotein E						1.744
LS_16745-0.1-mRNA-1	Q9LJE5	AT3g13460/MRP15_10				2.177	2.155	3.332
LS_16768-0.0-mRNA-1	A0A3Q7HRZ6	JAMYC				0.657	0.483	

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_17128-0.1-mRNA-1	Q9LL41	(+)-pinoresinol reductase	Aromatic compound metabolism;Phytoalexin biosynthesis								1.495				
LS_17189-0.5-mRNA-1	Q0JFH7	Fatty acid amide hydrolase-like protein									1.531				
LS_17407-0.1-mRNA-1	Q9FNR1	Glycine-rich RNA-binding protein 3, mitochondrial									0.689				
LS_17919-0.2-mRNA-1	Q9LUQ6	60S ribosomal protein L19-2		translation	common						6.282	1.6	1.421	1.992	3.044
LS_18098-0.2-mRNA-1	O80874	Putative NADH dehydrogenase									0.698		0.632		
LS_1821190-0.1-mRNA-1	Q9C9C4	Enolase	Carbohydrate degradation												0.387
LS_18845-0.0-mRNA-1	Q9FUL4	60S ribosomal protein L24									2.939	0.667	1.549		2.919
LS_1885573-0.0-mRNA-1	P26986	2S albumin		seed maturation											1.387
LS_18924-0.2-mRNA-1	F4I532	Peptide chain release factor 2									0.485				
LS_18962-0.4-mRNA-1	Q54KZ8	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M									1.306				

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_18996-0.5-mRNA-1	Q76CU2	Pleiotropic drug resistance protein 1				0.624
LS_19023-0.4-mRNA-1	Q9STY7	Dehydrogenase/reductase protein 7-like protein	SDR family		1.522	1.454
LS_19024-0.1-mRNA-1	A4GSN8	Nuclear-pore anchor			2.251	
LS_19112-0.1-mRNA-1	Q9SS43	Glycosyltransferase		common	0.227	0.219 0.221
LS_1962-0.0-mRNA-1	P49237	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase		seed maturation		0.572 0.642
LS_2104-0.1-mRNA-1	Q9ASP6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q			1.284	1.983 1.571
LS_21113-0.1-mRNA-1	Q10251	Eukaryotic translation initiation factor 5B				1.869
LS_2113-0.1-mRNA-1	O22860	60S ribosomal protein L38		translation		1.876
LS_2173-0.1-mRNA-1	Q9M5L0	60S ribosomal protein L35			1.484	

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_21927-0.2-mRNA-1	Q40554	Eukaryotic translation initiation factor 3 110 kDa subunit homolog							2.262		
LS_2199-0.1-mRNA-1		unknown						2.417	2.213	2.313	
LS_22095-0.3-mRNA-1	P83372	Citrate synthase	Organic acid metabolism;Carbohydrate metabolism					1.581	1.441		
LS_2261631-0.1-mRNA-1	Q9SW70	Stress-related protein						0.704	0.697	0.65	
LS_22755-0.0-mRNA-1	P26986	2S seed storage protein		seed maturation	common					1.992	
LS_23165-0.2-mRNA-1	Q9LZ06	Glutathione S-transferase								1.389	
LS_2327-0.1-mRNA-1	P25818	Tonoplast intrinsic protein						1.475	0.712	1.447	1.466
LS_23676-0.3-mRNA-1	P41918	GTP-binding nuclear protein Ran-A1						1.775	1.651	1.558	
LS_2413-1.3-mRNA-1	Q9FJT9	Putative zinc protease pql						2.415			
LS_24195-0.1-mRNA-1	Q93ZR3	Pre-mRNA-processing factor 39		mRNA processing;post-embryonic development	common			2.858	2.306	2.752	1.349

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_24246-0.3-mRNA-1	Q8K3P4	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 27C, putative	translation	3.164	1.958	3.479
LS_24271-0.1-mRNA-1	Q9M4U5	Histone deacetylase HDT2			1.392	
LS_25162-0.4-mRNA-1	Q9FQ03	5'-3' exoribonuclease 4			1.998	
LS_2533-0.1-mRNA-1	B2SFU7	Phosphoglycerate kinase	carbohydrate catabolic process			0.645
LS_25410-0.0-mRNA-1	Q7XT99	Aldo/keto reductase		0.547	0.577	0.488
LS_25621-0.5-mRNA-1	Q8W4B1	KH domain-containing protein				0.627
LS_2596659-0.1-mRNA-1	Q5KTS5	Glucose and ribitol dehydrogenase	seed maturation	0.739		
LS_2613043-0.0-mRNA-1	Q3KHL7	DNA repair protein RecO				1.501
LS_2616565-0.0-mRNA-1	Q07264	ADH1		1.816		
LS_26193-0.1-mRNA-1	Q8VZS6	AT3g13990/MDC16_11			1.545	

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_26698-0.1-mRNA-1	O80501	Ras-related protein Rab-6A	0.699		
LS_26910-0.3-mRNA-1	Q9SZH2	Peroxidase	0.483		0.488
LS_2694529-0.1-mRNA-1	Q8S340	Purple acid phosphatase	0.498		
LS_27154-0.3-mRNA-1	Q84K25	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 8	0.417		
LS_27416-0.0-mRNA-1	Q9SDG8	Argonaute 4		1.294	
LS_2742172-0.1-mRNA-1	P23901	Aldose reductase		1.476	
LS_2748386-0.1-mRNA-1	A4L7R8	Defensin-2		1.809	2.397
LS_27502-0.1-mRNA-1	Q8LDS5	THO complex subunit 7	1.766		
LS_27667-0.0-mRNA-1	C4IYS8	Cytochrome b561		246.824	
LS_2793340-0.0-mRNA-1	P02723	ADP,ATP carrier protein		1.846	
LS_27934-0.1-mRNA-1	B9FDR3	Transportin-1	0.54		
LS_2798-1.1-mRNA-1	Q9M1X2	Chalcone isomerase	0.529		
LS_2805-0.1-mRNA-1	Q8LF05	AtRBL19	1.661	1.679	1.607

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_28053-0.0-mRNA-1	Q9T0K5	Cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein		0.473	
LS_2826453-0.0-mRNA-1	O23421	Glutaredoxin		1.428	
LS_28670-0.0-mRNA-1	Q9FFC6	GDSL esterase/lipase		1.844	1.641
LS_28843-0.1-mRNA-1	P46280	Elongation factor Tu, chloroplastic		1.272	
LS_29025-0.1-mRNA-1	O23702	C-terminal binding protein AN		1.739	
LS_2913854-0.0-mRNA-1	Q7TMK9	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q		0.699	
LS_2934161-0.0-mRNA-1	P48631	Putative microsomal omega-6 fatty acid desaturase	Lipid metabolism	0.563	0.525
LS_29790-0.1-mRNA-1	I0J0E7	BnaA07g38740D protein		1.528	
LS_2982375-0.1-mRNA-1	Q03968	Late embryogenesis abundant protein, group 3	response to stress		0.615

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_3018698-0.1-mRNA-1	Q6WUC2	Caffeic acid 3-O-methyltransferase	Aromatic compound metabolism;Alkaloid biosynthesis;Flavonoid metabolism		1.677
LS_3042662-0.1-mRNA-1	Q5NTA4	Class IV chitinase		response to biotic stimulus	common 0.649
LS_3052919-0.0-mRNA-1	P49237	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase		seed maturation	1.468
LS_30596-0.0-mRNA-1	O23095	60S acidic ribosomal protein P1		translation	0.297
LS_3060000-0.0-mRNA-1	P81748	Macrophage migration inhibitory factor like			0.692
LS_3104954-0.1-mRNA-1	P10505	Interferon-induced with tetratricopeptide repeats 2			1.73
LS_31100-0.1-mRNA-1	E1BZR9	Vacuolar protein sorting 13			1.773



Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_31156-0.0-mRNA-1	P41098	Large subunit ribosomal protein L34e, cytoplasmic	translation	common	2.928			1.561	2.431
LS_31278-0.2-mRNA-1	Q8VZL4	A_IG005I10.14 protein			0.468	1.498	0.545	2.507	0.389
LS_31354-0.3-mRNA-1	O49816	Late embryogenesis abundant protein 1	seed maturation		1.735		1.874		1.634
LS_3140035-0.1-mRNA-1	A0A4D6Q4T7	Flavanone-3-hydroxylase	Secondary biosynthesis	metabolite	0.615				
LS_3177-0.0-mRNA-1	Q6FLT7	BnaC07g04480D protein							0.44
LS_3188609-0.1-mRNA-1	Q9FMU5	U3 small nucleolar RNA-associated protein 18-like protein			3.371				2.54
LS_32084-0.2-mRNA-1	P49249	Aldo/keto reductase						0.545	
LS_3215728-0.0-mRNA-1	A8B479	Caleosin			1.545				
LS_32387-0.3-mRNA-1	P35684	60S ribosomal protein L3			1.546				1.516
LS_32661-0.2-mRNA-1	Q04832	Os10g0545300 protein			0.494		0.578		0.528

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_3275607-0.1-mRNA-1	P03075	Large T antigen		dna metabolic process		10.769	0.113			11.177
LS_3285023-0.0-mRNA-1	Q9LKA4	Nucleotide-binding, alpha-beta plait		cell death	common			1.904		1.477
LS_3289991-0.0-mRNA-1	O65050	Ribosomal protein L15		translation	common	8.47	0.584	2.066	1.61	7.764
LS_3292341-0.0-mRNA-1	O82264	NPL4-like protein 2	Protein degradation	protein catabolic process	common	0.389	0.657			0.448
LS_32939-0.2-mRNA-1	O23593	Nuclear RNA binding protein						0.661		
LS_33049-0.0-mRNA-1	Q9LK35	Receptor-like protein kinase THESEUS 1				0.429				
LS_33282-0.1-mRNA-1	Q9SBQ9	Flavonoid 3'-hydroxylase	Pigment biosynthesis;Secondary metabolite biosynthesis					0.197		
LS_33372-0.0-mRNA-1	Q1PEP5	Nucleolin 2						1.915		1.59
LS_33438-0.1-mRNA-1	A0A286LF00	Major facilitator-type transporter psiT1								0.6
LS_3352354-0.4-mRNA-1	Q9ZUC1	Quinone oxidoreductase-like protein				1.731				

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_33616-0.2-mRNA-1	Q93Y09	Serine carboxypeptidase-like 45							0.613
LS_33616-0.3-mRNA-1	Q93Y09	Serine carboxypeptidase-like 45				0.691	0.665		0.575
LS_3370507-0.0-mRNA-1	P39207	Nucleoside diphosphate kinase		cellular detoxification	oxidant	0.633	0.729		
LS_3383-0.1-mRNA-1	Q680P8	40S ribosomal protein		translation	common			1.536	2.999
LS_3385543-0.1-mRNA-1	P41636	4-coumarate:CoA ligase	Phytoalexin biosynthesis					0.42	
LS_3400826-0.1-mRNA-1	Q9SU63	Aldehyde dehydrogenase						1.554	
LS_3408990-0.0-mRNA-1	Q9FN05	Neutral alpha-glucosidase AB	Glycan metabolism					1.428	
LS_34121-0.2-mRNA-1	P08926	60 kDa chaperonin		protein folding				1.274	
LS_3415428-0.1-mRNA-1	Q5ZKD5	RRP12-like protein							2.016
LS_34274-0.5-mRNA-1	Q9AS75	AtTRX9						0.596	
LS_3433726-0.0-mRNA-1	Q38806	22.0 kDa heat shock protein		response to abiotic stress				0.594	
LS_3436402-0.1-mRNA-1	Q84WE4	21 kD protein						0.532	0.608
									0.462

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_3437543-0.2-mRNA-1	P49132	Triose phosphate/phosphate translocator, chloroplastic				1.301		
LS_3442-0.5-mRNA-1	Q6YZX6	Aconitate hydratase	Carbohydrate metabolism	generation of precursor metabolites and energy		1.466	0.712	
LS_3466689-0.1-mRNA-1	Q8RXJ0	Kinetochose protein NUF2 homolog						0.384
LS_3493848-0.1-mRNA-1	O64700	Urease accessory protein UreG				1.253		1.347
LS_3494-0.1-mRNA-1	B9HBA8	Biotin carboxylase	Lipid metabolism	lipid metabolic process		1.719		
LS_3497171-0.0-mRNA-1	P14675	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase				0.653	0.619	0.558
LS_3498788-0.1-mRNA-1	Q84JZ6	Plastid developmental protein DAG				0.6	0.625	
LS_34994-0.1-mRNA-1	Q5U312	Ankycorbin				0.249		
LS_3508663-0.1-mRNA-1	Q9M153	Lanatoside 15-O-acetylerase				0.626	0.627	0.492

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_3523326-0.0-mRNA-1	O64640	Gibberellin receptor GID1, putative						0.561			
LS_35240-0.2-mRNA-1	Q9LK40	DNA-directed RNA polymerase subunit beta							1.319		
LS_3528-0.3-mRNA-1	Q8L831	Nudix hydrolase 3						0.478	0.656	0.549	
LS_35612-0.1-mRNA-1	Q9C635	Heat shock transcription factor								0.279	
LS_3569880-0.1-mRNA-1	O82528	Ribosomal protein L15			translation	common	1.939	3.673		2.763	5.42
LS_3581369-0.1-mRNA-1	B8LPG7	Fe-S cluster assembly protein DRE2 homolog						0.487			0.488
LS_35839-0.1-mRNA-1	M1T9X3	Phenylcoumaran benzylic ether reductase IRL1	Aromatic metabolism;Flavonoid metabolism;Phytoalexin biosynthesis	compound	secondary metabolic process			1.635		0.715	
LS_3586110-0.1-mRNA-1	O80852	Phi class glutathione S-transferase						0.707		0.684	

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_3592625-0.1-mRNA-1	Q42580	Peroxidase							0.526
LS_3594009-0.1-mRNA-1	P25469	Histone H2A		chromosome organization	common	1.807			1.65
LS_3600002-0.0-mRNA-1	P48384	Thioredoxin					0.73		
LS_3604961-0.1-mRNA-1	Q43609	Caffeic acid 3-O-methyltransferase	Aromatic compound metabolism;Flavonoid metabolism;Polyol metabolism						1.411
LS_3611670-0.1-mRNA-1	Q9SUU5	Cytochrome b-c1 complex subunit 7		generation of precursor metabolites and energy				0.706	
LS_36170-0.2-mRNA-1	Q94JU3	Proteasome component (PCI) domain protein isoform 1					0.453		
LS_3636430-0.0-mRNA-1	G7J032	Phytohormone-binding protein				0.445	0.476	0.372	
LS_36423-0.3-mRNA-1		unknown				0.709	0.601		0.558
LS_3655780-0.1-mRNA-1	Q92S14	Probable sugar isomerase R00627							0.406

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_3663022-0.1-mRNA-1	Q9SYG1	17.9 kDa class II heat shock protein							1.711	
LS_3667584-0.1-mRNA-1	O82089	Copper chaperone						0.721		
LS_3670202-0.1-mRNA-1	Q61E63	BnaC04g05100D protein						0.715		
LS_3683740-0.1-mRNA-1	Q6WUC2	(RS)-norcoclaurine 6-O-methyltransferase						0.65	0.525	0.538
LS_3684150-0.0-mRNA-1	P51425	60S ribosomal protein L39		translation	common			2.267	2.379	2.963
LS_36926-0.0-mRNA-1	Q93Z96	Coproporphyrinogen III oxidase	Porphyrin-containing compound metabolism							0.577
LS_3697713-0.0-mRNA-1	Q9M5M0	Chalcone synthase	Phytoalexin biosynthesis;Secondary metabolite biosynthesis	secondary metabolic process	common			1.957		1.639
LS_3697751-0.1-mRNA-1	Q8LNZ5	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase						0.439	0.463	0.332

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_3721532-0.1-mRNA-1	Q9ZTT5	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase	Aromatic compound metabolism;Pigment biosynthesis			2.147		1.827
LS_3722-0.4-mRNA-1	Q8RY24	Sucrose phosphate synthase	Glycan biosynthesis			1.781		
LS_3723193-0.1-mRNA-1	O80944	Os01g0847700 protein						1.389
LS_3723293-0.1-mRNA-1	Q69TH6	12-oxophytodienoate reductase 3				0.673		
LS_3723612-0.1-mRNA-1	Q9M5Z9	40S ribosomal protein		translation	common	1.494		1.426
LS_3730363-0.0-mRNA-1	Q8PHB6	O-acetyl-ADP-ribose deacetylase				0.317	0.452	0.484
LS_3734054-0.0-mRNA-1	Q8LF48	3-ketoacyl-CoA thiolase B, peroxisomal	Lipid metabolism					1.355
LS_3734220-0.0-mRNA-1	Q0JJZ6	Anoctamin-like protein At1g73020		transport	common	0.522	0.632	0.297
LS_3736193-0.0-mRNA-1	O22160	Low-complexity protein				0.514	0.601	0.512



Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_3739720-0.0-mRNA-1	Q6AVG6	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	Isoprenoid biosynthesis	small molecule metabolic process	common	0.619	0.657	0.578
LS_3743-0.0-mRNA-1	Q8L719	RNA and export factor binding protein, putative						0.451
LS_3743425-0.1-mRNA-1	Q5GQ66	Pathogen-inducible alpha-dioxygenase						0.435
LS_3746205-0.0-mRNA-1	Q9M9G7	F-actin-capping protein subunit beta	Carbohydrate degradation			0.506		1.655
LS_3747555-0.2-mRNA-1	M4IQQ7	Probable CoA ligase CCL9		small molecule metabolic process	common	2.418	1.453	1.892
LS_3750265-0.0-mRNA-1	O65238	Serine/threonine-protein kinase						0.532
LS_37572-0.2-mRNA-1	Q9ZR40	Splicing factor U2af large subunit B				0.678	1.341	
LS_3761326-0.0-mRNA-1	Q9FSF0	Malate dehydrogenase		generation of precursor metabolites and energy		1.422		1.547

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_37700-0.1-mRNA-1	Q10NY2	Topless-related protein 1	Metabolic biosynthesis	intermediate				1.347
LS_3770292-0.1-mRNA-1	B3EIL6	Ribosomal RNA methyltransferase H small subunit				0.522	0.596	
LS_3771225-0.0-mRNA-1	O04379	Eukaryotic translation initiation factor 2c		mRNA processing	common	2.114		3.015
LS_3771411-0.1-mRNA-1	P34924	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Carbohydrate degradation	carbohydrate catabolic process			0.709	
LS_3771671-0.1-mRNA-1	Q8S2E5	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 4						2.616
LS_3773589-0.1-mRNA-1	Q9SE51	SURF1-like protein				0.396	0.355	0.335
LS_3775920-0.1-mRNA-1	B9HBA8	Biotin carboxylase	Lipid metabolism			1.508	1.42	
LS_3776093-0.0-mRNA-1	B9HQZ6	Alanyl-tRNA synthetase						1.681
LS_3776996-0.1-mRNA-1	Q9FPT1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 12		anatomical structure development				1.447

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_3781424-0.1-mRNA-1	P13940	Late embryogenesis abundant protein D-29	seed development	common	0.476	0.557	0.47	0.619	
LS_37952-0.4-mRNA-1	Q9ZW28	Glutathione S-transferase U3						0.458	
LS_3795618-0.1-mRNA-1	Q43814	Ornithine carbamoyltransferase	Amino-acid degradation		2.594	0.617	2.068	1.881	
LS_3802561-0.1-mRNA-1	Q9M219	Transcription termination factor MTEF18, mitochondrial			1.949				
LS_3805347-0.0-mRNA-1	Q9LLB0	Allene oxide synthase	Lipid metabolism				0.586	0.513	
LS_3833067-0.1-mRNA-1	Q9R1M5	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 5	embryo development	common	0.653	0.681	0.722	0.605	0.545
LS_3846871-0.1-mRNA-1	P92985	Ran-binding protein 2, Ran-binding domain protein						0.643	
LS_3852295-0.0-mRNA-1	O65351	Subtilisin-like protease					0.645		
LS_3853563-0.1-mRNA-1	P41128	60S ribosomal protein L13			1.413			1.432	

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_3856805-0.0-mRNA-1	Q9FNR1	Glycine-rich RNA-binding protein 2, mitochondrial		0.449	0.564	0.487
LS_3857004-0.1-mRNA-1	Q9LPZ1	Plastid developmental protein DAG			1.724	
LS_3859521-0.1-mRNA-1	Q9LJ97	Late embryogenesis abundant protein 31			0.614	
LS_3864255-0.1-mRNA-1	P51109	Dihydroflavonol 4-reductase	Pigment biosynthesis		0.641	
LS_3865553-0.1-mRNA-1	Q6Z4N6	Ricin B lectin domain-containing protein			1.441	1.483
LS_3867773-0.1-mRNA-1	A7QEU4	Peroxidase		0.494	0.561	0.289
LS_3867814-0.1-mRNA-1	Q9SLZ0	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	carbohydrate metabolic process	0.547	0.371	0.29
LS_3872268-0.1-mRNA-1	Q9SA78	Coatomer subunit epsilon-1		2.292		
LS_3873048-0.0-mRNA-1	O80362	Putative 50S ribosomal protein L10		2.029		

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_3880914-0.1-mRNA-1	Q5E993	O-linked GlcNAc transferase-like protein				1.749	1.584
LS_3881477-0.1-mRNA-1	O80925	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 1				2.617	
LS_3881720-0.0-mRNA-1	Q9FEW2	Histidinol-phosphate aminotransferase	Amino-acid biosynthesis			0.612	0.476
LS_3882128-0.1-mRNA-1	Q339X2	Beta-glucosidase					0.589
LS_3884409-0.1-mRNA-1	Q9M330	Putative proteasome inhibitor					1.478
LS_3891789-0.1-mRNA-1	P05477	17.7 kDa heat shock protein				1.307	
LS_3891861-0.1-mRNA-1	P40267	Histone H1	chromosome organization	common	2.152	1.947	1.675
LS_38944-0.2-mRNA-1	Q8H1G5	Cytoplasmic 60S subunit biogenesis factor REI1 homolog 1				1.564	

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_3897981-0.1-mRNA-1	F4K4Y5	DEK domain-containing associated protein	chromatin					1.747
LS_3899414-0.0-mRNA-1	B5X574	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	Carbohydrate biosynthesis	carbohydrate metabolic process	0.56	0.618		0.492
LS_3900279-0.1-mRNA-1	A9NQT1	Antifungal protein ginkbilobin-like protein		killing of cells of another organism	0.623	0.491		0.627
LS_3901809-0.2-mRNA-1	A0A140FAN3	11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase-like protein			2.122			
LS_3903506-0.1-mRNA-1	Q9FF86	HXXXD-type acyl-transferase family protein						0.373
LS_3905043-0.2-mRNA-1	Q8GY23	E3 ubiquitin-protein ligase UPL1-like protein	Protein modification		4.844	0.402	2.682	
LS_3905114-0.1-mRNA-1	Q9FE06	Phosphate-responsive 1 family protein			0.605	0.594		
LS_3906385-0.0-mRNA-1	Q9FE06	Phosphate-responsive 1 family protein			0.651	0.546		

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_3912698-0.1-mRNA-1	P92964	rRNA adenine N(6)-methyltransferase							1.981
LS_3919877-0.1-mRNA-1	Q9FID5	BnaA08g13380D protein						2.164	
LS_3921005-0.1-mRNA-1	Q8LFC0	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial	generation of precursor metabolites and energy					1.791	
LS_3921008-0.1-mRNA-1	Q9SLZ0	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP], putative	carbohydrate metabolic process					0.549	
LS_3928780-0.1-mRNA-1	A4L7R7	Putative gamma-thionin protein						1.801	2.302
LS_3929-1.3-mRNA-1	Q0AI05	Lipoyl synthase	protein modification process					1.726	1.743
LS_3936600-0.0-mRNA-1	Q9C9H7	Serine-threonine protein kinase, plant-type, putative						3.465	2.448
LS_39375-0.1-mRNA-1	Q8R2Q0	BnaC01g04610D protein						0.521	
LS_3949282-0.0-mRNA-1	P26792	Cell wall invertase	carbohydrate metabolic process	common				0.725	0.615 0.714 0.627

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_3953457-0.0-mRNA-1	Q50EK4	Cytochrome P450 71A1	Secondary biosynthesis	metabolite		2.862	2.828
LS_3954738-0.1-mRNA-1	F4I0P8	Vacuolar protein sorting-associated protein 35				0.449	
LS_3959248-0.0-mRNA-1	P27880	17.5 kd heat shock family protein		response to stress;protein folding		1.355	1.371 1.381
LS_3965339-0.1-mRNA-1	A0AT29	Non-specific lipid-transfer protein					1.383
LS_3971146-0.1-mRNA-1	Q9SKB3	Poly(ADP-ribose) glycohydrolase 1					9.38
LS_3973846-0.1-mRNA-1	Q9C5J8	Outer envelope protein 80, chloroplastic					0.478
LS_3974426-0.1-mRNA-1	Q8H995	Thaumatococcus-like protein		response to biotic stimulus		1.433	
LS_3978551-0.1-mRNA-1	Q5E9D6	Dreg-2 like protein					0.686
LS_3983053-0.1-mRNA-1	Q9LYD8	L-gulonolactone oxidase	Cofactor biosynthesis			2.665	1.908 2.669
LS_3983461-0.1-mRNA-1	Q947C5	Non-symbiotic hemoglobin				0.671	



Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_3985036-0.2-mRNA-1	B8AFI3	Protein WAX2						0.681	
LS_3987292-0.0-mRNA-1	O64740	Protein transport protein SEC13					0.72		
LS_3987488-0.0-mRNA-1	Q9ZRS8	60S ribosomal protein L37a			translation				1.374
LS_3992282-0.1-mRNA-1	Q9FFZ6	Glycine-rich RNA-binding protein 2					1.606		
LS_3996978-0.1-mRNA-1	Q9FGT8	Temperature-induced lipocalin			response to abiotic stimulus			0.682	
LS_3999383-0.1-mRNA-1	Q93ZY3	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase	Protein modification		protein modification process			1.456	
LS_4001540-0.1-mRNA-1	H9A1V3	Acetyl-coenzyme A synthetase					0.614		0.592
LS_4002387-0.1-mRNA-1	Q9T043	60S ribosomal protein L14			translation	common		1.336	1.398 1.318
LS_4009394-0.3-mRNA-1	Q9FJRO	Regulator of nonsense transcripts 1						1.709	

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_4011282-0.1-mRNA-1	Q9CAC3	Serine/threonine-protein kinase							1.596
LS_4014598-0.1-mRNA-1	P52411	Acyl carrier protein	Lipid metabolism						1.767
LS_4015923-0.0-mRNA-1	B8H7N3	Transaldolase	Carbohydrate degradation	small molecule metabolic process					2.251 0.456 1.6
LS_4017632-0.0-mRNA-1	Q9LYJ9	ATP-dependent RNA helicase DBP2							1.783
LS_4018299-0.1-mRNA-1	P24805	Stem-specific protein TSJT1			common	0.438	0.644	0.456	0.416
LS_40199-0.1-mRNA-1	Q10M12	Ricin B-like lectin R40C1		defense response to bacterium					1.348 1.612 1.439
LS_4022446-0.1-mRNA-1	O65085	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase	Protein modification	protein modification process					0.659
LS_4023909-0.1-mRNA-1	P35684	60S ribosomal protein L3							1.714 1.649
LS_4025825-0.1-mRNA-1	Q8LG50	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase PLS1	Phospholipid metabolism						1.761

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_4026479- 0.1-mRNA-1	Q8H0P8	RNA-binding protein 1				0.699			
LS_4028387- 0.1-mRNA-1	Q9SDG8	Eukaryotic translation initiation factor 2c, putative				1.506			
LS_4030087- 0.0-mRNA-1	Q948Z4	Snakin-1				0.52			
LS_4030385- 0.1-mRNA-1	Q8VZT0	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 1				0.669	1.63	1.637	
LS_4030808- 0.1-mRNA-1	Q9FLF0	40S ribosomal protein	translation	common		1.253			
LS_4032402- 0.1-mRNA-1	M1BJF6	Ubiquitin-associated/TS-N domain protein, putative	response to biotic stimulus	common	3.063	2.541	4.366	2.309	
LS_4032418- 0.1-mRNA-1	Q05736	Putative intracellular pathogenesis-related protein				0.705		0.543	
LS_4032948- 0.0-mRNA-1	P17648	Alcohol dehydrogenase				0.694		0.616	
LS_4034273- 0.0-mRNA-1	Q08632	3-ketoacyl-ACP reductase					0.581		
LS_4036541- 0.0-mRNA-1	A5FAD1	Urea amidohydrolase subunit alpha	Nitrogen metabolism					3.047	

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_4037831-0.1-mRNA-1	Q5NTA4	Chitinase					0.53	0.265	0.433
LS_4038765-0.3-mRNA-1	P51091	Anthocyanidin synthase	Pigment biosynthesis;Secondary metabolite biosynthesis					0.68	
LS_40404-0.0-mRNA-1	P40267	Histone H1		chromosome organization	common				2.881 1.889
LS_4043538-0.2-mRNA-1	P30079	Chalcone synthase	Phytoalexin biosynthesis;Secondary metabolite biosynthesis		common			1.722	1.701 1.619
LS_4055474-0.0-mRNA-1	Q94A41	Os01g0715400 protein						0.59	
LS_4059658-0.0-mRNA-1	P26986	2S seed storage protein		seed maturation	common	1.498 0.617		0.708	1.729 1.645
LS_4061149-0.1-mRNA-1	O59811	Ribosome maturation protein SBDS						1.518	
LS_4065305-0.1-mRNA-1	Q39219	Ubiquinol oxidase					0.722		
LS_4074123-0.1-mRNA-1	P92980	Phosphoadenosine reductase	phosphosulfate Sulfur metabolism						1.606
LS_4074170-0.0-mRNA-1	Q65CJ7	Glyoxylate reductase							1.737

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_4074282-0.1-mRNA-1	O23894	26S protease regulatory subunit 6A			2.326	1.731	1.902
LS_4076120-0.1-mRNA-1	Q3B8G0	CXXC motif containing zinc binding protein					0.408
LS_4091289-0.0-mRNA-1	P22954	Heat shock protein 70		response to common stress;protein folding			1.713
LS_4097774-0.1-mRNA-1	O80990	Probable cytosolic iron-sulfur protein assembly protein CIAO1 homolog					0.634
LS_4106588-0.1-mRNA-1	Q9ZPN9	Beta-tubulin	Purine metabolism	cytoskeleton organization			0.706
LS_4110574-0.0-mRNA-1	Q9FIC3	BolA domain protein					1.794
LS_4115595-0.0-mRNA-1	O24301	Sucrose synthase		carbohydrate metabolic process			0.548 0.468
LS_4116352-0.1-mRNA-1	I6YGS0	Epoxide hydrolase-like protein			0.726	0.669	
LS_4117308-0.0-mRNA-1	Q8GT21	Taxadien-5-alpha-ol O-acetyltransferase			2.241		1.933

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_4117465-0.0-mRNA-1	Q9LJD8	MAP3K epsilon protein kinase 1	cell growth	common	0.472	0.646	0.329
LS_4123323-0.1-mRNA-1	P94078	Alpha-mannosidase	carbohydrate metabolic process				0.532
LS_4125454-0.1-mRNA-1	P17783	Malate dehydrogenase	generation of precursor metabolites and energy		1.465	0.7	
LS_41277-0.1-mRNA-1	P40619	DNA-binding protein MNB1B, putative					1.992
LS_4129280-0.1-mRNA-1	Q9LVN0	Putative glycerophosphoryl phosphodiesterase 1				0.716	
LS_4130789-0.1-mRNA-1	Q8H995	Thaumatococcus-like protein	response to biotic stimulus		2.613	2.458	2.172
LS_4134464-0.1-mRNA-1	O34866	Putative carboxypeptidase YodJ					0.643
LS_4140-0.0-mRNA-1	P27131	Actin	cytoskeleton organization	common		1.672	
LS_4141255-0.1-mRNA-1	Q9LE86	Clavaminic synthase-like protein				0.71	
LS_4150462-0.1-mRNA-1	P42698	Splicing factor 45			0.337	0.457	0.486

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_4153028-0.2-mRNA-1	B0K5G4	N-lysine methyltransferase SEE1			0.637		
LS_4156859-0.0-mRNA-1	Q9ASR1	Elongation factor 2	Protein biosynthesis	1.602	1.317	1.589	
LS_4163337-0.1-mRNA-1	Q9FVL0	Non-symbiotic hemoglobin		0.655	0.584	0.583	
LS_4168434-0.1-mRNA-1	P28583	Calcium-dependent protein kinase 1		0.561	0.635	0.535	
LS_41691-0.1-mRNA-1	A0A1Y1C7S2	Quiannulatic acid synthase			0.659	0.62	
LS_41744-0.1-mRNA-1	A9SCJ6	1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase	Amino-acid biosynthesis	0.614	0.614	0.512	
LS_4186179-0.1-mRNA-1	Q8GYB8	12-oxophytodienoate reductase 1	Lipid metabolism	0.66	1.678		
LS_41900-0.2-mRNA-1	Q10NX8	Beta-galactosidase		0.688			
LS_4192008-0.1-mRNA-1	Q04468	Cinnamate 4-hydroxylase	Phenylpropanoid metabolism		0.688		

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_4197267-0.1-mRNA-1	O00507	Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-Y								2.097
LS_4208453-0.1-mRNA-1	Q8UVD9	Far upstream element-binding protein 2				1.963	0.474	0.449	0.4	
LS_4208906-0.3-mRNA-1	P46302	40S ribosomal protein	Cofactor biosynthesis	translation	common					1.51
LS_4227466-0.0-mRNA-1	Q8LGG8	Universal stress protein A-like protein				1.696	1.534	1.824		
LS_4231779-0.1-mRNA-1	Q6T7E8	AMPSase	Purine metabolism			2.241	1.88	2.031		
LS_4233719-0.2-mRNA-1	P43082	Pathogenesis-related protein 4					1.453			
LS_4239708-0.1-mRNA-1	A0A1L6K371	11S globulin		seed maturation	common	1.559	2.083	1.807		
LS_4248648-0.0-mRNA-1	Q3T130	mRNA, 1290 bp sequence					0.433	0.48		
LS_4256263-0.2-mRNA-1	P25698	Elongation factor 1-alpha	Protein biosynthesis	protein metabolic process	common	6.051	0.635	3.577	0.48	4.683



Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_4258453-0.1-mRNA-1	B3DNN5	Anaphase-promoting complex subunit 6	Protein modification																1.599
LS_42677-0.0-mRNA-1	Q96253	ATP synthase subunit epsilon, mitochondrial																	1.511
LS_4268526-0.1-mRNA-1	P33624	Tubulin alpha-1 chain																	1.525
LS_4272207-0.1-mRNA-1	P17648	Alcohol dehydrogenase																	0.73
LS_4274396-0.0-mRNA-1	Q06327	Lipoxygenase																	3.729
LS_4276132-0.1-mRNA-1	Q6L4D2	AWPM-19-like family protein																	2.159
LS_4276132-0.1-mRNA-1	Q6L4D2	AWPM-19-like family protein																	1.466
LS_4289324-0.1-mRNA-1	Q9C554	Expansin																	1.392
LS_4289324-0.1-mRNA-1	Q9C554	Expansin																	1.837
LS_4289324-0.1-mRNA-1	Q9C554	Expansin																	2.117
LS_4289324-0.1-mRNA-1	Q9C554	Expansin																	1.748
LS_4292723-0.1-mRNA-1	O82392	Hydroxymethylpyrimidine synthase	phosphate	Cofactor biosynthesis															0.542
LS_4292723-0.1-mRNA-1	O82392	Hydroxymethylpyrimidine synthase	phosphate	Cofactor biosynthesis	small molecule metabolic process	common													0.344
LS_4292723-0.1-mRNA-1	O82392	Hydroxymethylpyrimidine synthase	phosphate	Cofactor biosynthesis	small molecule metabolic process	common													0.263
LS_4292723-0.1-mRNA-1	O82392	Hydroxymethylpyrimidine synthase	phosphate	Cofactor biosynthesis	small molecule metabolic process	common													0.404
LS_4292723-0.1-mRNA-1	O82392	Hydroxymethylpyrimidine synthase	phosphate	Cofactor biosynthesis	small molecule metabolic process	common													0.282
LS_4307278-0.1-mRNA-1	P33623	Tubulin alpha chain																	1.372
LS_4307278-0.1-mRNA-1	P33623	Tubulin alpha chain																	0.711
LS_4311497-0.0-mRNA-1	Q9LIN5	Eukaryotic translation initiation factor 4B1																	0.552
LS_4311497-0.0-mRNA-1	Q9LIN5	Eukaryotic translation initiation factor 4B1																	1.452

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_4313872-0.1-mRNA-1	Q2QLY4	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	Amino-acid biosynthesis			0.74	0.709	
LS_4316911-0.1-mRNA-1	Q0DHF6	Pyruvate decarboxylase 1		small molecule metabolic process	common	0.623	0.658	0.447
LS_43277-0.1-mRNA-1	Q84LK0	MSH1						1.478
LS_4327865-0.1-mRNA-1	P31726	Cysteine proteinase inhibitor						1.509
LS_4328845-0.1-mRNA-1	Q5MAU8	Purple acid phosphatase				0.508	0.655	0.522
LS_4329306-0.1-mRNA-1	F4I2S4	F23A5.27					1.834	
LS_4329348-0.1-mRNA-1	Q9HXV3	Phosphoenolpyruvate carboxylase		carbohydrate metabolic process				0.555
LS_4330868-0.0-mRNA-1	Q41452	Flavonol synthase	Secondary biosynthesis	metabolite				2.593
LS_43417-0.4-mRNA-1	O64411	Polyamine oxidase	Amine and degradation	polyamine		0.538	0.459	

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_4342244-0.1-mRNA-1	Q43007	Phospholipase D				0.412	1.253	0.536	1.484	0.522	
LS_4350511-0.2-mRNA-1	Q9SSD2	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8		mRNA processing	common		1.79		1.655	1.65	
LS_4367537-0.0-mRNA-1	Q9FJ95	Sorbitol dehydrogenase	Carbohydrate acid metabolism				0.716				
LS_4371706-0.1-mRNA-1	Q96DI7	U5 small nuclear ribonucleoprotein 40 kDa protein							1.395		
LS_4376161-0.0-mRNA-1	Q8GYM1	Glutathione S-transferase U22								0.619	
LS_4379978-0.1-mRNA-1	Q39002	ADP,ATP carrier protein 1		transport			0.684			0.512	
LS_4382365-0.1-mRNA-1	A3BMZ5	Beta-glucosidase							0.489		
LS_4396920-0.1-mRNA-1	Q43497	Monodehydroascorbate reductase		cellular detoxification	oxidant		2.823		0.321	1.732	
LS_4409897-0.0-mRNA-1	Q23892	Lysosomal beta glucosidase								1.843	
LS_4410504-0.3-mRNA-1	Q9QUR6	Prolyl endopeptidase					1.759		1.69	1.917	
LS_4413176-0.1-mRNA-1	O82627	Starch synthase, chloroplastic/amyloplastic	Glycan biosynthesis	carbohydrate metabolic process	common		1.782	2.697	3.611	2.712	3.644

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_4414448-0.1-mRNA-1	Q9ZQW8	Splicing factor U2AF 35 kDa subunit								1.978
LS_4419417-0.0-mRNA-1	Q8RU27	Type IIIa membrane protein cp-wap13				2.509		0.588	1.885	
LS_4426687-0.0-mRNA-1	P27880	17.5 kd heat shock family protein		response to stress;protein folding				1.25		
LS_4429035-0.1-mRNA-1	O04226	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	Amino-acid biosynthesis					1.536	1.847	
LS_4430055-0.1-mRNA-1	Q9ZP06	Malate dehydrogenase		generation of precursor metabolites and energy					0.436	
LS_4434937-0.0-mRNA-1	P50567	Histone H2A		chromosome organization	common	1.624	1.509	1.309	1.757	1.858
LS_4439005-0.0-mRNA-1	O49937	50S ribosomal protein L4								1.578
LS_4442546-0.1-mRNA-1	Q9LTT8	Enhancer of mRNA-decapping protein 4								1.627

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_4458044-0.1-mRNA-1	Q9ZUU4	31 kDa ribonucleoprotein, chloroplastic				1.431		1.638		
LS_4459310-0.1-mRNA-1	Q709C8	Vacuolar protein sorting 13				2.47				
LS_4466564-0.1-mRNA-1	P41128	60S ribosomal protein L13				1.262				1.56
LS_4468773-0.0-mRNA-1	Q8H156	GTP-binding nuclear protein	chromosome organization	common	2.454	0.66	1.629		1.998	1.424
LS_4468811-0.1-mRNA-1	Q70XE6	Cell wall invertase	carbohydrate metabolic process	common		0.694		0.669		
LS_4472361-0.0-mRNA-1	P16031	Ribulose biphosphate carboxylase small chain				1.866		1.779		2.583
LS_4474977-0.1-mRNA-1	Q9LJ87	PHP						0.457		
LS_4476293-0.1-mRNA-1	Q05737	GTP-binding protein ypt1	transport			0.661		1.698		1.721
LS_4482519-0.1-mRNA-1	Q7VK65	E3 ubiquitin protein ligase upl2, putative				1.871				1.595

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_4482602-0.2-mRNA-1	Q8W034	Putative heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 1-like		mRNA processing	common	1.754		1.492
LS_4488933-0.0-mRNA-1	Q9SYB5	Probable dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 3B		protein modification process		0.546		
LS_4511919-0.1-mRNA-1	P17648	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase				0.627	0.33	0.388
LS_45147-0.1-mRNA-1	P52855	60S acidic ribosomal protein P1		translation		1.68		
LS_4519547-0.1-mRNA-1	Q06942	Flavanone 3-hydroxylase	Secondary biosynthesis	metabolite		0.609		
LS_4522689-0.1-mRNA-1	O49169	Elongation factor 1-alpha	Protein biosynthesis	protein metabolic process	common	0.341	2.114	0.577

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_4523336-0.1-mRNA-1	Q9Y4A5	Phosphotransferases/inositol phosphatidylinositol kinases	or			1.635		
LS_4524615-0.1-mRNA-1	Q9SMW7	Nascent polypeptide-associated subunit beta	complex			1.571	0.722	
LS_4525157-0.1-mRNA-1	Q9LFR3	GASA-like protein				0.737		
LS_45282-0.0-mRNA-1	Q8VYU4	CCR4 homolog 6					1.768	
LS_4529469-0.0-mRNA-1	Q09WE7	UDP-sugar pyrophosphorylase 1				0.096	0.092	0.09
LS_4530863-0.0-mRNA-1	Q9Y702	Actin		cytoskeleton organization	common		1.627	
LS_4532457-0.1-mRNA-1	Q8L611	Protein transport protein SEC31		protein targeting	common		1.435	1.501
LS_4533-0.3-mRNA-1	Q84VT2	Omega-6 fatty acid desaturase	Lipid metabolism				0.583	0.611
LS_4544076-0.0-mRNA-1	P35684	60S ribosomal protein L3				1.653		1.673

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_4551490-0.0-mRNA-1	Q9SQT8	Bifunctional dehydratase/shikimate chloroplastic	3-dehydroquinate dehydrogenase,	Metabolic biosynthesis	intermediate				0.619
LS_4553274-0.1-mRNA-1	Q9LIS2	Glycine-rich mitochondrial	RNA-binding protein 4,			response to stress;water deprivation			0.678
LS_4565271-0.0-mRNA-1	P42322	Calcineurin subunit B							0.549
LS_4569382-0.1-mRNA-1	Q8GY23	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1		Protein modification					0.7 1.573
LS_4571163-0.1-mRNA-1	Q9LIJ7	Purple acid phosphatase							0.695
LS_4579160-0.1-mRNA-1	Q9XG54	12-oxophytodienoate reductase 1		Lipid metabolism					0.676 2.258 1.658
LS_4579480-0.1-mRNA-1	Q6K669	Leucyl aminopeptidase							0.591
LS_4585871-0.1-mRNA-1	P25083	ADP,ATP carrier protein							0.467
LS_4597790-0.2-mRNA-1	Q8L611	Protein transport protein SEC31				protein targeting	common		1.539 1.451



Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_4609915-0.2-mRNA-1	P68173	Adenosylhomocysteinase	Amino-acid biosynthesis	1.562			
LS_4619324-0.1-mRNA-1	Q9LFE2	Transducin beta-like protein 3				2.146	2.396
LS_4622291-0.0-mRNA-1	F4JPR7	Os08g0546400 protein		0.452		0.624	0.536
LS_4626520-0.0-mRNA-1	Q08480	Adenylate kinase					1.413
LS_4626834-0.0-mRNA-1	P22954	Heat shock protein 70	response to common stress;protein folding	1.79		1.35	1.395
LS_4629034-0.0-mRNA-1	Q38896	Glycine-rich protein 2				4.504	4.058
LS_4630558-0.0-mRNA-1	Q40374	Pathogenesis-related protein 1		0.491			
LS_4633375-0.1-mRNA-1	Q9LV66	Lactoylglutathione lyase / glyoxalase I family protein		1.642		1.642	1.524
LS_4643607-0.1-mRNA-1	Q9XG54	12-oxophytodienoate reductase 1	Lipid metabolism	0.698		1.703	
LS_4645883-0.2-mRNA-1	Q6TPH1	Purple acid phosphatase		0.638			
LS_4646990-0.0-mRNA-1	P23444	Histone H1	chromosome organization		common	1.564	3.309

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_4650-0.2- mRNA-1	Q6P3H4	Nicotinate phosphoribosyltransferase								2.146				
LS_4651447- 0.0-mRNA-1	Q9LZ19	Phi class glutathione S-transferase									0.705			
LS_4652655- 0.1-mRNA-1	Q6AUG0	Splicing factor U2AF 35 kDa subunit									2.445	1.668		
LS_4653456- 0.1-mRNA-1	P46258	Actin			cytoskeleton organization	common					0.727			
LS_4659853- 0.0-mRNA-1	Q40731	Acyl-[acyl-carrier-protein] desaturase	Lipid metabolism		lipid process	metabolic common					0.725	0.672	0.672	0.614
LS_4662150- 0.2-mRNA-1	P12951	Dehydrin-like protein									0.49	0.654		
LS_4663078- 0.1-mRNA-1	Q5NTA4	Class IV chitinase				response to biotic stimulus	common				1.941	1.833		1.719
LS_4670367- 0.0-mRNA-1	Q2V6J9	Glycosyltransferase				small molecule metabolic process	common				0.436	0.492	0.445	
LS_46717- 0.2-mRNA-1	Q9FR62	HSP20-like chaperones superfamily protein isoform 2										1.626		0.549
LS_4671982- 0.1-mRNA-1	M4IQQ7	Probable CoA ligase CCL9				small molecule metabolic process	common					2.461	1.445	1.907

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_4673858-0.0-mRNA-1	Q9FMH8	Cysteine protease			0.639
LS_4675258-0.0-mRNA-1	B9G2A8	Auxin transport protein BIG		0.654	
LS_4676256-0.0-mRNA-1	Q43097	Isocitrate lyase	Carbohydrate metabolism	0.699	0.593
LS_4676899-0.0-mRNA-1	Q9C9B9	Uridine-cytidine kinase C	Pyrimidine metabolism		0.478
LS_4679124-0.1-mRNA-1	Q9SU71	Protein EDS1B		2.309	
LS_4679865-0.1-mRNA-1	Q5XF36	Putative Vacuole membrane protein		2.861	
LS_4682286-0.2-mRNA-1	Q3AH76	At5g53650			1.569
LS_4682852-0.1-mRNA-1	Q8W034	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 27C		0.596	
LS_4683414-0.1-mRNA-1	A7IIE4	GTPase Der		0.612	
LS_46849-0.0-mRNA-1	A0A1I9R3Y6	Oleosin		1.562	1.386
LS_4690314-0.1-mRNA-1	P49310	Glycine-rich RNA-binding protein		1.41	

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_4698548-0.1-mRNA-1	P92990	Polygalacturonase-1 non-catalytic subunit beta			1.842	1.467	1.542
LS_4703150-0.1-mRNA-1	O49595	DNA-binding protein MNB1B, putative				0.479	
LS_4714-0.1-mRNA-1	Q55EX9	S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase				0.682	
LS_4732046-0.0-mRNA-1	B5X574	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	Carbohydrate biosynthesis	carbohydrate metabolic process	0.716	0.585	0.541
LS_4733585-0.0-mRNA-1	P52777	Phenylalanine ammonia-lyase	Phenylpropanoid metabolism			2.995	2.021
LS_4739180-0.2-mRNA-1	P35684	60S ribosomal protein L3			1.719		1.362
LS_4744993-0.0-mRNA-1	O80852	Phi class glutathione S-transferase				0.618	0.546
LS_4752714-0.0-mRNA-1	Q43191	Lipoxygenase	Lipid metabolism		0.701	0.578	0.573
LS_47542-0.0-mRNA-1	Q9M5M7	60S ribosomal protein L10		protein metabolic process	1.669		

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_4768821-0.1-mRNA-1	Q9FME2	Putative uncharacterized protein Sb04g020120				0.635		
LS_4775560-0.1-mRNA-1	Q9M3V8	40S ribosomal protein		translation	common	1.579	1.369	1.376
LS_47775-0.0-mRNA-1	Q9FRV0	Chitinase					0.578	0.542
LS_47801-0.1-mRNA-1	P51092	Anthocyanidin synthase	Pigment biosynthesis			0.733	0.567	0.581
LS_4780848-0.2-mRNA-1	P0CG89	Histone H4		chromosome organization	common	1.27		1.386 1.523
LS_4800692-0.1-mRNA-1	Q43314	Glutamate dehydrogenase						0.487
LS_4810097-0.0-mRNA-1	P27880	18.2 kDa class I heat shock protein		response to stress		1.886	1.961	
LS_4819370-0.1-mRNA-1	Q9STH1	Stress-induced-phosphoprotein 1					1.318	
LS_4825647-0.1-mRNA-1	A0A1L6K371	11S globulin		seed maturation	common			1.488 1.787
LS_4828925-0.0-mRNA-1	F4HRT5	Protein CROWDED NUCLEI 1		cytoskeleton organization	common		1.375 1.299	
LS_4834546-0.1-mRNA-1	Q43735	Peroxidase				0.534	0.493	0.45
LS_4848662-0.0-mRNA-1	Q7V9K4	BnaA05g23490D protein				1.774	1.551	

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_4851412-0.1-mRNA-1	Q6XLQ7	Calcium-binding EF hand family protein							3.908
LS_4853039-0.1-mRNA-1	F4I893	Translational activator GCN1						1.425	
LS_4856006-0.2-mRNA-1	P28752	Tubulin alpha chain		cytoskeleton organization			0.62	0.707	1.4
LS_4861544-0.1-mRNA-1	Q9ZQ31	Serine/threonine-protein kinase HT1						0.418	
LS_48620-0.3-mRNA-1	Q944J0	Signal peptidase subunit-12		protein metabolic process	common	0.395	0.403	0.386	0.494
LS_4864461-0.0-mRNA-1	P78567	Histone H2B						2.062	
LS_4865609-0.1-mRNA-1	B9G2A8	Auxin transport protein BIG						2.538	1.596 2.156
LS_4866492-0.1-mRNA-1	F4K0C4	TRAPP II-specific subunit 130 homolog							1.655
LS_4873855-0.1-mRNA-1	Q12852	Serine/threonine-protein kinase CTR1						0.652	
LS_4878551-0.1-mRNA-1	Q07878	Os02g0470600 protein					1.805	2.014	1.684
LS_4880610-0.1-mRNA-1	Q9T074	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	Carbohydrate biosynthesis	carbohydrate metabolic process			0.676	0.585	0.525

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_4894826-0.1-mRNA-1	Q7Y0F2	Cotton nucleoredoxin 1				1.9	2.215	1.944		
LS_4895411-0.0-mRNA-1	Q9LZF6	Transitional endoplasmic reticulum ATPase				1.537		1.378		
LS_4898309-0.1-mRNA-1	O24457	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha		small molecule metabolic process				0.639		
LS_4899426-0.1-mRNA-1	Q8GWT7	Late embryogenesis abundant protein 47		cellular homeostasis		1.254				
LS_490-0.7-mRNA-1	Q7X9I4	Endoplasmic reticulum oxidoreductin 1							0.547	
LS_4909436-0.1-mRNA-1	Q9ZT64	Beta-glucosidase 12					2.301			
LS_4911976-0.1-mRNA-1	Q5VQG4	Galactinol--sucrose galactosyltransferase	Glycan metabolism		desiccation tolerance	common	1.962	1.842	1.611	1.627
LS_4916233-0.1-mRNA-1	P49880	At3g45900					1.572			
LS_49211-0.1-mRNA-1	Q84KG5	Carotenoid cleavage dioxygenase 1							1.486	

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_4924313-0.1-mRNA-1	P93162	Mg-protoporphyrin IX chelatase	Porphyrin-containing compound metabolism							0.567		
LS_4927339-0.1-mRNA-1	F4IUX6	Regulator of nonsense transcripts 2						1.871	1.964	1.75		
LS_4929236-0.1-mRNA-1	P40412	T-complex protein 1 subunit epsilon						2.401				
LS_4929259-0.2-mRNA-1	Q84TD8	AtFLXL1						0.411	0.43	1.454	0.401	1.392
LS_4932732-0.1-mRNA-1	O24661	Asparagine synthetase	Amino-acid biosynthesis							0.437		
LS_4934867-0.1-mRNA-1	F4HUK6	AMP dependent ligase, putative		lipid process	metabolic	common		0.526	0.493	0.444	0.554	
LS_4935032-0.1-mRNA-1	Q9FYB7	Serine/arginine-rich splicing factor 4		rna process	metabolic	common			1.403	1.763	1.462	2.538
LS_4943442-0.0-mRNA-1	O22827	Molybdenum cofactor synthesis protein 2 large subunit	Cofactor biosynthesis								0.326	
LS_4947590-0.0-mRNA-1	B3RFJ6	Cytochrome P450 86A2							1.963			



Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_4965-0.2- mRNA-1	Q9HE11	U3 small nucleolar RNA-associated protein 5								1.382
LS_4967196- 0.1-mRNA-1	P31237	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	Alkene biosynthesis	fruit ripening	common	0.521	0.537	0.438		0.298
LS_49751- 0.0-mRNA-1	Q8RXF8	Mitochondrial Rho GTPase							1.433	
LS_4976141- 0.1-mRNA-1	F4IXW2	Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 5							1.845	
LS_4979407- 0.2-mRNA-1	P30079	Chalcone synthase	Phytoalexin biosynthesis;Secondary metabolite biosynthesis		common		1.413	1.366		
LS_4992922- 0.2-mRNA-1	P0DPD7	Methyltransferase-like protein 13		cell cycle	common	0.455	0.452		0.397	0.497
LS_4993828- 0.1-mRNA-1	O24301	Sucrose synthase		carbohydrate metabolic process				0.459		0.439

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_4993829-0.4-mRNA-1	Q9M111	Sucrose synthase		carbohydrate metabolic process		0.619	0.59
LS_49950-0.2-mRNA-1	Q7V4M4	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase				0.523	
LS_5000076-0.0-mRNA-1	P92990	Polygalacturonase non-catalytic protein			1.784		1.551
LS_5004520-0.1-mRNA-1	Q9FMG4	Serine/arginine-rich splicing factor 2				1.818	1.744
LS_5005993-0.2-mRNA-1	O24371	Lipoxygenase	Lipid metabolism			5.08	5.514
LS_5012778-0.0-mRNA-1	Q9FJD4	Importin subunit beta-1		response to stress	1.708		
LS_5012793-0.1-mRNA-1	Q1KLZ2	Cysteine synthase	Amino-acid biosynthesis		0.744		
LS_5018645-0.2-mRNA-1	Q9FMU6	Phosphate carrier protein, mitochondrial			1.48	0.689	
LS_5020679-0.2-mRNA-1	A0A0B5LB52	ER-bound oxygenase mpaB'					1.584
LS_5022090-0.1-mRNA-1	Q9SSD2	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8		mRNA processing	common	2.104	1.773

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_50245-0.3-mRNA-1	Q8W2X5	GA2ox12				0.64	0.467	0.457		
LS_5026844-0.2-mRNA-1	Q9FQ03	5'-3' exoribonuclease 2					1.73			
LS_50276-0.0-mRNA-1	Q58821	CBS domain					0.569			
LS_5031464-0.1-mRNA-1	Q43784	Starch synthase, chloroplastic/amyloplastic	Glycan biosynthesis	carbohydrate metabolic process	common	1.779	2.171	3.735	2.25	3.523
LS_5034941-0.1-mRNA-1	Q8H156	GTP-binding nuclear protein		chromosome organization	common	1.32	0.706			
LS_5039664-0.0-mRNA-1	P17648	ADH1						0.674		0.547
LS_5051452-0.1-mRNA-1	Q9M291	Protein transport protein Sec24D					2.514			
LS_5052753-0.1-mRNA-1	Q9LHA8	Heat shock protein 70		response to stress;protein folding	common					0.545
LS_5056934-0.1-mRNA-1	P51091	Anthocyanidin synthase	Pigment biosynthesis;Secondary metabolite biosynthesis			1.723				
LS_5061852-0.1-mRNA-1	Q0JD85	Os04g0422000 protein								5.493

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_5068238-0.1-mRNA-1	Q9SK12	Charged multivesicular body protein 2a					2.116	2.55	2.052	0.509	
LS_5069761-0.1-mRNA-1	Q869L3	Midasin					2.042				
LS_5072358-0.1-mRNA-1	Q8EIK8	Glutathione synthetase					0.675	0.636			
LS_5073971-0.1-mRNA-1	Q8W034	Putative heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 1-like			mRNA processing	common	1.644	1.348	1.42	1.633	1.593
LS_5082828-0.0-mRNA-1	P17928	Calmodulin			response to abiotic stimulus			0.651			
LS_5085256-0.3-mRNA-1	Q76CU2	Pleiotropic drug resistance protein 1						1.861		1.402	
LS_5090277-0.1-mRNA-1	P51851	Pyruvate decarboxylase 2			small molecule metabolic process	common			0.686		0.603
LS_5091467-0.1-mRNA-1	Q5YGP7	Aintegumenta-like transcription factor baby boom									0.429
LS_5093972-0.1-mRNA-1	Q8GY23	E3 ubiquitin-protein ligase UPL1-like protein	Protein modification					0.685	0.709		

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_5095026-0.1-mRNA-1	O27123	DNA-directed RNA polymerase subunit beta				0.504											
LS_5099369-0.1-mRNA-1	Q8VZF1	Acyl-CoA synthetase										0.716					
LS_51100-0.1-mRNA-1	Q93V84	Myosin-like protein										0.611	1.67	1.406			
LS_5110903-0.1-mRNA-1	P27788	Ferredoxin											0.478				
LS_5112967-0.1-mRNA-1	P17093	40S ribosomal protein	Glycan metabolism	translation	common							1.271					
LS_5123155-0.0-mRNA-1	Q9FJH6	ATP-binding cassette sub-family F member 2											1.742	1.984			
LS_5126386-0.1-mRNA-1	Q7X9I4	Endoplasmic reticulum oxidoreductin 1											0.481				
LS_5134-0.4-mRNA-1	Q9XGW1	Protein argonaute PNH1												1.716			
LS_5134-0.5-mRNA-1	Q6EU14	Eukaryotic translation initiation factor 2c		mRNA processing	common							1.544	1.794	1.413	3.58	2.71	2.994
LS_5137960-0.1-mRNA-1	P82277	30S ribosomal protein 2, chloroplastic													0.487		

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_5143209-0.3-mRNA-1	O22315	Pre-mRNA-splicing factor SF2			rna process	metabolic	common	1.552	1.614	1.584	1.737
LS_5145703-0.0-mRNA-1	P21357	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	Metabolic biosynthesis	intermediate	small molecule metabolic process		common		1.573	1.48	
LS_5146477-0.1-mRNA-1	Q9M2V1	E3 ubiquitin-protein ligase CHFR						0.443			
LS_5148105-0.0-mRNA-1	O65082	60S ribosomal protein L15-2			translation		common	2.12	1.398	1.488	2.971
LS_5151984-0.0-mRNA-1	A0A0A0LLY1	Glycine-rich RNA-binding protein									1.476
LS_5155917-0.1-mRNA-1	Q9SV68	Quinone-oxidoreductase-like protein						1.922			
LS_5162905-0.1-mRNA-1	P92990	Polygalacturonase non-catalytic protein						1.514			1.42
LS_5170630-0.3-mRNA-1	A8MS85	Transcription elongation factor SPT6						1.541			
LS_5175874-0.0-mRNA-1	Q9FMB0	Germin-like protein 1									0.605
LS_5180713-0.0-mRNA-1	A0A179HLJ8	Metal-dependent hydrolase IscR			immune process	system	common	1.559		1.381	1.769

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_5186164-0.0-mRNA-1	Q9Y6Y8	SEC23-interacting protein				2.438	0.585	0.493	
LS_5189307-0.2-mRNA-1	Q9LJE5	Yth domain-containing protein, putative						1.637	1.628
LS_5192881-0.0-mRNA-1	O04887	Pectinesterase		Glycan metabolism			0.411		
LS_5202102-0.1-mRNA-1	B5X574	Phosphoenolpyruvate carboxykinase		Carbohydrate biosynthesis	carbohydrate metabolic process			0.598	0.52
LS_5205236-0.1-mRNA-1	P80030	Enoyl-[acyl-carrier-protein] [NADH], chloroplastic	reductase	Lipid metabolism	lipid metabolic process	3.422		0.451	1.668
LS_52061-0.3-mRNA-1	B0F9L4	Golgin candidate 6					0.626	0.627	
LS_5208523-0.1-mRNA-1	Q8RWN5	Glycine-rich RNA-binding protein						0.706	
LS_5210896-0.1-mRNA-1	F1B283	Cinnamate 4-hydroxylase		Phenylpropanoid metabolism				0.646	
LS_5212941-0.1-mRNA-1	A5UTB6	Phosphoglycerate kinase		Carbohydrate degradation	carbohydrate catabolic process		0.731	0.681	

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_5213462-0.1-mRNA-1	Q9SCV4	Beta-galactosidase	carbohydrate metabolic process		1.894	
LS_5214221-0.1-mRNA-1	Q1AU57	N-lysine methyltransferase SEE1		0.487	0.377	0.448
LS_5324-0.3-mRNA-1	A5UTB6	Phosphoglycerate kinase	carbohydrate catabolic process	0.471	0.671	
LS_5326-0.5-mRNA-1	Q9SVM8	Glycine-rich RNA-binding protein	response to stress		0.666	
LS_53392-0.0-mRNA-1	Q94K73	Phenylalanine--tRNA ligase, mitochondrial		1.673		1.421
LS_53581-0.0-mRNA-1	Q9M5L0	60S ribosomal protein L35		1.272		
LS_53624-0.2-mRNA-1	F4KEY9	N-terminal acetyltransferase B complex auxiliary subunit NAA25			1.952	
LS_53710-0.0-mRNA-1	Q9LU46	ATP-dependent RNA helicase abstrakt			1.994	1.695
LS_54024-0.0-mRNA-1	P17407	21 kD protein		0.503		0.278
LS_55684-0.1-mRNA-1	Q96520	Peroxidase			0.365	0.543



Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_55739-0.1-mRNA-1	Q39444	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH							0.305
LS_56768-0.1-mRNA-1	A0A1I9LN01	Putative amidohydrolase ytcJ							2.343
LS_57284-0.1-mRNA-1	Q08506	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	Alkene biosynthesis	response to biotic stimulus	common	0.596	0.345		0.337
LS_58812-0.1-mRNA-1	Q0JGY1	60S ribosomal protein L5				11.331	4.254	0.301	4.503
LS_59803-0.3-mRNA-1	B6EUA9	Pre-mRNA-processing protein 40A							1.817
LS_60156-0.1-mRNA-1	Q7TPQ3	E3 ubiquitin-protein ligase SHPRH				0.406	0.453		3.869
LS_60664-0.0-mRNA-1	P25469	Histone H2A		chromosome organization	common	6.467			6.328
LS_62073-0.0-mRNA-1	A4QND5	60S ribosome subunit biogenesis protein NIP7				2.278	2.606		2.05

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_62756-0.2-mRNA-1	Q9SUV2	Putative sugar phosphate/phosphate translocator			2.784	2.452	2.189		
LS_6314-0.0-mRNA-1	Q9AT54	Scopoletin glucosyltransferase							1.396
LS_634-0.4-mRNA-1	A2RAR6	Putative glucan 1,3-beta-glucosidase A					0.707		0.537
LS_63585-0.1-mRNA-1	A0A072TH68	Kunitz type trypsin inhibitor 104					1.814		1.442
LS_63667-0.1-mRNA-1	Q84TD8	At1g67170-like protein			0.486	0.441	3.531	0.485	1.851
LS_6388-0.2-mRNA-1	F4I1G5	Cold acclimation protein COR413-TM1			3.372				2.883
LS_6396-0.3-mRNA-1	P93263	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	Amino-acid biosynthesis		2.662		0.589		2.018
LS_64093-0.1-mRNA-1	Q93YQ1	Regulatory-associated protein of TOR 1					2.948		

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_64540-0.1-mRNA-1	O80852	Phi class glutathione S-transferase			0.355	0.229	2.127
LS_64594-0.1-mRNA-1	P31726	Cysteine proteinase inhibitor			2.102	0.553	1.401
LS_64613-0.1-mRNA-1	Q09695	Related to PSR1-plasma membrane phosphatase required for sodium stress response			1.628		
LS_6504-0.0-mRNA-1	Q940M2	Alanine--glyoxylate aminotransferase 2, mitochondrial	Metabolic biosynthesis	intermediate photorespiration	0.646		
LS_6638-0.5-mRNA-1	Q8L5V0	DNA-directed RNA polymerase subunit			0.495	0.574	0.511
LS_66474-0.1-mRNA-1	Q8L7N0	T-complex protein 1 subunit zeta		protein folding	2.332		

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_6669-0.2- mRNA-1	Q9LP24	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein, putative							1.984
LS_66757- 0.1-mRNA-1	Q9LZ06	Lambda class glutathione S-transferase					0.651	0.274	
LS_67178- 0.2-mRNA-1	P49211	60S ribosomal protein L32					1.365	1.328	1.587
LS_6765-0.3- mRNA-1	Q93XX8	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 3							1.448
LS_68148- 0.1-mRNA-1	A2RVJ8	Myosin-H heavy chain					1.528		
LS_6820-0.2- mRNA-1	Q6QNU4	DNA damage-binding protein 1	Protein modification	protein modification process	common	0.476	0.528		
LS_68483- 0.1-mRNA-1	O24428	Acyl-[acyl-carrier-protein] desaturase	Lipid metabolism		common		0.67	0.629	0.636
LS_6944-0.0- mRNA-1	Q9LP24	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein, putative							2.606

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_69875-0.1-mRNA-1	P48522	Cinnamate 4-hydroxylase	Phenylpropanoid metabolism				0.709		
LS_70045-0.2-mRNA-1	Q8IY67	SAP DNA-binding domain-containing protein				2.888	2.353	3.724	
LS_70308-0.1-mRNA-1	Q9LVT1	Putative CC-NBS-LRR protein					3.447	2.512	
LS_70688-0.1-mRNA-1	C6ZJZ3	Eukaryotic translation initiation factor 4E	Glycan metabolism				1.467		
LS_70965-0.3-mRNA-1	O23593	Nuclear RNA-binding family protein				0.453	0.477		
LS_72581-0.1-mRNA-1	POC7P7	Glycosyltransferase		small molecule metabolic process	common	0.649	0.566	0.568	
LS_7276250-0.0-mRNA-1	POCG89	Histone H4		chromosome organization	common	0.599			
LS_73410-0.1-mRNA-1	Q9S7M9	Transmembrane emp24 domain-containing protein p24beta2					1.437	1.509	

LS_73746-0.1-mRNA-1	P34893	10 kDa heat shock protein, mitochondrial						0.721		
LS_7377-0.2-mRNA-1	Q9LDX1	Protein SUPPRESSOR OF GENE SILENCING 3 homolog						0.444	0.493	1.613
LS_76108-0.1-mRNA-1	Q8W034	Putative heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 1-like				mRNA processing	common	1.984		4.071
LS_7629389-0.0-mRNA-1	P30172	Actin, alpha skeletal muscle								0.376
LS_76364-0.1-mRNA-1	Q41951	Tonoplast intrinsic protein						0.525		2.226
LS_777-0.1-mRNA-1	P46254	Heat shock proteinLow molecular weight heat shock proteinMitochondrial small heat shock protein 22						1.262	1.305	1.321
LS_77717-0.1-mRNA-1	Q8RXN0	ABC transporter G family member 11							2.219	2.176

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_7781-0.1- mRNA-1	Q8GU88	Pleiotropic drug resistance protein 1							1.631
LS_78091- 0.0-mRNA-1	P34823	Elongation factor 1-alpha		protein metabolic process	common	0.748	1.361	0.457	1.618
LS_7833-0.2- mRNA-1	Q94C70	Nucleobase-ascorbate protein	transporter-like			1.735			0.439
LS_7933-0.4- mRNA-1	Q8H0P8	RNA-binding family protein isoform 1						0.707	
LS_7957-0.0- mRNA-1	Q9FMY1	Cytochrome P450 family protein		cell organization	wall common	1.965	2.233	1.581	
LS_8235-0.2- mRNA-1	A0RU76	Threonine--tRNA ligase				1.796	1.699	1.671	
LS_8270-0.2- mRNA-1	Q9LVG2	APETALA2-like protein				1.866			2.06
LS_84726- 0.0-mRNA-1	Q9SE96	GLABRA2 expression modulator				0.442			
LS_88471- 0.0-mRNA-1	A0AT31	Non-specific lipid-transfer protein						0.713	
LS_88568- 0.1-mRNA-1	P22195	Peroxidase						2.186	

Chapitre IV – Etude de la déshydratation des embryons somatiques 8S de mélèze hybride *Larix x eurolepis*

LS_88858-0.1-mRNA-1	O80763	DC1 domain-containing protein							0.623	
LS_9090-0.6-mRNA-1	P32518	Deoxyuridine nucleotidohydrolase	5'-triphosphate	Pyrimidine metabolism					0.544	
LS_9216-0.4-mRNA-1	O23290	60S ribosomal protein L44							1.353	
LS_96501-0.0-mRNA-1	COLGT6	LRR receptor-like kinase EFR	serine/threonine-protein		response to biotic stimulus	common	2.085	1.322	1.722	2.496
LS_96506-0.0-mRNA-1	P26413	Heat shock protein 70			response to stress;protein folding	common				0.589
LS_9685-0.2-mRNA-1	Q9LYK9	40S ribosomal protein			translation	common	1.912	1.489		2.164
LS_98211-0.1-mRNA-1	Q8S528	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial		Alcohol metabolism			1.509	1.433		1.545
LS_9850-0.0-mRNA-1	A4W5F0	Putative uncharacterized protein Sb01g040090							2.378	2.813



LS_98697- 0.0-mRNA-1	P14678	Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein			5.308	6.906	3.087
LS_98822- 0.1-mRNA-1	O65049	Thioredoxin H-type	cellular detoxification	oxidant	0.59		

---

## References

- Allagulova C, Avalbaev A, Fedorova K, Shakirova F** (2020) Methyl jasmonate alleviates water stress-induced damages by promoting dehydrins accumulation in wheat plants. *Plant Physiol. Biochem.* 155, 676-682.
- Alscher R G, Erturk N, Heath L S** (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 53(372), 1331-1341.
- Amara I, Zaidi I, Masmoudi K, Ludevid M, Pagès M, Goday A, Brini F** (2014) Insights into late embryogenesis abundant (LEA) proteins in plants: from structure to the functions. *Am. J. Plant Sci.* 5, 3440–3455.
- Angelovici R, Galili G, Fernie A R** (2010) Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends Plant Sci.* 15, 211–218.
- Attree S M, Pomeroy M K, Fowke L C** (1995) Development of white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) somatic embryos during culture with abscisic acid and osmoticum and their tolerance to drying and frozen storage. *J. Exp. Bot.* 46,433-439.
- Balbuena T S, Silveira V, Junqueira M, Dias L L C, Santa-Catarina C, Shevchenko A, Floh E I S** (2009) Changes in the 2-DE protein profile during zygotic embryogenesis in the Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*). *J. Proteomics* 72, 337–352.
- Ball P** (2008) Water as an active constituent in cell biology. *Chem. Rev.* 108, 74-108.
- Ballesteros D, Pritchard H W, Walters C** (2020) Dry architecture: towards the understanding of the variation of longevity in desiccation-tolerant germplasm. *Seed Sci. Res.* 30, 142-155.
- Bewley J D, Bradford K J, Hilhorst H W M, Nonogaki H** (2013) *Seeds: physiology of development, germination and dormancy*, 3rd edn. Springer Science & Business Media, New York, NY, 381.
- Bhadouriya S L, Mehrotra S, Basantani M K, Loake G J, Mehrotra R** (2021) Role of chromatin architecture in plant stress responses: an update. *Front. Plant Sci.* 11, 603380.
- Bomal C, Le V Q, Tremblay F M** (2002) Induction of tolerance to fast desiccation in black spruce (*Picea mariana*) somatic embryos: relationship between partial water loss, sugars, and dehydrins. *Physiol. Plant.* 115, 523-530.
- Bray E** (1993) Molecular response to water deficit. *Plant Physiol.* 103, 1035-1040.
- Businge E, Bygdell J, Wingsle G, Moritz T, Egertsdotter U** (2013) The effect of carbohydrates and osmoticum on storage reserve accumulation and germination of Norway spruce somatic embryos. *Physiol. Plant.* 149(2), 273-85.
- Brunoni F, Collani S, Casanova-Sáez R, Šimura J, Karady M, Schmid M, Ljung K, Bellini C** (2020) Conifers exhibit a characteristic inactivation of auxin to maintain tissue homeostasis. *New Phytol.* 226(6), 1753-1765.
- Brunoni F, Pěňčík A, Žukauskaitė A, Ament A, Kopečná M, Collani S, Kopečný D, Novák O** (2023) Amino acid conjugation of oxIAA is a secondary metabolic regulation involved in auxin homeostasis. *New Phytol.* 238(6), 2264-2270.
- Casimiro-Soriguer C S, Muñoz-Mérida A, Pérez-Pulido A J** (2017) Sma3s: A universal tool for easy functional annotation of proteomes and transcriptomes. *PROTEOMICS* 17(12): 1700071.
- Chandra J, Keshavkant S** (2018) Desiccation-induced ROS accumulation and lipid catabolism in recalcitrant *Madhuca latifolia* seeds. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 24(1), 75-87.

- Chapman K D, Dyer J M, Mullen R T** (2012) Biogenesis and functions of lipid droplets in plants: Thematic Review Series: Lipid Droplet Synthesis and Metabolism: from Yeast to Man. *J. Lipid Res.* 53(2), 215-226.
- Chen P, Jung N U, Giarola V, Bartels D** (2020) The dynamic responses of cell walls in resurrection plants during dehydration and rehydration. *Front. Plant Sci.* 10:1698.
- Crowe J H, Hoekstra F A, Crowe L M** (1992) Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 54, 579–599.
- Dronne S, Label P, Lelu M A** (1997) Desiccation decreases abscisic acid content in hybrid larch (*Larix X leptoeuropaea*) somatic embryos. *Physiol. Plant.* 99, 433–438.
- Dumont-BéBoux N, Mazari A, Livingston N J, von Aderkas P, Becwar M R, Percy R E, Pond S E** (1996), Water relations parameters and tissue development in somatic and zygotic embryos of three pinaceous conifers. *Am. J. Bot.* 83, 992-996.
- Eliášová K, Konrádová H, Dobrev P I, Motyka V, Lomenech A M, Fischerová L, Lelu-Walter M A, Vondráková Z, Teyssier C** (2022) Desiccation as a post-maturation treatment helps complete maturation of Norway spruce somatic embryos: carbohydrates, phytohormones and proteomic status. *Front. Plant Sci.* 13, 823617.
- El-Maarouf-Bouteau H** (2022) The seed and the metabolism regulation. *Biology.* 11(2), 168.
- Find J I** (1997) Changes in endogenous ABA levels in developing somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in relation to maturation medium, dessication and germination. *Plant Sci.* 128,75-83.
- Finkelstein R R, Gampala S S L, Rock C D** (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14(SUPPL.), S15-S45.
- Fischerová L, Gemperlová L, Cvikrová M, Matušíková I, Moravčíková J, Gerši Z, Malbeck J, Kuderna J, Pavlíčková J, Motyka V, Eliášová K, Vondráková Z** (2022) The humidity level matters during the desiccation of Norway spruce somatic embryos. *Front. Plant Sci.* 13.
- Flinn B S, Roberts D R, Newton C H, Cyr D R, Webster F B, Taylor I E P** (1993) Storage protein gene expression in zygotic and somatic embryos of interior spruce. *Physiol. Plant.* 89, 719-730.
- Gautier F, Eliášová K, Leplé J C, Vondráková Z, Lomenech A M, Le Metté C, Label P, Costa G, Trontin J F, Teyssier C, Lelu-Walter M A** (2018) Repetitive somatic embryogenesis induced cytological and proteomic changes in embryogenic lines of *Pseudotsuga menziesii* [Mirb.]. *BMC Plant Biol.* 18(1), 164-188
- Gösslová M, Svobodová H, Lipavská H, Albrechtová J, Vreugdenhil D** (2001) Comparing carbohydrate status during norway spruce seed development and somatic embryo formation. *In vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 37, 24-28.
- Graham I A** (2008) Seed storage oil mobilization. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 115–142.
- Graça J** (2015) Suberin: the biopolyester at the frontier of plants. *Front Chem.* 30, 3-62.
- Gutmann M, von Aderkas P, Label P, Lelu M A** (1996) Effects of abscisic acid on somatic embryo maturation of hybrid larch. *J. Exp. Bot.* 47, 1905–1917.
- Hakman I** (1993). Embryology in Norway spruce (*Picea abies*). An analysis of the composition of seed storage proteins and deposition of storage reserves during

- seed development and somatic embryogenesis. *Physiol. Plant.* 87, 148–159.
- Hartmann H, Trumbore S** (2016) Understanding the roles of nonstructural carbohydrates in forest trees – from what we can measure to what we want to know. *New Phytol.* 211, 386-403.
- Hayashi K I, Arai K, Aoi Y, Tanaka Y, Hira H, Guo R, Hu Y, Ge C, Zhao Y, Kasahara H, Fukui K** (2021) The main oxidative inactivation pathway of the plant hormone auxin. *Nature Communications* 12(1), 6752.
- Hazubska-Przybył T, Wawrzyniak M, Obarska A, Bojarczuk K** (2015) Effect of partial drying and desiccation on somatic seedling quality in Norway and Serbian spruce. *Acta Physiol. Plant.* 37, 1735.
- Hilhorst H, Finch-Savage W, Buitink J, Bolingue W, Leubner-Metzger G** (2010) Dormancy in plant seeds dormancy and resistance in harsh environments, in: Lubzens E, Cerda J, Clark M (Eds.), Springer Berlin / Heidelberg, pp. 43-67.
- Hoekstra F A, Golovina E A, Buitink J** (2001a) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci.* 6, 431–438.
- Hoekstra F A, Golovina E A, Tetteroo F A, Wolkers W F** (2001b) Induction of desiccation tolerance in plant somatic embryos: how exclusive is the protective role of sugars? *Cryobiol.* 43(2), 140-150.
- Hogberg K A, Bozhkov P V, Gronroos R, von Arnold S** (2001) Critical factors affecting *ex vitro* performance of somatic embryo plants of *Picea abies*. *Scand. J. For. Res.* 16, 295-304.
- Högberg K A, Ekberg I, Norell L, von Arnold S** (1998) Integration of somatic embryogenesis in a tree breeding programme: a case study with *Picea abies*. *Can. J. For. Res.* 28, 1536-1545.
- Huang H, Møller I M, Song S Q** (2012) Proteomics of desiccation tolerance during maize embryos. *J. Proteomics* 86, 1-15.
- Jayasankar S, Van Aman M, Cordts J, Dhekney S, Li Z T, Gray J** (2005) Low temperature storage of suspension culture-derived grapevine somatic embryos and regeneration of plants. *In vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 41, 752-756.
- Jing D L, Zhang J W, Xia Y, Kong L S, OuYang F Q, Zhang S G, Wang J** (2017) Proteomic analysis of stress-related proteins and metabolic pathways in *Picea asperata* somatic embryos during partial desiccation. *Plant Biotechnol. J.* 15, 27–38.
- Kagaya Y, Okuda R, Ban A, Toyoshima R, Tsutsumida K, Usui H, Yamamoto A, Hattori T** (2005) Indirect ABA-dependent regulation of seed storage protein genes by FUSCA3 transcription factor in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 46(2), 300-311.
- Kalemba E M, Janowiak F, Pukacka S** (2009) Desiccation tolerance acquisition in developing beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds: The contribution of dehydrin-like protein. *Trees – Struct. Funct.* 23(2), 305-315.
- Kalemba E M, Pukacka S** (2007) Possible roles of LEA proteins and sHSPs in seed protection: a short review. *Biol. Lett.* 44(1), 3–16.
- Kermode A R, Finch-Savage B E** (2002) Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. CABI Books 149–184.
- Klimaszewska K, Bernier-Cardou M, Cyr D R, Sutton B C S** (2000) Influence of gelling agents on culture medium gel strength, water availability, tissue water potential, and maturation response in embryogenic cultures of *Pinus strobus* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 36, 279-286.
- Klimaszewska K, Morency F, Jones-Overton C, Cooke J** (2004) Accumulation

- pattern and identification of seed storage proteins in zygotic embryos of *Pinus strobus* and in somatic embryos from different maturation treatments. *Physiol. Plant.* 121, 682-690.
- Konrádová H, Grigova M, Lipavska H** (2003) Cold-induced accumulation of raffinose family oligosaccharides in somatic embryos of norway spruce (*Picea abies*). *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 39(4), 425-427.
- Koornneef M, Bentsink L, Hilhorst H** (2002) Seed dormancy and germination. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5(1), 33-36.
- Kuzmin D A, Feranchuk S I, Sharov V V, Cybin A N, Makolov S V, Putintseva Y A, Oreshkova N V, Krutovsky K V** (2019) Stepwise large genome assembly approach: a case of Siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb). *BMC Bioinform.* 20(1), 37.
- Label P, Lelu M A** (2000) Exogenous abscisic acid fate during maturation of hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*) somatic embryos. *Physiol. Plant.* 109(4), 456-462.
- Lecouteux C, Tessereau H, Florin B, Courtois D, Petiard V** (1992) Preservation of carrot (*Daucus carota* L.) somatic embryos by dehydration after pretreatment with sucrose. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 314(III), 423-428.
- Lelu M A, Label P** (1994) Changes in the levels of abscisic acid and its glucose ester conjugate during maturation of hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*) somatic embryos, in relation to germination and plantlet recovery. *Physiol. Plant.* 92, 53-60.
- Lelu M A, Klimaszewska K, Pflaum G, Bastien C** (1995) Effect of maturation duration on desiccation tolerance in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea* Dengler). *In Vitro Cell Dev. Biol.* 31, 15–20.
- Lelu-Walter M A, Pâques L E** (2009) Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix x* and *Larix x marschlinii*). *Perspectives for breeding.* *Ann. For. Sci.* 66, 104.
- Lelu-Walter M A, Thompson D, Harvengt L, Sanchez L, Toribio M, Pâques L E** (2013) Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction. *Tree Genet. Genomes* 9, 883-899.
- Leopold A C, Sun W Q, Bernal-Lugo I** (1994) The glassy state in seeds: analysis and function. *Seed Sci. Res.* 4, 267–274.
- Leprince O, Bronchart R, Deltour R** (1990) Changes in starch and soluble sugars in relation to the acquisition of desiccation tolerance during maturation of *Brassica campestris* seed. *Plant, Cell Env.* 13, 539-546.
- Leprince O, Pellizzaro A, Berriri S, Buitink J** (2017) Late seed maturation: drying without dying. *J. Exp. Bot.* 68, 827–841.
- Leprince O, Hendry G A F, Mckersie B D** (1993) The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Sci. Res.* 3, 231-246.
- Lipavská H, Konrádová H** (2004) Somatic embryogenesis in conifers: The role of carbohydrate metabolism. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 40(1), 23 -30.
- Liu Q, Luo L, Zheng L** (2018) Lignins: biosynthesis and biological functions in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 19(2), 335.
- Luo X, Xu J, Zheng C, Yang Y, Wang L, Zhang R, Ren X, Wei S, Aziz U, Du J, Liu W, Tan W, Shu K** (2022) Abscisic acid inhibits primary root growth by impairing ABI4-mediated cell cycle and auxin biosynthesis. *Plant Physiol.* 191(1), 265-279.
- Maruyama T E, Hosoi Y** (2012) Post-maturation treatment improves and synchronizes somatic embryo germination of three species of Japanese pines. *Plant Cell Tiss.*

- Org. Cult. 110, 45-52.
- Marescal O, Cheeseman I M** (2020) Cellular mechanisms and regulation of quiescence. *Dev. Cell.* 55(3), 259-271.
- Morel A, Trontin J F, Corbineau F, Lomenech A M, Beaufour M, Reymond I, Le Metté C, Ader K, Harvengt L, Cadene M, Label P, Teyssier C, Lelu-Walter M A** (2014) Cotyledonary somatic embryos of *Pinus pinaster* Ait. most closely resemble fresh, maturing cotyledonary zygotic embryos: biological, carbohydrate and proteomic analyses. *Planta* 240, 1075-1095.
- Morse M, Rafudeen M, Farrant J M** (2011) An overview of the current understanding of desiccation tolerance in the vegetative tissues of higher plants. *Adv. Bot. Res.* 57, 319–347.
- Müller K, Dobrev P I, Pěňčík A, Hošek P, Vondráková Z, Filepová R, Malínská K, Brunoni F, Helusová L, Moravec T, Retzer K, Harant K, Novák O, Hoyerová K, Petrášek J** (2021) DIOXYGENASE FOR AUXIN OXIDATION 1 catalyzes the oxidation of IAA amino acid conjugates. *Plant Physiol.* 187(1), 103-115.
- Navarro B V, Elbl P, De Souza A P, Jardim V, de Oliveira L F, Macedo A F, Dos Santos A L W, Buckeridge M S, Floh E I S** (2017) Carbohydrate-mediated responses during zygotic and early somatic embryogenesis in the endangered conifer, *Araucaria angustifolia*. *PLoS One.* 12(7): e0180051.
- Obendorf R, Górecki R** (2012) Soluble carbohydrates in legume seeds. *Seed Sci. Res.* 22(4), 219-242.
- O'Brien T P, Feder N, McCully M E** (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59(2), 368-373.
- Oliver M J, Farrant J M, Hilhorst H W M, Mundree S, Williams B, Bewley J D** (2020) Desiccation tolerance: avoiding cellular damage during drying and rehydration. *Annu. Rev. Plant Biol.* 71, 435-460.
- Park Y S** (2002) Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. *Ann. For. Sci.* 59, 651-656.
- Parwez R, Aftab T, Gill S S, Naeem M** (2022) Abscisic acid signaling and crosstalk with phytohormones in regulation of environmental stress responses. *Environ. Exp. Bot.* 104885.
- Pashkovskiy P P, Vankova R, Zlobin I E, Dobrev P, Kartashov A V, Ivanova A I, Ivanov V P, Marchenko S I, Nartov D I, Ivanov Y V, Kuznetsov V V** (2022) Hormonal responses to short-term and long-term water deficit in native Scots pine and Norway spruce trees. *Environ. Exp. Bot.* 195, 104789.
- Pond S E, von Aderkas P, Bonga J M** (2002) Improving tolerance of somatic embryos of *Picea glauca* to flash desiccation with a cold treatment (desiccation after cold acclimation). *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 38, 334-341.
- Prerostova S, Dobrev P I, Knirsch V, Jarosova J, Gaudinova A, Zupkova B, Prášil I T, Janda T, Brzobohatý B, Skalák J, Vankova R** (2021) Light Quality and Intensity Modulate Cold Acclimation in Arabidopsis. *Int. J. Mol. Sci.* 22(5), 2736.
- Pullman G S, Johnson S, Peter G, Cairney J, Xu N** (2003) Improving loblolly pine somatic embryo maturation: comparison of somatic and zygotic embryo morphology, germination, and gene expression. *Plant Cell. Rep.* 21, 747-758.
- Riemann M, Dhakarey R, Hazman M, Miro B, Kohli A, Nick P** (2015) Exploring jasmonates in the hormonal network of drought and salinity responses. *Front. Plant Sci.* 6, 1077.
- Roberts D R, Sutton B C S, Flinn B S** (1990) Synchronous and high frequency

- germination of interior spruce somatic embryos following partial drying at high relative humidity. *Can. J. Bot.* 68,1086-1090.
- Roberts D R, Lazarof W R, Webster F B** (1991) Interaction between maturation and high relative treatments and their effects on germination of sitka spruce somatic embryos. *J. Plant Physiol.* 138,1-6.
- Sengupta S, Mukherjee S, Basak P, Majumder A L** (2015) Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants. *Front. Plant Sci.* 26(6), 656.
- Silveira V, Santa-Catarina C, Balbuena T S, Moraes F M S, Ricart C A O, Sousa M V, Guerra M P, Handro W, Floh E I S** (2008). Endogenous abscisic acid and protein contents during seed development of *Araucaria angustifolia*. *Biol. Plant.* 52, 101–104.
- Smolikova G, Leonova T, Vashurina N, Frolov A, Medvedev S** (2020) Desiccation tolerance as the basis of long-term seed viability. *Int. J. Mol. Sci.* 22(1), 101.
- Swamy P M, Smith B N** (1999) Role of abscisic acid in plant stress tolerance. *Current Sci.* 76(9), 1220-1227.
- Szczygieł K, Hazubska-Przybył T, Bojarczuk K** (2007) Somatic embryogenesis of selected coniferous tree species of the genera *Picea*, *Abies* and *Larix*. *Acta Soc. Bot. Pol.* 7(1), 7-15.
- Tetteroo A A F, Hoekstra F A, Karssen C M** (1995) Induction of complete desiccation tolerance in carrot (*Daucus carota*) embryoids. *J. Plant Physiol.* 145(3), 349-356.
- Teyssier C, Grondin C, Bonhomme L, Lomenech A M, Vallance M, Morabito D, Label P, Lelu-Walter M A** (2011) Increased gelling agent concentration promotes somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix x eurolepis*): a 2-DE proteomic analysis. *Physiol. Plant.* 141, 152–165.
- Teyssier C, Maury S, Beaufour M, Grondin C, Delaunay A, Le Metté C, Ader K, Cadene M, Label P, Lelu-Walter M A** (2014) In search of markers for somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix x eurolepis*): global DNA methylation and proteomic analyses. *Physiol. Plant.* 150, 271-291.
- Tillman-Sutela E, Kauppi A** (2000) Structures contributing to the completion of conifer seed germination. *Trees* 14, 191-197.
- Tuteja N** (2007) Abscisic acid and abiotic stress signaling. *Plant Signal. Behav.* 2(3), 135-138.
- Vaghela B, Vashi R, Rajput K, Joshi R** (2022) Plant chitinases and their role in plant defense: A comprehensive review. ***Enzyme Microb.* 159, 110055.**
- Välimäki S, Teyssier C, Tikkinen M, Delile A, Boizot N, Varis S, Lelu-Walter M A, Aronen T** (2022) Norway spruce somatic embryogenesis benefits from proliferation of embryogenic tissues on filter discs and cold storage of cotyledonary embryos. ***Front. Plant Sci.* 13, 1031686.**
- van der Schoot C, Rinne P L H** (2011) Dormancy cycling at the shoot apical meristem: Transitioning between self-organization and self-arrest. *Plant Sci.* 180(1), 120-131.
- van Zanten M, Carles A, Li Y, Soppe W J** (2012) Control and consequences of chromatin compaction during seed maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav.* 7(3), 338-341.
- Vicré M, Farrant J M, Driouich A** (2004) Insights into the cellular mechanisms of desiccation tolerance among angiosperm resurrection plant species. *Plant Cell Env.* 27, 1329-1340.

- Vizcaíno J A, Csordas A, del-Toro N, Dianas J A, Griss J, Lavidas I, Mayer G, Perez-Riverol Y, Reisinger F, Ternent T, Xu Q W, Wang R, Hermjakob H** (2016) 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Res.* 44(D1), D447-D456.
- von Aderkas P, Rohr R, Sundberg B, Gutmann M, Dumont-BéBoux N, Lelu M A** (2002) Abscisic acid and its influence on development of the embryonal root cap, storage product and secondary metabolite accumulation in hybrid larch somatic embryos. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 69, 111-120.
- von Aderkas P, Teyssier C, Charpentier J P, Gutmann M, Pâques L, Le Metté C, Ader K, Label P, Kong L, Lelu-Walter M A** (2015) Effect of light conditions on anatomical and biochemical aspects of somatic and zygotic embryos of hybrid larch (*Larix x marschlinsi*). *Ann. Bot.* 115, 605-615.
- Von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J, Filonova L** (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 69(3), 233-249.
- Vondrakova Z, Dobrev P I, Pesek B, Fischerova L, Vagner M, Motyka V** (2018) Profiles of endogenous phytohormones over the course of norway spruce somatic embryogenesis. *Front. Plant Sci.* 9, 1283.
- Vondráková Z, Pešek B, Malbeck J, Bezděčková L, Vondrák T, Fischerová L, Eliášová K** (2020) Dormancy breaking in *Fagus sylvatica* seeds is linked to formation of abscisic acid-glucosyl ester. *New Forests* 51, 671-688.
- Wang Y, Mostafa S, Zeng W, Jin B** (2021) Function and mechanism of jasmonic acid in plant responses to abiotic and biotic stresses. *Int. J. Mol. Sci.* 22(16), 8568.
- Wang W Q, Liu S J, Song S Q, Møller I M** (2015) Proteomics of seed development, desiccation tolerance, germination and vigor. *Plant Physiol. Biochem.* 86, 1-15.
- Walters C, Koster K L** (2007) Structural dynamics and desiccation damage in plant reproductive organs. In: Jenks M.A., Wood A.J., editors. *Plant Desiccation Tolerance*. Blackwell; Ames, IA, USA, 251–280.
- Wehmeyer N, Vierling E** (2000) The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. *Plant Physiol.* 122(4), 1099-1108.
- Wehmeyer N, Hernandez L, Finkelstein R, Vierling E** (1996) Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. *Plant Physiol.* 112, 747-757.
- Yang J, Duan G, Li C, Liu L, Han G, Zhang Y, Wang C** (2019) The crosstalks between jasmonic acid and other plant hormone signaling highlight the involvement of jasmonic acid as a core component in plant response to biotic and abiotic stresses. *Front. Plant Sci.* 10, 1349.
- Yeung E C, Stasolla C, Kong L** (1998) Apical meristem formation during zygotic embryo development of white spruce. *Can. J. Bot.* 76(5), 751-761.
- Yulianti, Putri K P, Yuniarti N, Aminah A, E Suita, Danu, Sudrajat D J, Nurhasybi, Syamsuwida D** (2020) Seed handling of specific forest tree species: Recalcitrant and intermediate seed. *OP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 522, 012015.
- Zhang H, Han W, De Smet I, Talboys P, Loya R, Hassan A, Rong H, Jürgens G, Paul Knox J, Wang M H** (2010) ABA promotes quiescence of the quiescent centre and suppresses stem cell differentiation in the *Arabidopsis* primary root meristem. *Plant J.* 64(5), 764-774.
- Zwack P J, Rashotte A M** (2015) Interactions between cytokinin signalling and abiotic stress responses. *J. Exp. Bot.* 66, 4863-4871.



## Conclusions du chapitre IV

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons montré que la température n'influence pas la cinétique de la perte en eau des ES soumis à une déshydratation sous forte HR (98%). Nos résultats ainsi que ceux de la littérature nous ont donc permis de privilégier l'application d'une déshydratation à +4°C sur les ES de mélèze hybride.

Dans la deuxième partie du chapitre, nous avons étudié les effets de trois traitements de déshydratation sous différentes HR par une approche multi-échelles (biologique, histologique, biochimique, moléculaire). Une déshydratation sous 98% HR a entraîné l'amélioration de la germination, la réduction de la teneur en acide abscissique (ABA), la synthèse de saccharose et des modifications histologiques i.e. diminution des grains d'amidon qui a été confirmée par les analyses biochimiques. Cependant, ce traitement n'a pas permis de réduire la teneur en eau à un niveau équivalent à celui des EZ secs, contrairement à une déshydratation sous 59% HR. Toutefois, cette dernière a réduit le taux de germination et n'a pas permis l'induction de modifications biochimiques comme observées chez les ES déshydratés sous 98% HR. Par ailleurs, les analyses protéomiques suggèrent que la déshydratation, quel que soit l'HR, induit une modification du profil protéique marquée par l'augmentation de l'abondance des protéines impliquées dans le métabolisme primaire, et la diminution de celles impliquées dans le développement des ES et la croissance cellulaire. Les résultats protéomiques mettent aussi en évidence que la déshydratation sous 98% HR est bénéfique à une orientation du métabolisme des ES allant vers l'acquisition de la tolérance à la déshydratation tandis qu'une déshydratation sous 59% HR est perçue comme un signal induisant des réponses à des stress biotiques et/ou abiotiques. La réponse de ces ES déshydratés sous 59% HR est alors orientée vers l'activation des mécanismes de défenses tandis que les modifications favorisant la tolérance à la déshydratation sont absentes ou réprimées. Un traitement combinant successivement les deux déshydratations a permis de minimiser les effets négatifs de la déshydratation sous 59% HR sur la germination et la conversion en plantes des ES tout en réduisant leur teneur en eau à un niveau équivalent aux EZ secs. L'effet bénéfique de ce traitement sur la germination par rapport à l'application d'une déshydratation sous 59% HR seule a pu être expliqué par des modifications biochimiques (réduction des teneurs en ABA, en amidon, synthèse de saccharose) et l'amplification des processus biologiques impliqués dans la préparation à la germination et dans la perception et la réponse au traitement.

Les études menées dans ce chapitre constituent pour la première fois un inventaire des modifications qualitatives et quantitatives survenant suite à la déshydratation des ES de mélèze hybride à plusieurs niveaux d'études (Figure IV.15). De nombreuses études menées chez les ES de conifères ont déjà décrit des modifications au niveau biologique (germination, plants) et biochimiques (protéines, glucides) lors de déshydratations sous HR élevée. Néanmoins, la caractérisation multi-échelles des ES déshydratés combinant deux déshydratations successives n'a jamais été réalisée et constitue l'originalité de ce travail. Enfin, à notre connaissance aucune étude sur la déshydratation des ES de conifères n'est parvenue à obtenir des taux de germination

et de conversion en plante aussi élevés suite à une déshydratation sous HR réduite.

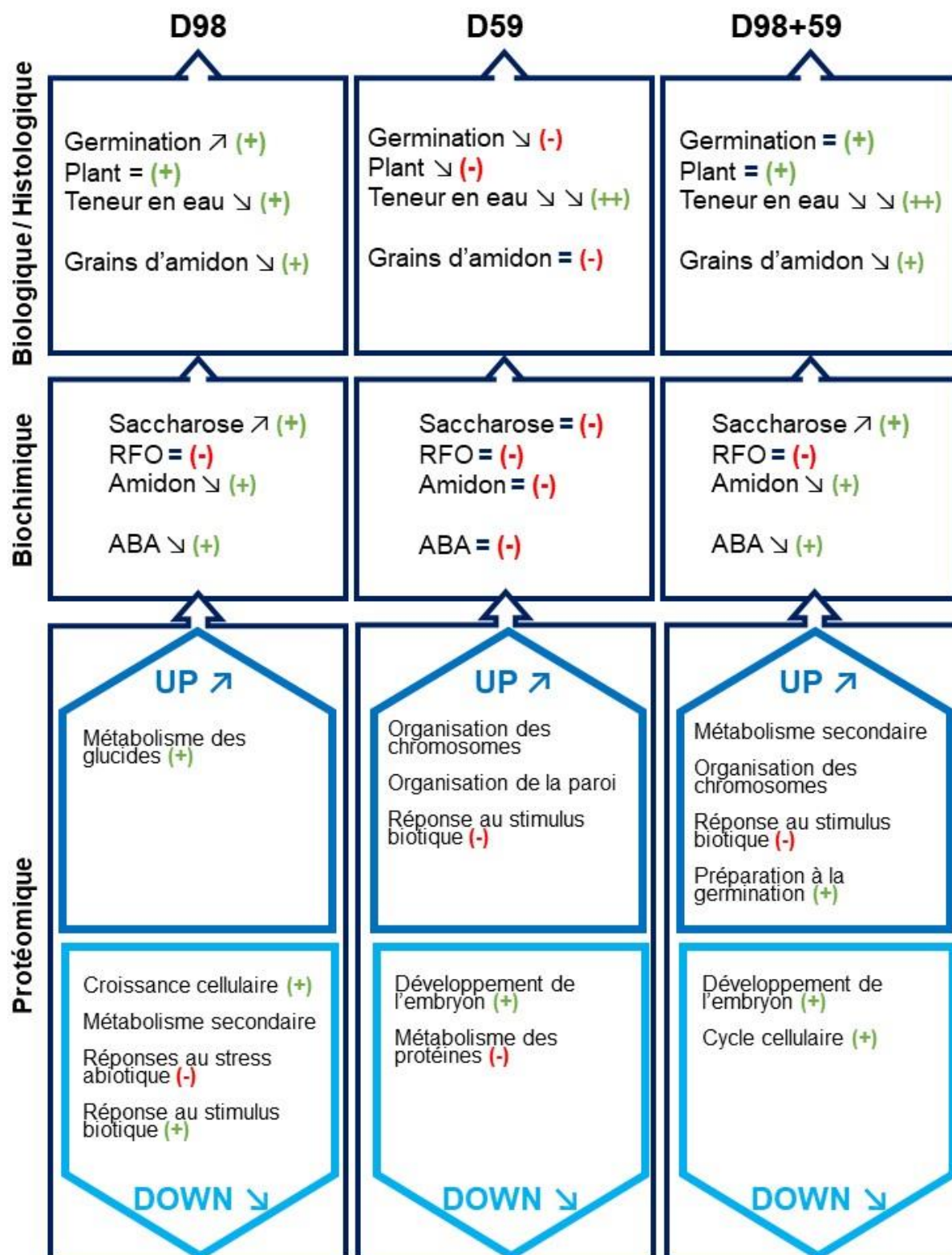


Figure IV.15. Modifications mises en place suite à la déshydratation des embryons somatiques de mélèze hybride sous 98% d'humidité relative (D98), 59% (D59) et 98% suivi de 59% d'humidité relative (D98+59) : les flèches représentent les variations par rapport aux embryons somatiques témoins de 8 semaines : (↘) diminution ; (↗) augmentation ; (=) pas de variation. Les symboles représentent les effets positif ou négatif de la déshydratation : (+) positif ; (-) négatif.

## Références

- Allagulova C, Avalbaev A, Fedorova K, Shakirova F** (2020) Methyl jasmonate alleviates water stress-induced damages by promoting dehydrins accumulation in wheat plants. *Plant Physiol. Biochem.* 155, 676-682.
- Alscher R G, Erturk N, Heath L S** (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 53(372), 1331-1341.
- Amara I, Zaidi I, Masmoudi K, Ludevid M, Pagès M, Goday A, Brini F** (2014) Insights into late embryogenesis abundant (LEA) proteins in plants: from structure to the functions. *Am. J. Plant Sci.* 5, 3440–3455.
- Angelovici R, Galili G, Fernie A R** (2010) Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends Plant Sci.* 15, 211–218.
- Attree S M, Pomeroy M K, Fowke L C** (1995) Development of white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) somatic embryos during culture with abscisic acid and osmoticum and their tolerance to drying and frozen storage. *J. Exp. Bot.* 46,433-439.
- Balbuena T S, Silveira V, Junqueira M, Dias L L C, Santa-Catarina C, Shevchenko A, Floh E I S** (2009) Changes in the 2-DE protein profile during zygotic embryogenesis in the Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*). *J. Proteomics* 72, 337–352.
- Ball P** (2008) Water as an active constituent in cell biology. *Chem. Rev.* 108, 74-108.
- Ballesteros D, Pritchard H W, Walters C** (2020) Dry architecture: towards the understanding of the variation of longevity in desiccation-tolerant germplasm. *Seed Sci. Res.* 30, 142-155.
- Bewley J D, Bradford K J, Hilhorst H W M, Nonogaki H** (2013) *Seeds: physiology of development, germination and dormancy*, 3rd edn. Springer Science & Business Media, New York, NY, 381.
- Bhadouriya S L, Mehrotra S, Basantani M K, Loake G J, Mehrotra R** (2021) Role of chromatin architecture in plant stress responses: an update. *Front. Plant Sci.* 11, 603380.
- Bomal C, Le V Q, Tremblay F M** (2002) Induction of tolerance to fast desiccation in black spruce (*Picea mariana*) somatic embryos: relationship between partial water loss, sugars, and dehydrins. *Physiol. Plant.* 115, 523-530.
- Bray E** (1993) Molecular response to water deficit. *Plant Physiol.* 103, 1035-1040.
- Brunoni F, Collani S, Casanova-Sáez R, Šimura J, Karady M, Schmid M, Ljung K, Bellini C** (2020) Conifers exhibit a characteristic inactivation of auxin to maintain tissue homeostasis. *New Phytol.* 226(6), 1753-1765.
- Brunoni F, Pěňčík A, Žukauskaitė A, Ament A, Kopečná M, Collani S, Kopečný D, Novák O** (2023) Amino acid conjugation of oxIAA is a secondary metabolic regulation involved in auxin homeostasis. *New Phytol.* 238(6), 2264-2270.
- Businge E, Bygdell J, Wingsle G, Moritz T, Egertsdotter U** (2013) The effect of carbohydrates and osmoticum on storage reserve accumulation and germination of Norway spruce somatic embryos. *Physiol. Plant.* 149(2), 273-85.
- Casimiro-Soriguer C S, Muñoz-Mérida A, Pérez-Pulido A J** (2017) Sma3s: A universal tool for easy functional annotation of proteomes and transcriptomes. *PROTEOMICS* 17(12): 1700071.
- Chandra J, Keshavkant S** (2018) Desiccation-induced ROS accumulation and lipid catabolism in recalcitrant *Madhuca latifolia* seeds. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 24(1), 75-87.
- Chapman K D, Dyer J M, Mullen R T** (2012) Biogenesis and functions of lipid droplets

- in plants: Thematic Review Series: Lipid Droplet Synthesis and Metabolism: from Yeast to Man. *J. Lipid Res.* 53(2), 215-226.
- Chen P, Jung N U, Giarola V, Bartels D** (2020) The dynamic responses of cell walls in resurrection plants during dehydration and rehydration. *Front. Plant Sci.* 10:1698.
- Crowe J H, Hoekstra F A, Crowe L M** (1992) Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 54, 579–599.
- Dronne S, Label P, Lelu M A** (1997) Desiccation decreases abscisic acid content in hybrid larch (*Larix X leptoeuropaea*) somatic embryos. *Physiol. Plant.* 99, 433–438.
- Dumont-BéBoux N, Mazari A, Livingston N J, von Aderkas P, Becwar M R, Percy R E, Pond S E** (1996), Water relations parameters and tissue development in somatic and zygotic embryos of three pinaceous conifers. *Am. J. Bot.* 83, 992-996.
- Elango D, Rajendran K, Van der Laan L, Sebastiar S, Raigne J, Thaiparambil N A, El Haddad N, Raja B, Wang W, Ferela A, Chiteri K O, Thudi M, Varshney R K, Chopra S, Singh A, Singh A K** (2022) Raffinose Family Oligosaccharides: Friend or Foe for Human and Plant Health? *Front. Plant Sci.* 13:829118.
- Eliášová K, Konrádová H, Dobrev P I, Motyka V, Lomenech A M, Fischerová L, Lelu-Walter M A, Vondráková Z, Teyssier C** (2022) Desiccation as a post-maturation treatment helps complete maturation of Norway spruce somatic embryos: carbohydrates, phytohormones and proteomic status. *Front. Plant Sci.* 13, 823617.
- El-Maarouf-Bouteau H** (2022) The seed and the metabolism regulation. *Biology.* 11(2), 168.
- Find J I** (1997) Changes in endogenous ABA levels in developing somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in relation to maturation medium, dessication and germination. *Plant Sci.* 128,75-83.
- Finkelstein R R, Gampala S S L, Rock C D** (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14(SUPPL.), S15-S45.
- Fischerová L, Gemperlová L, Cvikrová M, Matušíková I, Moravčíková J, Gerši Z, Malbeck J, Kuderna J, Pavlíčková J, Motyka V, Eliášová K, Vondráková Z** (2022) The humidity level matters during the desiccation of Norway spruce somatic embryos. *Front. Plant Sci.* 13.
- Flinn B S, Roberts D R, Newton C H, Cyr D R, Webster F B, Taylor I E P** (1993) Storage protein gene expression in zygotic and somatic embryos of interior spruce. *Physiol. Plant.* 89, 719-730.
- Gautier F, Eliášová K, Leplé J C, Vondráková Z, Lomenech A M, Le Metté C, Label P, Costa G, Trontin J F, Teyssier C, Lelu-Walter M A** (2018) Repetitive somatic embryogenesis induced cytological and proteomic changes in embryogenic lines of *Pseudotsuga menziesii* [Mirb.]. *BMC Plant Biol.* 18(1), 164-188
- Gösslová M, Svobodová H, Lipavská H, Albrechtová J, Vreugdenhil D** (2001) Comparing carbohydrate status during norway spruce seed development and somatic embryo formation. *In vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 37, 24-28.
- Graça J** (2015) Suberin: the biopolyester at the frontier of plants. *Front Chem.* 30, 3-62.
- Graham I A** (2008) Seed storage oil mobilization. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 115–142.
- Gutmann M, von Aderkas P, Label P, Lelu M A** (1996) Effects of abscisic acid on

- somatic embryo maturation of hybrid larch. *J. Exp. Bot.* 47, 1905–1917.
- Hakman I** (1993). Embryology in Norway spruce (*Picea abies*). An analysis of the composition of seed storage proteins and deposition of storage reserves during seed development and somatic embryogenesis. *Physiol. Plant.* 87, 148–159.
- Hartmann H, Trumbore S** (2016) Understanding the roles of nonstructural carbohydrates in forest trees – from what we can measure to what we want to know. *New Phytol.* 211, 386-403.
- Hayashi K I, Arai K, Aoi Y, Tanaka Y, Hira H, Guo R, Hu Y, Ge C, Zhao Y, Kasahara H, Fukui K** (2021) The main oxidative inactivation pathway of the plant hormone auxin. *Nature Communications* 12(1), 6752.
- Hazubska-Przybył T, Wawrzyniak M, Obarska A, Bojarczuk K** (2015) Effect of partial drying and desiccation on somatic seedling quality in Norway and Serbian spruce. *Acta Physiol. Plant.* 37, 1735.
- Hilhorst H, Finch-Savage W, Buitink J, Bolingue W, Leubner-Metzger G** (2010) Dormancy in plant seeds dormancy and resistance in harsh environments, in: Lubzens E, Cerda J, Clark M (Eds.), Springer Berlin / Heidelberg, pp. 43-67.
- Hoekstra F A, Golovina E A, Buitink J** (2001a) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci.* 6, 431–438.
- Hoekstra F A, Golovina E A, Tetteroo F A, Wolkers W F** (2001b) Induction of desiccation tolerance in plant somatic embryos: how exclusive is the protective role of sugars? *Cryobiol.* 43(2), 140-150.
- Hogberg K A, Bozhkov P V, Gronroos R, von Arnold S** (2001) Critical factors affecting *ex vitro* performance of somatic embryo plants of *Picea abies*. *Scand. J. For. Res.* 16, 295-304.
- Högberg K A, Ekberg I, Norell L, von Arnold S** (1998) Integration of somatic embryogenesis in a tree breeding programme: a case study with *Picea abies*. *Can. J. For. Res.* 28, 1536-1545.
- Huang H, Møller I M, Song S Q** (2012) Proteomics of desiccation tolerance during maize embryos. *J. Proteomics* 86, 1-15.
- Jayasankar S, Van Aman M, Cordts J, Dhekney S, Li Z T, Gray J** (2005) Low temperature storage of suspension culture-derived grapevine somatic embryos and regeneration of plants. *In vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 41, 752-756.
- Jing D L, Zhang J W, Xia Y, Kong L S, OuYang F Q, Zhang S G, Wang J** (2017) Proteomic analysis of stress-related proteins and metabolic pathways in *Picea asperata* somatic embryos during partial desiccation. *Plant Biotechnol. J.* 15, 27–38.
- Kagaya Y, Okuda R, Ban A, Toyoshima R, Tsutsumida K, Usui H, Yamamoto A, Hattori T** (2005) Indirect ABA-dependent regulation of seed storage protein genes by FUSCA3 transcription factor in Arabidopsis. *Plant Cell Physio.* 46(2), 300-311.
- Kalemba E M, Janowiak F, Pukacka S** (2009) Desiccation tolerance acquisition in developing beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds: The contribution of dehydrin-like protein. *Trees – Struct. Funct.* 23(2), 305-315.
- Kalemba E M, Pukacka S** (2007) Possible roles of LEA proteins and sHSPs in seed protection: a short review. *Biol. Lett.* 44(1), 3–16.
- Kermode A R, Finch-Savage B E** (2002) Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. *CABI Books* 149–184.
- Klimaszewska K, Bernier-Cardou M, Cyr D R, Sutton B C S** (2000) Influence of gelling agents on culture medium gel strength, water availability, tissue water

- potential, and maturation response in embryogenic cultures of *Pinus strobus* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 36, 279-286.
- Klimaszewska K, Morency F, Jones-Overton C, Cooke J** (2004) Accumulation pattern and identification of seed storage proteins in zygotic embryos of *Pinus strobus* and in somatic embryos from different maturation treatments. *Physiol. Plant.* 121, 682-690.
- Konrádová H, Grigova M, Lipavska H** (2003) Cold-induced accumulation of raffinose family oligosaccharides in somatic embryos of norway spruce (*Picea abies*). *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 39(4), 425-427.
- Koornneef M, Bentsink L, Hilhorst H** (2002) Seed dormancy and germination. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5(1), 33-36.
- Kuzmin D A, Feranchuk S I, Sharov V V, Cybin A N, Makolov S V, Putintseva Y A, Oreshkova N V, Krutovsky K V** (2019) Stepwise large genome assembly approach: a case of Siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb). *BMC Bioinform.* 20(1), 37.
- Label P, Lelu M A** (2000) Exogenous abscisic acid fate during maturation of hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*) somatic embryos. *Physiol. Plant.* 109(4), 456-462.
- Lecouteux C, Tessereau H, Florin B, Courtois D, Petiard V** (1992) Preservation of carrot (*Daucus carota* L.) somatic embryos by dehydration after pretreatment with sucrose. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 314(III), 423-428.
- Lelu M A, Klimaszewska K, Pflaum G, Bastien C** (1995) Effect of maturation duration on desiccation tolerance in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea* Dengler). *In Vitro Cell Dev. Biol.* 31, 15–20.
- Lelu M A, Label P** (1994) Changes in the levels of abscisic acid and its glucose ester conjugate during maturation of hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*) somatic embryos, in relation to germination and plantlet recovery. *Physiol. Plant.* 92, 53-60.
- Lelu-Walter M A, Pâques L E** (2009) Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix x* and *Larix x marschlinsii*). *Perspectives for breeding.* *Ann. For. Sci.* 66, 104.
- Lelu-Walter M A, Thompson D, Harvengt L, Sanchez L, Toribio M, Pâques L E** (2013) Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction. *Tree Genet. Genomes* 9, 883-899.
- Leopold A C, Sun W Q, Bernal-Lugo I** (1994) The glassy state in seeds: analysis and function. *Seed Sci. Res.* 4, 267–274.
- Leprince O, Bronchart R, Deltour R** (1990) Changes in starch and soluble sugars in relation to the acquisition of desiccation tolerance during maturation of *Brassica campestris* seed. *Plant, Cell Env.* 13, 539-546.
- Leprince O, Hendry G A F, Mckersie B D** (1993) The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Sci. Res.* 3, 231-246.
- Leprince O, Pellizzaro A, Berriri S, Buitink J** (2017) Late seed maturation: drying without dying. *J. Exp. Bot.* 68, 827–841.
- Lipavská H, Konrádová H** (2004) Somatic embryogenesis in conifers: The role of carbohydrate metabolism. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 40(1), 23 -30.
- Liu Q, Luo L, Zheng L** (2018) Lignins: biosynthesis and biological functions in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 19(2), 335.
- Luo X, Xu J, Zheng C, Yang Y, Wang L, Zhang R, Ren X, Wei S, Aziz U, Du J, Liu W, Tan W, Shu K** (2022) Abscisic acid inhibits primary root growth by impairing ABI4-mediated cell cycle and auxin biosynthesis. *Plant Physiol.* 191(1), 265-

279.

- Marescal O, Cheeseman I M** (2020) Cellular mechanisms and regulation of quiescence. *Dev. Cell.* 55(3), 259-271.
- Maruyama T E, Hosoi Y** (2012) Post-maturation treatment improves and synchronizes somatic embryo germination of three species of Japanese pines. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 110, 45-52.
- Meschine M** (1995) Conservation d'embryons somatiques de *daucus carota* L. deshydratés et étude du rôle des sucres et de l'ABA dans l'acquisition de la tolérance à la déshydratation. Thèse de doctorat de l'université de technologie de Compiègne.
- Morel A, Trontin J F, Corbineau F, Lomenech A M, Beaufour M, Reymond I, Le Metté C, Ader K, Harvengt L, Cadene M, Label P, Teyssier C, Lelu-Walter M A** (2014b) Cotyledonary somatic embryos of *Pinus pinaster* Ait. most closely resemble fresh, maturing cotyledonary zygotic embryos: biological, carbohydrate and proteomic analyses. *Planta* 240, 1075-1095.
- Morse M, Rafudeen M, Farrant J M** (2011) An overview of the current understanding of desiccation tolerance in the vegetative tissues of higher plants. *Adv. Bot. Res.* 57, 319–347.
- Müller K, Dobrev P I, Pěnčík A, Hošek P, Vondráková Z, Filepová R, Malínská K, Brunoni F, Helusová L, Moravec T, Retzer K, Harant K, Novák O, Hoyerová K, Petrášek J** (2021) DIOXYGENASE FOR AUXIN OXIDATION 1 catalyzes the oxidation of IAA amino acid conjugates. *Plant Physiol.* 187(1), 103-115.
- Navarro B V, Elbl P, De Souza A P, Jardim V, de Oliveira L F, Macedo A F, Dos Santos A L W, Buckeridge M S, Floh E I S** (2017) Carbohydrate-mediated responses during zygotic and early somatic embryogenesis in the endangered conifer, *Araucaria angustifolia*. *PLoS One.* 12(7): e0180051.
- Obendorf R, Górecki R** (2012) Soluble carbohydrates in legume seeds. *Seed Sci. Res.* 22(4), 219-242.
- O'Brien T P, Feder N, McCully M E** (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59(2), 368-373.
- Oliver M J, Farrant J M, Hilhorst H W M, Mundree S, Williams B, Bewley J D** (2020) Desiccation tolerance: avoiding cellular damage during drying and rehydration. *Annu. Rev. Plant Biol.* 71, 435-460.
- Park Y S** (2002) Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. *Ann. For. Sci.* 59, 651-656.
- Parwez R, Aftab T, Gill S S, Naeem M** (2022) Abscisic acid signaling and crosstalk with phytohormones in regulation of environmental stress responses. *Environ. Exp. Bot.* 104885.
- Pashkovskiy P P, Vankova R, Zlobin I E, Dobrev P, Kartashov A V, Ivanova A I, Ivanov V P, Marchenko S I, Nartov D I, Ivanov Y V, Kuznetsov V V** (2022) Hormonal responses to short-term and long-term water deficit in native Scots pine and Norway spruce trees. *Environ. Exp. Bot.* 195, 104789.
- Pond S E, von Aderkas P, Bonga J M** (2002) Improving tolerance of somatic embryos of *Picea glauca* to flash desiccation with a cold treatment (desiccation after cold acclimation). *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 38, 334-341.
- Prerostova S, Dobrev P I, Knirsch V, Jarosova J, Gaudinova A, Zupkova B, Prášil I T, Janda T, Brzobohatý B, Skalák J, Vankova R** (2021) Light Quality and Intensity Modulate Cold Acclimation in *Arabidopsis*. *Int. J. Mol. Sci.* 22(5), 2736.



- Pullman G S, Johnson S, Peter G, Cairney J, Xu N** (2003) Improving loblolly pine somatic embryo maturation: comparison of somatic and zygotic embryo morphology, germination, and gene expression. *Plant Cell. Rep.* 21, 747-758.
- Riemann M, Dhakarey R, Hazman M, Miro B, Kohli A, Nick P** (2015) Exploring jasmonates in the hormonal network of drought and salinity responses. *Front. Plant Sci.* 6, 1077.
- Roberts D R, Lazarof W R, Webster F B** (1991) Interaction between maturation and high relative treatments and their effects on germination of sitka spruce somatic embryos. *J. Plant Physiol.* 138,1-6.
- Roberts D R, Sutton B C S, Flinn B S** (1990) Synchronous and high frequency germination of interior spruce somatic embryos following partial drying at high relative humidity. *Can. J. Bot.* 68,1086-1090.
- Sano N, Malabarba J, Chen Z, Gaillard S, Windels D, Verdier J** (2022) Chromatin dynamics associated with seed desiccation tolerance/sensitivity at early germination in *Medicago truncatula*. *Front. Plant Sci.* 13, 1059493.
- Sengupta S, Mukherjee S, Basak P, Majumder A L** (2015) Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants. *Front. Plant Sci.* 26(6), 656.
- Silveira V, Santa-Catarina C, Balbuena T S, Moraes F M S, Ricart C A O, Sousa M V, Guerra M P, Handro W, Floh E I S** (2008). Endogenous abscisic acid and protein contents during seed development of *Araucaria angustifolia*. *Biol. Plant.* 52, 101–104.
- Smolikova G, Leonova T, Vashurina N, Frolov A, Medvedev S** (2020) Desiccation tolerance as the basis of long-term seed viability. *Int. J. Mol. Sci.* 22(1), 101.
- Swamy P M, Smith B N** (1999) Role of abscisic acid in plant stress tolerance. *Current Sci.* 76(9), 1220-1227.
- Szczygieł K, Hazubska-Przybył T, Bojarczuk K** (2007) Somatic embryogenesis of selected coniferous tree species of the genera *Picea*, *Abies* and *Larix*. *Acta Soc. Bot. Pol.* 7(1), 7-15.
- Tetteroo A A F, Hoekstra F A, Karssen C M** (1995) Induction of complete desiccation tolerance in carrot (*Daucus carota*) embryoids. *J. Plant Physiol.* 145(3), 349-356.
- Teyssier C, Grondin C, Bonhomme L, Lomenech A M, Vallance M, Morabito D, Label P, Lelu-Walter M A** (2011) Increased gelling agent concentration promotes somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix x eurolepis*): a 2-DE proteomic analysis. *Physiol. Plant.* 141, 152–165.
- Teyssier C, Maury S, Beaufour M, Grondin C, Delaunay A, Le Metté C, Ader K, Cadene M, Label P, Lelu-Walter M A** (2014) In search of markers for somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix x eurolepis*): global DNA methylation and proteomic analyses. *Physiol. Plant.* 150, 271-291.
- Tillman-Sutela E, Kauppi A** (2000) Structures contributing to the completion of conifer seed germination. *Trees* 14, 191-197.
- Tuteja N** (2007) Abscisic acid and abiotic stress signaling. *Plant Signal. Behav.* 2(3), 135-138.
- Vaghela B, Vashi R, Rajput K, Joshi R** (2022) Plant chitinases and their role in plant defense: A comprehensive review. *Enzyme Microb.* 159, 110055.
- Välimäki S, Teyssier C, Tikkinen M, Delile A, Boizot N, Varis S, Lelu-Walter M A, Aronen T** (2022) Norway spruce somatic embryogenesis benefits from proliferation of embryogenic tissues on filter discs and cold storage of



- cotyledonary embryos. *Front. Plant Sci.* 13, 1031686.
- van der Schoot C, Rinne P L H** (2011) Dormancy cycling at the shoot apical meristem: Transitioning between self-organization and self-arrest. *Plant Sci.* 180(1), 120-131.
- van Zanten M, Carles A, Li Y, Soppe W J** (2012) Control and consequences of chromatin compaction during seed maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav.* 7(3), 338-341.
- Vicré M, Farrant J M, Driouich A** (2004) Insights into the cellular mechanisms of desiccation tolerance among angiosperm resurrection plant species. *Plant Cell Env.* 27, 1329-1340.
- Vishwakarma K, Upadhyay N, Kumar N, Yadav G, Singh J, Mishra R K, Kumar V, Verma R, Upadhyay R G, Pandey M, Sharma S** (2017) Abscisic Acid Signaling and Abiotic Stress Tolerance in Plants: A Review on Current Knowledge and Future Prospects. *Front. Plant Sci.* 8, 161.
- Vizcaíno J A, Csordas A, del-Toro N, Dianes J A, Griss J, Lavidas I, Mayer G, Perez-Riverol Y, Reisinger F, Ternent T, Xu Q W, Wang R, Hermjakob H** (2016) 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Res.* 44(D1), D447-D456.
- von Aderkas P, Rohr R, Sundberg B, Gutmann M, Dumont-BéBoux N, Lelu M A** (2002) Abscisic acid and its influence on development of the embryonal root cap, storage product and secondary metabolite accumulation in hybrid larch somatic embryos. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 69, 111-120.
- von Aderkas P, Teyssier C, Charpentier J P, Gutmann M, Pâques L, Le Metté C, Ader K, Label P, Kong L, Lelu-Walter M A** (2015) Effect of light conditions on anatomical and biochemical aspects of somatic and zygotic embryos of hybrid larch (*Larix x marschlinii*). *Ann. Bot.* 115, 605-615.
- Von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J, Filonova L** (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 69(3), 233-249.
- Vondrakova Z, Dobrev P I, Pesek B, Fischerova L, Vagner M, Motyka V** (2018) Profiles of endogenous phytohormones over the course of norway spruce somatic embryogenesis. *Front. Plant Sci.* 9, 1283.
- Vondráková Z, Pešek B, Malbeck J, Bezděčková L, Vondrák T, Fischerová L, Eliášová K** (2020) Dormancy breaking in *Fagus sylvatica* seeds is linked to formation of abscisic acid-glucosyl ester. *New Forests* 51, 671-688.
- Walters C, Koster K L** (2007) Structural dynamics and desiccation damage in plant reproductive organs. In: Jenks M.A., Wood A.J., editors. *Plant Desiccation Tolerance*. Blackwell; Ames, IA, USA, 251–280.
- Wang W Q, Liu S J, Song S Q, Møller I M** (2015) Proteomics of seed development, desiccation tolerance, germination and vigor. *Plant Physiol. Biochem.* 86, 1-15.
- Wang Y, Mostafa S, Zeng W, Jin B** (2021) Function and mechanism of jasmonic acid in plant responses to abiotic and biotic stresses. *Int. J. Mol. Sci.* 22(16), 8568.
- Wehmeyer N, Hernandez L, Finkelstein R, Vierling E** (1996) Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. *Plant Physiol.* 112, 747-757.
- Wehmeyer N, Vierling E** (2000) The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. *Plant Physiol.* 122(4), 1099-1108.
- Yang J, Duan G, Li C, Liu L, Han G, Zhang Y, Wang C** (2019) The crosstalks between jasmonic acid and other plant hormone signaling highlight the

- involvement of jasmonic acid as a core component in plant response to biotic and abiotic stresses. *Front. Plant Sci.* 10, 1349.
- Yeung E C, Stasolla C, Kong L** (1998) Apical meristem formation during zygotic embryo development of white spruce. *Can. J. Bot.* 76(5), 751-761.
- Yulianti, Putri K P, Yuniarti N, Aminah A, E Suita, Danu, Sudrajat D J, Nurhasybi, Syamsuwida D** (2020) Seed handling of specific forest tree species: Recalcitrant and intermediate seed. *OP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 522, 012015.
- Zhang H, Han W, De Smet I, Talboys P, Loya R, Hassan A, Rong H, Jürgens G, Paul Knox J, Wang M H** (2010) ABA promotes quiescence of the quiescent centre and suppresses stem cell differentiation in the *Arabidopsis* primary root meristem. *Plant J.* 64(5), 764-774.
- Zwack P J, Rashotte A M** (2015) Interactions between cytokinin signalling and abiotic stress responses. *J. Exp. Bot.* 66, 4863-4871.

## Chapitre V – Caractérisation de la maturation des graines de mélèze en vue d'une récolte précoce

Les variations environnementales ont un impact négatif sur la production de graines des arbres forestiers, limitant par conséquent le nombre de plants disponibles (Clark et al., 2021 ; Hacket-Pain et Bogdziewicz, 2021). L'avancée du printemps, une modification de la phénologie florale et la surpopulation d'insectes nuisibles sont observées ces dernières années (Poncet, 2009). Ces changements ont pour conséquences directes une réduction de la qualité des graines et une baisse de leur rendement. La qualité des graines est définie par leur capacité à germer et à produire des plantes vigoureuses (Hampton, 2002). Durant le développement des graines, la maturation joue un rôle important dans cette qualité, puisque c'est au cours de celle-ci que la majorité des processus biologiques y contribuant ont lieu : synthèse de réserves énergétiques, préparation à la germination, acquisition de la tolérance à la déshydratation et à la réhydratation (Gorian et al., 2007 ; Coelho et Benedito, 2008 ; Kermodé 2011). Afin de garantir une qualité de graine maximale, elles doivent par conséquent être récoltées à un stade optimal de maturité.

L'étude de la maturation des graines forestières est cruciale pour améliorer la gestion de leur récolte. Cependant, malgré son importance capitale, il est frappant de constater l'absence de connaissances spécifiques aux graines forestières. Ce manque de connaissances approfondies représente un défi majeur qui entrave notre capacité à prendre des décisions éclairées en matière de récolte des graines. Cette lacune de savoir découle en partie de la complexité intrinsèque à l'obtention de graines en quantité suffisante. Par ailleurs, la maturation des graines forestières est un processus complexe car il existe une grande diversité de mécanismes de maturation en fonction des espèces, rendant difficile la généralisation des connaissances d'une espèce à l'autre. De plus, les variations environnementales, y compris les changements climatiques, peuvent avoir des répercussions profondes sur la maturation des graines, ajoutant une couche supplémentaire de complexité à la recherche (Maity et al., 2023). L'insuffisance de données précises sur les périodes optimales de récolte des graines pour garantir leur qualité et leur germination limite notre capacité à mener des récoltes optimisées. En conséquence, il devient impératif de combler ces lacunes en investissant dans des études approfondies axées sur la maturation des graines forestières.

Pour étudier la maturation à l'échelle de la graine, nous avons réalisé une étude sur le mélèze d'Europe et le mélèze hybride. La première partie de cette étude s'attache à définir les variables biochimiques impliquées dans la qualité des graines de mélèze au cours de leur maturation et de leur séchage post-récolte. La deuxième partie se concentre sur l'optimisation de la récolte des graines en définissant une date de récolte maximisant la qualité des graines. L'avancée du printemps observée ces dernières années entraîne un murissement précoce des cônes de mélèze et par conséquent la maturité des graines pourrait être atteinte plus tôt. Malgré cela, le choix de la date de récolte commerciale ne tient pas compte de ce facteur déterminant en regard de

l'abondance et la qualité des graines. Pour maximiser les chances de récolter des graines de qualité en quantité suffisante, il est nécessaire de s'ajuster aux fluctuations de l'environnement. Une possibilité consiste à récolter les graines précocement pour anticiper et limiter les dommages causés par des conditions climatiques extrêmes ou des ravageurs, qui entraînent souvent d'importantes pertes avant la récolte commerciale (Poncet et al., 2009). Néanmoins, malgré une récolte précoce, l'enjeu sera d'obtenir des graines d'une qualité au moins équivalente aux graines récoltées actuellement, tant au niveau de leurs réserves qu'au niveau de leur capacité germinative. Une récolte précoce des graines pourrait potentiellement affecter leur maturation, qui pourrait ne pas être complète, entraînant ainsi une baisse de la qualité des graines. Néanmoins, suite à leur récolte les cônes sont mis à sécher pendant 18 semaines avant extraction des graines. Durant ce stockage post-récolte, la maturation des graines peut se poursuivre et la déshydratation avoir lieu. Au cours de ce processus, divers changements se produisent dans la composition des réserves, cette dernière influençant la qualité des graines. Ainsi, il devient nécessaire de caractériser l'impact de ce séchage en comparant des graines récoltées précocement par rapport aux graines récoltées à la date de récolte commerciale actuelle. Grâce à ces résultats, il sera possible de définir si le séchage post-récolte permet d'atténuer d'éventuelles différences de composition et/ou de qualité des graines récoltées à différents stades de maturité et si une récolte précoce pourrait être envisagée.

La spectroscopie IR couplée à la chimométrie peut être utilisée pour déterminer quantitativement la composition biochimique des échantillons, mais également pour discriminer des classes selon des paramètres qualitatifs. C'est une méthode utilisée en routine pour le contrôle de la viabilité et la qualité des semences de grandes cultures (Font et al., 2016). Elle s'applique également aux matériaux forestiers tels que le bois (Pulkka et al., 2016) et les graines (Tsuchikawa et Kobori, 2015 ; Tsuchikawa et al., 2022). De nombreuses études ont notamment démontré la capacité de la spectroscopie infrarouge à distinguer des graines forestières en fonction de paramètres qualitatifs, notamment de l'espèce (Farhadi et al., 2016), la provenance (Tigabu et al., 2005 ; Farhadi et al., 2017) et de la viabilité des graines (Farhadi et al., 2015 ; Tigabu, 2003 ; Tigabu et al., 2004). Sur la base de ce potentiel l'ensemble des données collectées lors de la caractérisation des graines a également été utilisé pour développer des modèles de prédiction par spectrométrie IR (Annexe 2) de plusieurs variables biochimiques entrant dans la composition des graines. Ensuite, nous avons cherché à développer des modèles permettant de discriminer les graines en fonction de leur stade de maturité.

Pour résumer, dans ce chapitre, nous avons étudié les modifications biologiques et biochimiques qui se produisent lors de la maturation et le séchage des graines de mélèze et avons essayé de répondre aux questions suivantes :

- (1) Quels sont les modifications biochimiques qui se produisent pendant la maturation des graines et suivant une étape de séchage post-récolte ?
- (2) Quels sont les variables biochimiques définissant la qualité des graines ?
- (3) Quelle est la date optimale de récolte des graines ? et comment la définir ?

Pour répondre à ces questions, différents lots de graines de mélèze obtenus de 2014 à 2021 ont été récoltés à 3 dates correspondant : à la récolte commerciale et 3 et 6 semaines avant. De plus, une partie de ces graines a été soumise à un séchage post-récolte de 18 semaines, correspondant à la durée de stockage des graines avant leur traitement en sécherie et leur vente (Figure V.1). Les graines ont été analysées pour

déterminer leur composition biochimique et leur profil protéomique afin de comprendre les processus biologiques mis en place entre les différentes dates de récolte.

Cette étude contribue à approfondir les connaissances fondamentales concernant la maturation et la qualité des graines de conifères. Elle fournira également des informations et des outils permettant d'optimiser la caractérisation et la récolte des graines de mélèze. L'étude de la faisabilité d'une récolte précoce basée sur des paramètres précis que constitue la composition biochimique des graines est une première et contribue à l'originalité de ce travail.

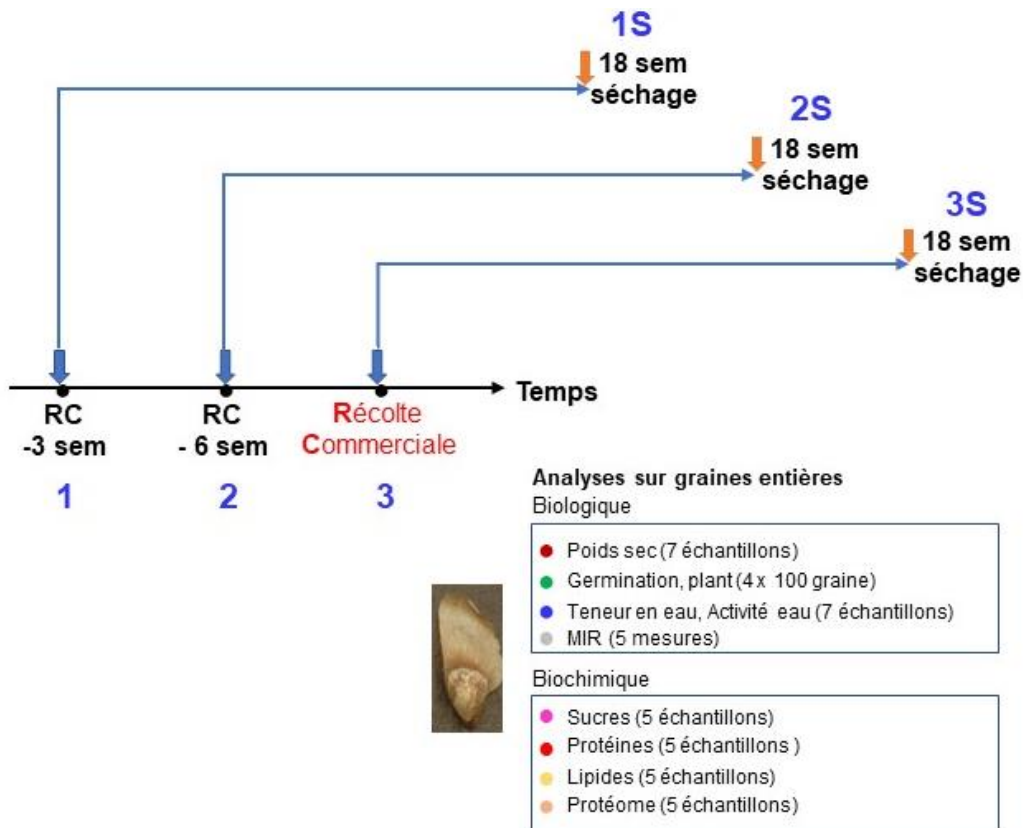


Figure V.1. Plan expérimental des analyses réalisées dans le chapitre 4.  
RC : récolte commerciale.

**Avant propos :** Cet article intégrera des résultats issus du travail d'un post-doctorant, et donc qui ne font pas partie de la thèse de Parisa Savane. Ces résultats ne sont pas finis, bien que quelques éléments soient donnés ici pour le lecteur afin qu'il appréhende leur futur contenu. Cela a pour conséquences que les parties traditionnellement rédigées en dernier dans une publication, comme son résumé et ses conclusions, soient encore absentes dans cette version du manuscrit. L'introduction et la discussion seront aussi modifiées pour intégrer ces résultats.

## **Publication**

Characterization of larch seed during maturation and drying: toward the optimization of seed harvest.

## **Abbreviations**

ABA: abscisic acid;  $A_w$ : water activity; dw: dry weight; fw: fresh weight; IR: infrared; LC-MS/MS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry; GO: gene ontology; mid-IR : mid-infrared; PCA : principal component analysis; PLS-DA : partial least squares regression discriminant analysis ; PLS-R: partial least squares regression; RMSEP : root mean square error of prediction ; RMSECV : root mean square error ; ROS: reactive oxygen species; Wc: water content.

## **Introduction**

Environmental variations have a negative impact on larch seed production, limiting the number of seedlings available (Hacket-Pain and Bogdziewicz, 2021; Maity et al., 2023). The direct consequences of these variations is the reduction of the seed quality which is defined by its capacity to germinate and produce vigorous plant (Hampton 2002). The key aspects of seed quality notably include (1) high germination rate, (2) the vigor of seed which is determined by their ability to withstand adverse conditions and produce strong plants, (3) the seed moisture content that is closely related to the viability of the seed and (4) the seed maturity. During the final stage of seed development, the maturation phase plays a crucial role in the final quality of seeds. Therefore, seeds should be harvested at the optimal stage of maturity to ensure maximum quality (Phartyal 2002; Alan and Eser, 2008). As maturation goes on, the quality of seeds increases. It is during this process that seeds develop and accumulate essential storage compounds to ensure their successful germination and the subsequent growth of seedlings (Gorian et al., 2007 ; Coelho and Benedito, 2008; Kermodé 2011).

Larch seed storages are rich in proteins and lipids, which serve as important energy sources during germination and early seedling growth (Graham 2008; Wahid et Bounoua, 2013). Proteins play diverse and interconnected roles in seed germination, ranging from mobilization of reserves to regulation of growth and development processes. They can be notably found as digestive enzymes, signaling protein, protective compounds or proteins involved in the regulation of metabolic pathways. Their presence and coordinated activity are essential for the seed quality. There is a

range of type of proteins which have each their own roles in seeds. Lipids also participate in seed quality by participating in membrane structure and function, influencing signaling pathways, and providing protection against environmental stresses. After the storage accumulation phase, seeds undergo desiccation (Angelovici et al., 2010). As the seeds enter this process, the water content gradually decreases until they attain a state of physiological maturity suitable for storage (Kermode et Finch-Savage, 2002). The ability of desiccation-tolerant seeds to survive extreme desiccation is closely linked to several key adaptations. During desiccation, seeds undergo important biochemical changes including production of protective proteins and carbohydrates (Oliver et al., 2020). In many species, desiccation mainly induces the synthesis of antioxidant enzymes, specific late embryogenesis abundant (LEA) proteins, specific heat shock proteins (HSP) and soluble carbohydrate like raffinose family oligosaccharides (RFO) (Hoekstra et al., 2001; Oliver et al., 2001). All together, these compounds shield cellular structures from damage caused by water loss.

Proteomic could provide comprehensive analysis of proteins expressed in seeds during maturation and in response to desiccation (Dinakar and Bartels 2013; Wang et al., 2014; Alfonso et al., 2020; Sghaier-Hammami et al., 2020). Throughout seed maturation, the accumulation of different type of proteins is a pivotal event. Proteomics has emerged as a powerful tool to explore the intricate biological processes occurring during seed maturation and desiccation. Moreover, by understanding the specific proteins expressed and regulated during maturation and desiccation, it will be possible to have indications on the molecular mechanisms underlying the maturation and desiccation processes and identify potential biomarkers involved in seed maturity which could be correlated to seed quality.

Seed quality is still often assessed by methods that lack precisions such as the thousand seed weight, germinability test, moisture content (Ramos et al., 2012; Leadem 1996; Matthews et al., 2012). Therefore, it is necessary to find other method to characterize conifer seed more precisely. The first part of the study focus on defining biochemical parameters involved in larch seed quality. Various larch seed lots obtained from 2014 to 2021 were harvested at 3 dates corresponding to the commercial harvest and 3 and 6 weeks before. Moreover, a part of these seeds was subjected to a process of desiccation which lasts the time commercial seeds spent before selling. The seeds were analyzed to determine their biochemical composition and their proteomic profile to show how they evolve before and after desiccation. The results obtained were correlated to the germination capacity of seeds and all together indicators related to seed quality were determined.

The second part of the study focus on optimizing seed harvest period by defining the optimal harvest date based on seed quality. The climate change observed in recent years has led to an early ripening of larch cones. Despite this, the commercial harvest date is fixed without taking into account this determining factor on the abundance and quality of seeds. To contribute to obtaining an abundant harvest of quality seeds, it is necessary to adapt to the variations of the environment. An early harvest could make it possible to anticipate and limit the action and the damages caused by extreme climatic conditions or pests that cause significant seed losses before the commercial harvest. Nevertheless, despite the early harvest, the challenge will be to obtain seeds of quality at least equivalent to the seeds currently harvested both in terms of their reserves and in terms of their germination capacity. Early harvest of the seeds could have an impact on their maturation, which could be not completed, resulting in a decrease of the seed quality. Furthermore, during the post-harvest storage, seed

desiccation continues. During this process there are various changes in the reserve composition that influence the quality of the seeds. It is therefore necessary to characterize the impact of this desiccation on the composition and quality of seeds harvested earlier in comparison with seeds harvested at the current commercial harvest date. Thanks to these results, it will be possible to define whether post-harvest desiccation makes it possible to attenuate possible differences in the composition and/or quality of seeds harvested at different stages of maturity and whether an early harvest could be considered.

The huge data set collected during seed characterization were also used to develop infrared (IR) models. IR spectroscopy coupled with chemometrics can be used to quantitatively determine the biochemical composition of samples without a preparation step which is time-consuming and resource-intensive. IR spectroscopy is already used routinely for crop seed quality control (Font et al., 2016). It is also applied to forest materials such as wood (Pulkka et al., 2016) and seeds (Tsuchikawa and Kobori, 2015; Tsuchikawa et al., 2022). IR spectra can also be used for classification in order to discriminate classes according to qualitative parameters. Seeds are identified and classified according to similarities and differences among spectra from the different types of seeds. Many studies have demonstrated the capacity of infrared spectroscopy to discriminate among sets of forest materials according to qualitative parameters including seed specie (Farhadi et al., 2016), seed provenance (Tigabu et al., 2005; Farhadi et al., 2017) and seed viability (Farhadi et al., 2015; Tigabu, 2003; Tigabu et al., 2004). In this study, we developed IR calibration models for the prediction of activity of water and water content, protein, lipid, soluble carbohydrates and starch content. Then, we aimed to develop models to discriminate seeds according to their maturation stage to help the decision-making for harvesting at the best time window. The development of IR models was based on the use of Partial Least Squares Regression (PLS-R) and Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) algorithms.

To summarize, in the present study, we investigated the biological and biochemical changes that occur during late maturation of larch seed and try to answer these questions (1) What are the biochemical changes occurring during seed maturation and after desiccation? (2) What are the parameters defining the quality of seeds? (3) What is the optimum seed harvest date? and how to define it? At the same time, IR models were developed to facilitate the characterization of larch seeds and discriminate them according to their harvest date. This study contributes to deepen the knowledge on the maturation and quality of seeds which is lacking in conifers species. It will also provide tools that will help optimizing larch seed characterization and harvest. It is the first time that larch seeds are characterized for the main biochemical parameters (protein, lipid, carbohydrates, water content) during maturation. Moreover, this is the first time that the feasibility of an early harvest based on precise parameters i.e. the biochemical composition of the seeds is studied. This contributes to the originality of this work.

## Materials and methods

### Plant material

The cones of European Larix (*Larix decidua*) and hybrid (*Larix x eurolepis*, variety "Rêve vert" after controlled pollinisation) were collected from seed orchard located in the South-West of France (plot 310, seed orchard : *Les Sudettes, Le Theil*). A letter was assigned to each genotype/variety harvested : n, r, s, u, w, x and y to "Rêve vert", 171, 108, 142, 119, 104 and 125 respectively. They were harvested, during the period



from 2014 to 2021, at the following 3 different times July 20<sup>th</sup> (harvesting called 1), August 10<sup>th</sup> (2) and August 31<sup>st</sup> (3). This last date is the traditional commercial cone collection. At each of these harvests, half of the cones were put in a dry room for 18 weeks to simulate the protocol of drying time applied in dryer section. At the end of this time the harvesting were called 1S (November 23<sup>d</sup>), 2S (December 14<sup>th</sup>) and 3S (January 4<sup>th</sup>) respectively (Figure V.2). After collecting of the cones (around 80 by genotype), the seeds were extracted, and their humidity immediately measured with water activity ( $A_w$ ) assessment. The water content and the weight of full seeds were measured also the day of cone reception. The next days, the trial of full seeds was made by X-ray radiography. The near- and mid-infrared spectra were done. The samples for germination test were constituted, after desiccation around 2.5 ( $A_w$ ) and then kept at 4°C until germination assays. The other seeds were then frozen at -80°C, until the remaining biochemical analysis were carried out once a year with all the collections.

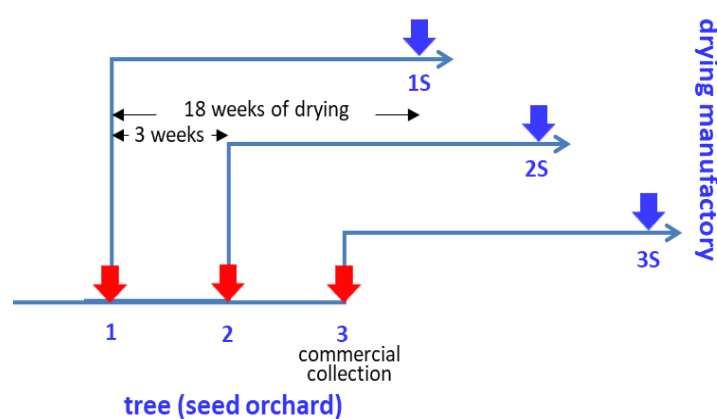


Figure V.2. Experimental design indicated the chronological repartition of the six harvests. They are symbolized with large arrows. The red ones (1, 2 and 3) correspond to a harvest obtained the 20<sup>th</sup> July, 10<sup>th</sup> August and 31<sup>st</sup> August respectively and correspond to fresh seeds, whereas the blue arrows (1S, 2S and 3S) the harvests made after 18 weeks of drying (17<sup>th</sup> November, 8<sup>th</sup> December and 2<sup>nd</sup> January).

### Dry weight, water content and water activity measurement ( $A_w$ )

At each cone reception, 50 seeds from 2 genotypes were immediately individually weighed to determine their fresh weight (fw). The dry weight (dw) was determined after oven-drying at 70°C for 24 h, the seeds beforehand cut in two. Their water content (Wc) was calculated as  $(fw - dw)/dw$  and expressed as  $g\ H_2O\ g^{-1}\ dw$  (Dronne et al. 1997). Ten samples were assayed for each genotype. The  $A_w$  levels of the seeds of 2 cones was measured in triplicate for each 3 genotypes at harvest using a hygrometer (HygroPalm 23, Rotronic).

### Determination of soluble carbohydrates, starch, total protein and total lipid contents

#### Carbohydrates and starch

Soluble carbohydrates and starch were identified and/or quantified following Gautier et al. (2018 and 2019). Briefly, ethanolic supernatants of powdered extract from 60 mg dw samples of seeds were purified using activated charcoal and poly(vinylpyrrolidone) (PVPP), dried, suspended in water and injected into a Chromaster HPLC system (VWR-Hitachi) equipped with a Rezex<sup>TM</sup> RPM-

Monosaccharide Pb<sup>2+</sup> (8%) column (Phenomenex), then eluted with ultrapure H<sub>2</sub>O at a flow rate of 0.6 ml.min<sup>-1</sup>. Carbohydrates in the eluates were quantitatively detected with an ELSD 85 detector (VWR Hitachi) and the peak areas were electronically integrated using OpenLAB CDS EZChrom (Agilent). Carbohydrates were identified by co-elution with standards, quantified from calibration curves and expressed in mg g<sup>-1</sup> dw. Starch contents of the samples were determined, in glucose equivalents, by analysing amyloglucosidase hydrolysates of residual pellets of the extracts after soluble carbohydrate extraction (Gautier *et al.*, 2019). Each sample was assayed in pentuplicate (except in 2015, they were in triplicate), and means obtained from the samples ± SE are presented.

#### Total proteins

Frozen SE (about 20 mg fw) was homogenized in lysis buffer (with SDS, β-mercaptoethanol and poly(vinyl) polypyrrolidone as explained in details in Lefebvre *et al.* 2022. Protein concentrations in the extracts were assessed by Bradford assays with BSA (Bovine Serum Albumin) as a standard, and results were expressed as soluble protein content in µg g<sup>-1</sup> dw and corresponded to the mean of 5 biological repetitions ± SE. The extracted proteins (15 µg) were separated by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on a 12% gel with stacking gel (4%) following standard protocols. The gel was stained for proteins with colloidal Coomassie brilliant blue G-250 (CBB-G). The storage proteins have been previously identified in Teyssier *et al.* (2014).

#### Total lipids

Total lipid were extracted according to Lefebvre *et al.* (2022) with seeds collected from 2018 to 2021. Extractions were carried out using freeze-dried SE (about 20 mg fw) ground with 0.5 ml chloroform: methanol (1:2). The lipid concentration determination was based on a reaction between the carbonium ion (produced by the reaction between lipids and sulfuric acid) and the carbonyl group of phospho-vanillin, followed at 525 nm. Lipid concentration was determined using sunflower oil as standard. Results were expressed as µg mg<sup>-1</sup> dw and corresponded to the mean of 5 biological repetitions ± SE.

#### **Proteomic study**

Five biological replicates per sample (hybrid larch, RÊVE VERT, harvested in 2021) were subjected to proteomic and nLC-MS/MS analyses following Gautier *et al.*, (2018). Briefly, each total protein urea extracts was loaded onto SDS-PAGE gel and digested with trypsin. The eluted peptide mixture was analyzed using an Ultimate 3000 nanoLC system (Dionex, Amsterdam, The Netherlands) equipped with a C18 PepMap™ trap column (LC Packings) coupled to an Electrospray Q-Exactive quadrupole Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA). Proteins were identified by SEQUEST searches implemented via Proteome Discoverer 2.5 (Thermo Fisher Scientific Inc.) against a *Larix siberica* assemblage (37 004 entries). Quantitative data were considered for proteins quantified by a minimum of two peptides and a statistical p-value lower than 0.05. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE (Vizcaino *et al.*, 2016) partner repository with the dataset identifier XXXX.

Proteins were quantified based on unique peptide intensities. Normalization was performed based on 15 µg protein amount. Protein ratios were calculated as the median of all possible pairwise peptide ratios. A t-test was performed based on

background populations of peptides or proteins. Only proteins containing a minimum of 2 peptides and a statistical  $p$ -value of less than 0.05; and with 3 occurrences between the 5 biological repetitions were included in downstream analyses.

### **Multivariate analysis of spectral data**

Partial least squares regression (PLS-R) analysis prediction models and PLS discriminant analysis (PLS-DA) were developed using 10 spectra for each harvest and genotype, every year. They were calculated by R software. Both methods were carried out using between 1 and 20 latent variables (LV) (Mevik and Wehrens, 2015).

The calibration models using the PLS-R method were developed for the quantitative prediction of biological and biochemical compounds. For each model the best spectra pre-processing and the optimal number of latent variables were chosen according to cross-validation and the RMSECV corresponding to the root mean square error. The performance of the models was characterized using  $r^2_{cal}$  and RMSEP.  $r^2_{cal}$  ought to be as close as possible to 1 while the RMSEP considered as a parameter for judging the predictive ability of a calibration model has to be as low as possible for the model to be accepted as reliable. PLS-DA models were selected based on the overall accuracy of the model.

### **Gene Ontology (GO) analysis**

GO analysis was conducted using the Sma3s software (Casimiro-Soriguer et al., 2017) version 2 using the “goslim” parameter and the reference database UniRef90 based on the UniProt database (<https://www.uniprot.org>) ( Consortium Uniprot, 2020). A unique synthetic keyword for GO-biological process (called kBP) was often defined to make the interpretation possible (TableS2).

### **Germination trial and measurement of growth**

Until germination test, seeds were stored at 4°C after decrease of their humidity up to around 0.25 (followed by  $A_w$  assessments). The germination trial started by stratification treatment (6 weeks at 3-5°C in the dark in sifted blond peat). The seeds were then sown by placing lots on wet filter paper in germination chamber (24 h at 20°C under 12 h photoperiode). The number of germinated seeds was counted every 2 days. This experiment was repeated with 30-400 seeds collected usually on 5 genotypes per harvest, for each year. Thirty germinated seeds by genotype and by harvest of the years 2019 and 2020 were planted in nursery in pots (270 mL filled with classical soil) the first year and then planted in watered soil for an additional year. The height of seedlings were measured after 2 years of growing, from the collar to the top.

### **Spectral acquisition**

Mid-infrared (mid-IR) spectra were collected using the Attenuated Total Reflectance accessory of the Frontier spectrometer (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Measurements were recorded from full seeds. All these spectra were acquired in the mid-IR region from 650 to 4000  $\text{cm}^{-1}$  with a spectral resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$  and a zero-filling factor of 4, resulting in an interval of 1  $\text{cm}^{-1}$  between data points. For each sample, 5 scans by genotype were acquired and averaged to give a single spectrum computed as  $\text{Log}(1/R)$  then expressed in absorbance.

### **Spectral pre-processing**

Pre-processing methods are widely performed in chemometrics to reduce or remove artefacts from spectral data such as systematic noise due to instrumental drift, light scattering, baseline shift, sample state and moisture content that could introduce variations which are not correlated with the biochemical composition of the samples (Engel et al. 2013; Mishra et al. 2020; Roger et al. 2020). To improve the efficiency of prediction models we applied various pre-processing techniques using the R software (version 4.1.3, © 2009–2022 RStudio, PBC). One of the first steps is often baseline correction using the detrend and Savitzky-Golay based 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> derivative methods available in the R package *rchemo* (Lesnoff, 2021). We also corrected the light-scatter effect by applying standard normal variate (SNV) and Multiplicative Scatter Correction (MSC) available in the *rchemo* and *pls* R packages respectively. A combination of baseline and global intensity correction was also performed. The appropriate pre-processing method is defined for each model based on the cross-validation performances.

### **Correlation between climatic variables and biochemical data**

Five climatic variables were downloaded from the CLIMATIC database (<https://agroclim.inrae.fr/climatik>) for the 2013-2021 periode using data from the nearest meteorological station. These monthly variables included minimum and maximum temperatures, precipitations, solar radiation and evapotranspiration. In order to test if some of these variables may be associated with biochemical data, we considered that data from year *n* could be related to climatic variables comprised between September of year (*n*-1) and August of year *n*, i.e. the period of cone formation and development. We then computed the correlation between each climatic variable and the biochemical values and identified the variables for which the absolute value of the correlation was above 0.5 and the *p*-value from the correlation test was above 0.05.

### **Statistical analyses**

Statistical analyses were carried out with R software (version 4.1.3, © 2009–2022 RStudio, PBC). Effects of factors on the variance of the analysed results were evaluated using one-way ANOVAs. Multiple comparisons of means were done with Tukey contrasts ( $P < 0.05$ ). The Principal Component Analysis (PCA) were done with the *ade4* package (Dray & Dufour 2007). The determination of the coefficient of correlation of Pearson has been used to identify the level of correlation between the biochemical parameters and the growth of the seedling.

## **Results**

### **Question 1: What happens during the end of seed maturation, before or after drying?**

The formation of the seeds is in one year, contrary to many others conifers, and beginning of June the embryos are cotyledonary and mature at the end of August, the cone are then brown. The seeds acquire the maximum fresh and dry weight (Table V.1) at the end of August (harvest 3). The desiccation step is fast, starting around the 10<sup>th</sup> August (harvest 2) and finished at the end of the month as indicated by the water activity ( $A_w$ ) (Figure V.3). After harvest, the larch cones are dried at room temperature

for 18 weeks. Only then are the seeds removed from the cones, sorted, and characterized. The same protocol was applied to the 3 harvests leading respectively to the 1S, 2S and 3S harvests. The corresponding seeds were characterized as before drying. The protein content had no clear evolution during the last dates of maturation on the tree. It decreases slightly between the 1S and 3S harvests. But electrophoretic gel showed large bands corresponding to storage proteins and no changes in the protein pattern between these harvests (Figure V.1S). Lipid content of the seed decreased during the last weeks of maturation to increase between the dried seeds. Carbohydrate content did not change during the studied time, but their profiles changed with notably a decrease of glucose content between the harvests 1 and 2, and an increase of raffinose and stachyose mainly between the harvests 1 and 2 or 2 and 3 respectively. After drying, the same difference in raffinose content persists with a higher content for the seeds of the 3S harvest.

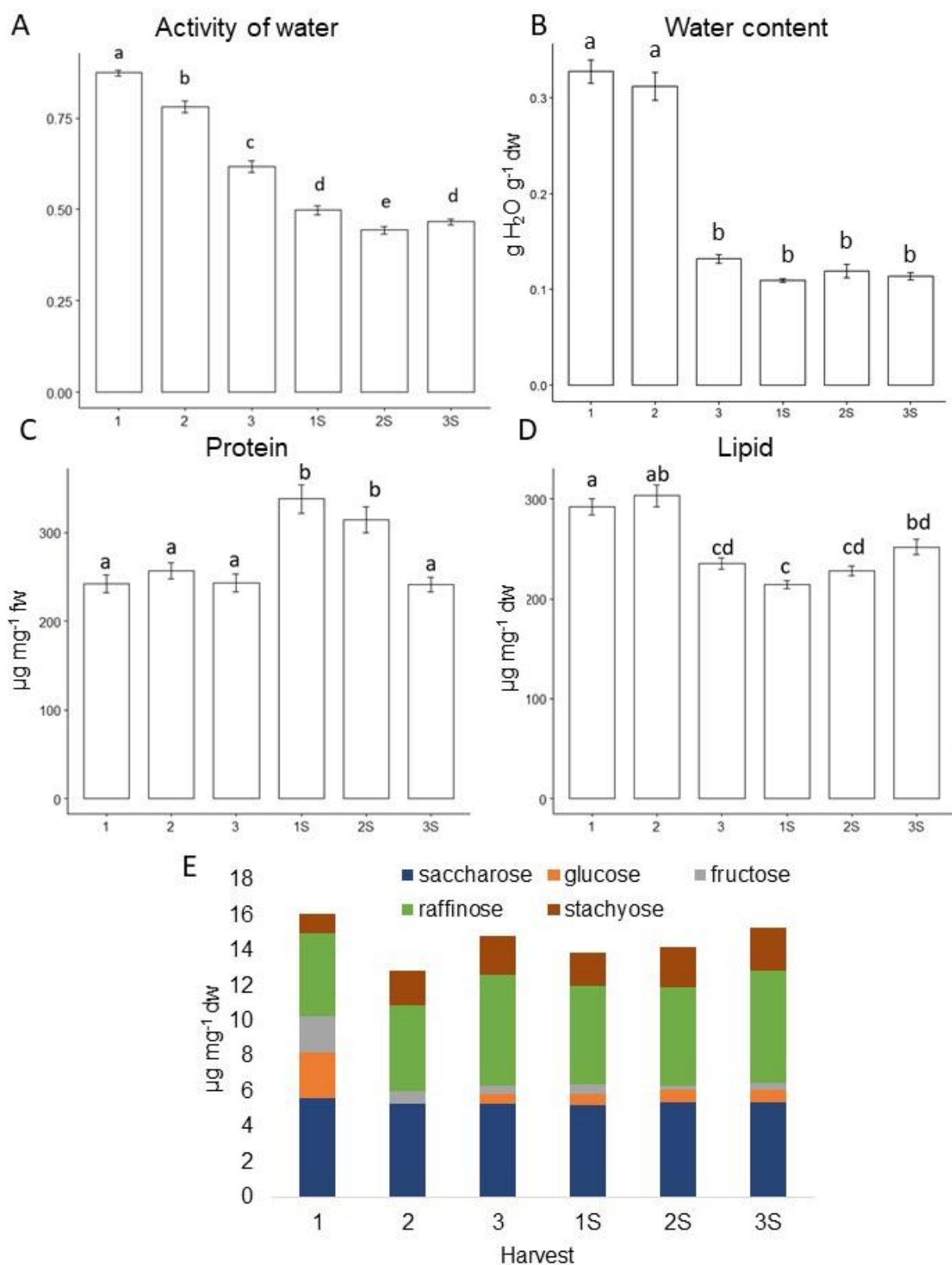


Figure V.3. Composition of European larch seeds during last weeks of maturation, between 2014 and 2021, at different date collections. Significant differences at  $P < 0.05$  are indicated by letters (Wilcoxon). 1: 1 to 3 correspond to the harvests made in July and August, 1S to 3S correspond to the previous harvests after drying.  $n=70$ .

Figure V.1S. SDS-PAGE total protein pattern of larch seed from collected throughout maturation, 1, 2, 3 corresponding to fresh seeds, whereas 1S, 2S and 3S corresponding to the same harvest after 18 weeks of drying. The storage protein pattern is given by the protein extract of megagametophyte from mature dry seeds of the same full-sib family. The identifications of major storage proteins are shown on the right.

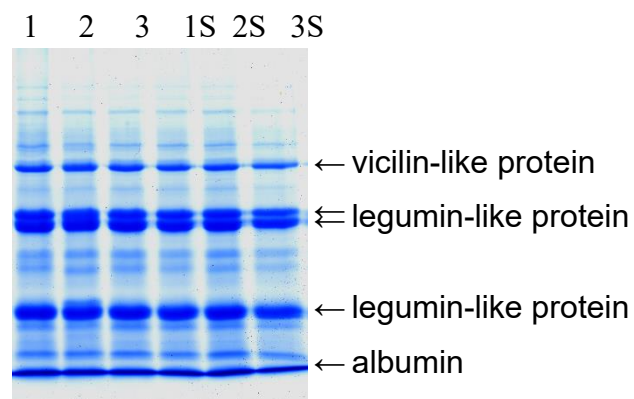


Table V.1. Composition of European larch seeds during last weeks of maturation, between 2014 and 2021, at different date collections. Data are presented as mean values ± standard deviations of 3 to 10 biological replicates. Significant differences at  $P < 0.05$  are indicated by letters (ANOVA, Tukey). 1: 1 to 3 correspond to the harvests made in July and August, 1S to 3S correspond to the previous harvests after drying; 2: mg seed; 3: mg H<sub>2</sub>O mg dw, 4: µg mg<sup>-1</sup> dw; 5: µg mg<sup>-1</sup> fw. n=5-7

Allyears	seeds	A <sub>w</sub>	dw <sup>2</sup>	Wc <sup>3</sup>	lipid <sup>4</sup>	protein <sup>5</sup>	carbohydrate <sup>4</sup>	galactose <sup>4</sup>	glucose <sup>4</sup>	fructose <sup>4</sup>	m-inositol <sup>4</sup>	pinitol <sup>4</sup>	raffinose <sup>4</sup>	saccharose <sup>4</sup>	stachyose <sup>4</sup>
1	3.9±5.2 a	0.9±0.1 e	5.5±1.2 a	0.3±0.1 a	261.5±55 d	241.9±118.3 a	19±5 a	0.7±0.5 a	2.6±1.6 c	2.1±1.5 c	1±0.5 d	1.8±0.7 c	4.7±1.6 a	5.6±1.7 a	1.1±0.8 a
2	3.4±7 a	0.8±0.1 d	5.7±1.2 ab	0.3±0.2 b	243.3±44 d	256.8±111.6 a	15.8±3.3 a	0.6±0.5 a	1±1 b	0.7±0.8 b	0.6±0.3 c	0.9±0.5 bc	4.9±1.3 ab	5.3±1.4 a	2±0.9 bc
3	3.6±4.7 a	0.8±0.1 c	5.9±1.3 ab	0.1±0 b	222.4±43.1 bc	243.1±121.4 a	16.4±3.5 a	0.7±0.4 a	0.6±0.4 a	0.4±0.4 ab	0.5±0.4 bc	0.6±0.3 bc	6.3±1.5 de	5.3±1.3 a	2.2±1 bc
1S	2.2±4.3 a	0.5±0 ab	6±1.2 ab	0.1±0 b	207±40.4 a	337.7±138.5 b	16±4.3 a	0.6±0.5 a	0.7±0.4 ab	0.5±0.4 ab	0.5±0.4 bc	1±0.4 a	5.6±1.4 bc	5.2±1.9 a	1.9±1.1 b
2S	3.2±6.8 a	0.4±0 a	5.9±1 ab	0.1±0 b	214.4±48.4 ab	314.1±124.5 b	15.8±4 a	0.6±0.5 a	0.7±0.4 ab	0.2±0.4 a	0.3±0.4 a	0.6±0.4 a	5.6±1.7 cd	5.4±1.9 a	2.3±1 bc
3S	5.3±9.2 a	0.5±0.1 b	6±1.2 b	0.1±0 b	220.7±69.8 c	241.3±102 a	16.8±3.4 a	0.8±0.4 a	0.7±0.4 a	0.4±0.4 ab	0.4±0.4 ab	0.6±0.4 ab	6.4±1.6 e	5.4±1.2 a	2.4±0.8 c
2014	seeds	A <sub>w</sub>	dw <sup>2</sup>	Wc <sup>3</sup>	lipid <sup>4</sup>	protein <sup>5</sup>	carbohydrate <sup>4</sup>	galactose <sup>4</sup>	glucose <sup>4</sup>	fructose <sup>4</sup>	m-inositol <sup>4</sup>	pinitol <sup>4</sup>	raffinose <sup>4</sup>	saccharose <sup>4</sup>	stachyose <sup>4</sup>
1	nd	0.9±0 d	nd	nd	nd	159.1±50.6 b	22±1.8 b	0±0	3±1.4 c	2±0.8 c	1±0.2 c	1.9±0.4 c	7.3±1.2 b	6±0.4 c	0.8±0.5 a
2	nd	0.8±0.1 c	nd	nd	nd	154.3±48.5 a	15.7±1.2 a	0±0	1.5±0.8 b	1±0.7 b	0.5±0.3 b	0.8±0.2 b	6.1±1.4 a	4.2±0.8 a	1.6±0.7 ab
3	nd	0.7±0.1 b	nd	nd	nd	160.2±53.1 a	15.2±1.8 a	0±0	0.3±0.3 a	0±0.2 a	0.2±0.3 a	0.1±0.2 a	8±0.7 b	4.7±0.6 ab	1.9±0.7 b
3S	nd	0.5±0 a	nd	nd	nd	207.1±107.8 a	16.2±2.8 a	0±0	0.4±0.3 a	0±0 a	0±0 a	0±0 a	8.4±1.2 b	5.1±0.8 b	2.3±1.1 b
2015															
1	9.1±3.8 a	0.9±0 c	4.8±0.7 a	0.1±0 a	nd	196.3±71.3 a	17.7±0.8 a	0±0	2.2±1.4 b	0.7±0.1 b	0.6±0.1 b	1.2±0.2 b	6.8±0.8 a	5.8±0.4 a	0.3±0.5 a
2	6.1±2 a	0.8±0 c	5.2±0.9 ab	0.4±0.2 b	nd	184.9±96.5 a	15.9±1.6 a	0±0	0.6±0.1 a	0.5±0 a	0.5±0 a	0.5±0.1 a	6.5±0.5 a	6.2±0.8 a	1±0.9 ab
3	5.3±2.8 a	0.4±0 b	6.1±0.7 b	0.1±0 c	nd	208.7±97.6 a	16.9±1.8 a	0±0	0.5±0.1 a	0.4±0 a	0.4±0 a	0.5±0 a	7.9±1.4 ab	6±0.9 a	1.1±1.3 ab
3S	10.3±3.1 a	0.5±0 a	6±0.7 ab	0.1±0 a	nd	236.7±72.2 a	18.1±1.6 a	0±0	0.5±0.3 a	0.5±0.1 a	0.5±0 a	0.4±0.2 a	8.5±0.5 b	5.5±1.1 a	2.2±0.3 b
2016															
1	11.2±1.3 a	0.9±0 c	5.6±0.9 a	0.4±0.1 a	nd	nd	26±1 c	0±0	4.5±1.3 b	4.1±2.2 b	1.3±0.1 c	1.6±0.1 c	4.5±0.9 a	9.8±1.9 b	0.2±0.3 a
2	9.7±2.4 a	0.8±0.1 c	6.2±0.9 b	0.3±0.1 b	nd	nd	21±3.6 b	0±0	2.8±1.4 b	2.9±2.2 ab	0.7±0.1 b	1.1±0.2 b	5.5±0.5 a	7.3±0.4 a	0.6±0.3 ab
3	9.1±3.7 a	0.6±0 b	6.5±0.8 c	0.1±0 bc	nd	nd	16.6±1.4 a	0±0	0.8±0.1 a	0.5±0.1 a	0.4±0.1 a	0.6±0.1 a	6.9±0.8 b	6.5±0.7 a	0.8±0.4 b
3S	9.6±1.4 a	0.4±0 a	6.2±0.7 bc	0.1±0 c	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2017															
1	3.6±0.7 a	0.9±0 c	4.3±0.9 a	0.4±0.1 a	nd	159±53.5 a	21.7±1.6 a	1.2±0.1 a	2.9±0.8 b	2.4±0.8 b	1.2±0.1 b	1.9±0.2 c	4.3±0.7 a	6±0.9 a	1.8±0.4 a
2	1±0.5 b	0.9±0 c	3.2±0.6 a	0.4±0 b	nd	147.9±30.1 a	21.1±1.5 a	1.2±0.1 a	2.5±1.7 b	1.1±0.1 a	1.1±0.1 b	1.3±0.1 b	4.3±1.4 a	6.4±0.9 a	3.1±0.9 b
3	2.7±1 ab	0.5±0 b	2.9±0.7 a	0.2±0 c	nd	166.3±58.8 a	20.8±1.9 a	1±0.1 b	1.2±0.5 a	0.9±0 a	0.9±0 a	1±0.1 a	6.7±1.1 b	5.9±0.9 a	3.1±0.9 b
3S	1.9±1.1 b	0.5±0 a	4.3±0.9 a	0.2±0 d	nd	188.8±67.1 a	21.2±3.2 a	1.1±0.1 c	1±0.1 a	1±0.1 a	0.8±0.3 a	1.1±0.1 a	7±1.7 b	6±1 a	3.3±1 b
2018															
1	9.4±4.4 a	0.9±0 c	6.7±0.8 a	0.4±0.1 a	365.3±57.7 b	213.8±76.9 a	16.9±4.4 b	0±0	2.4±1.2 b	1.8±1.1 b	0.9±0.1 c	2.2±0.5 c	4.1±1.7 a	5.6±1.4 a	0±0 a
2	7.1±3.8 b	0.9±0 c	6.2±0.6 a	0.3±0 b	471.5±38.4 c	249±74.5 a	14.7±1.3 a	0±0	0.8±0.2 a	0.5±0 a	0.6±0.1 b	0.9±0.3 b	4±0.8 a	6±1.3 a	2±0.6 b
3	10.4±4.1 b	0.5±0 b	6.4±0.8 a	0.1±0 b	307.5±68.1 a	202.2±89.2 a	16.2±1.6 ab	0±0	0.6±0.1 a	0.4±0 a	0.5±0 a	0.6±0.1 a	5.9±0.8 b	5.9±1.2 a	2.3±0.7 b
3S	24.7±13.5 b	0.4±0 a	6.8±1.6 a	0.1±0 c	314.2±40.7 a	235.8±74.5 a	16.1±1.9 ab	0±0	0.7±0.2 a	0.5±0.1 a	0.5±0 a	0.5±0.1 a	6±1.1 b	5.7±1.4 a	2.3±0.5 b
2019															
1	0±0 a	0.9±0 d	6.1±1.3 a	0.4±0 a	310±55.3 c	263.6±46.6 a	23.9±3.5 b	0.9±0.1 a	4.1±1.3 b	3.6±1.1 c	1.5±0.1 b	2.6±0.3 c	3.7±0.7 a	6.5±1.8 a	1±0.1 a
2	0±0 b	0.8±0.1 c	5.8±0.9 a	0.4±0.2 b	270.4±38.8 b	319.1±46.2 b	17.5±1.5 a	0.8±0.1 a	1±0.1 a	0.9±0.1 ab	0.8±0.1 a	1±0.3 a	5.8±1 b	5.5±0.7 a	1.7±0.3 bc
3	0.1±0 b	0.5±0.1 b	6.1±1.1 a	0.1±0 c	244.1±27.6 ab	340.1±52.7 b	17.5±4.6 a	0.8±0.2 a	0.8±0.3 a	0.9±0.2 ab	0.8±0.2 a	0.8±0.2 a	6±1.9 b	5.5±1.8 a	1.8±0.6 bc
1S	0±0 b	0.4±0 a	6.2±1.3 a	0.1±0 bc	214.5±37.5 a	350.2±43.3 b	18.9±2.4 a	0.8±0.2 a	1.1±0.2 a	0.9±0.1 b	0.9±0.1 a	1.2±0.3 b	6±1.3 b	6.4±1.6 a	1.5±0.4 b
2S	0±0 b	0.4±0 a	6.6±0.6 a	0.1±0 bc	235.5±30 a	319.2±40.8 b	18.1±2.4 a	0.8±0.2 a	1±0.1 a	0.5±0.4 a	0.8±0.2 a	0.8±0.3 a	6.3±1.3 b	5.9±1.3 a	2±0.4 c
3S	0.1±0 b	0.5±0.1 a	6±0.8 a	0.1±0 b	274.6±67.6 bc	320.7±43.8 b	18.9±2.5 a	0.8±0.2 a	1±0.1 a	0.8±0.3 ab	0.9±0.1 a	0.9±0.1 a	6.5±1.1 b	5.9±1.3 a	2±0.3 c
2020															
1	11.5±3.5 a	0.9±0.1 d	5.5±1 a	0.3±0.1 a	241.6±28.8 b	313.5±153.8 a	13±2.4 b	0±0.1 a	0.8±0.8 b	0.6±0.7 b	0.3±0.2 b	1.1±0.8 c	5.1±1.4 a	4±1.1 ab	1.1±0.9 a
2	17.8±13.3 a	0.6±0.2 b	6.4±0.6 b	0.1±0 a	232.8±26.7 ab	296.4±166.4 a	11.3±1.5 a	0.1±0.1 a	0.2±0.1 a	0±0.1 a	0±0 a	0.2±0.3 a	5±1.2 a	3.8±0.8 ab	1.9±0.8 b
3	5.6±3.2 a	0.7±0 c	5.9±0.9 ab	0.2±0 a	207.1±30.5 a	321.8±162.5 a	12.6±2.1 ab	0.1±0 a	0.1±0.1 a	0±0 a	0±0 a	0.2±0.4 a	5.8±1.6 a	4.2±0.7 b	2.1±1.3 b
1S	11.7±4 a	0.5±0 a	5.6±1 ab	0.1±0 a	207.9±25.6 a	319.2±188.6 a	11.2±1.7 a	0.1±0.2 a	0.3±0.3 a	0.1±0.2 a	0.1±0.1 a	0.7±0.4 b	5.1±1.4 a	3.4±0.7 a	1.4±0.9 ab
2S	17.6±7.1 a	0.4±0 a	5.6±1 ab	0.1±0 a	232.8±49.3 ab	315.7±170.2 a	11.2±2.1 a	0±0.1 a	0.2±0.2 a	0±0 a	0±0 a	0.3±0.3 a	5±1.5 a	3.6±0.8 ab	2.1±1.1 b
3S	6.9±3.5 a	0.4±0 a	5.9±0.9 ab	0.1±0 a	242.6±51.1 b	310.8±158.4 a	12.5±1.9 ab	0.1±0.1 a	0.1±0.2 a	0±0 a	0±0 a	0.2±0.4 a	5.8±1.2 a	4.2±0.8 b	2±1 b
2021															
1	8.8±5 ab	0.8±0.1 c	nd	nd	247.6±59.2 d	428.5±105.8 c	19.8±4.4 b	1.2±0.1 b	2.9±2 b	2.9±1.9 b	1.3±0.3 d	2.1±0.5 d	3.6±0.7 a	4.7±0.8 a	1.3±1.1 a
2	0±0 b	0.8±0.1 c	nd	nd	220.2±46.9 cd	348.5±68.2 bc	17.3±1.1 ab	1±0.1 ab	1.1±0.3 a	0.5±0.7 a	0.9±0.1 c	1.4±0.4 c	4.3±0.7 a	5.3±0.8 ab	2.7±1.3 b
3	8.9±4.5 bc	0.8±0.1 c	nd	nd	208±54.7 bd	254.6±148.7 ab	15.1±2.4 a	0.9±0.2 ab	0.6±0.4 a	0±0 a	0.2±0.4 a	0.8±0.1 ab	5.2±1.4 bc	4.4±0.8 a	2.9±0.6 b
1S	5.3±2.4 ac	0.5±0 a	nd	nd	198.3±53.9 abc	343.5±148.4 bc	19±1.7 b	1.1±0.2 ab	0.9±0.1 a	0.7±0.4 a	0.6±0.4 b	1.1±0.3 bc	5.7±1.2 c	6.1±1.3 bc	2.9±1.2 b
2S	8.1±5.9 bc	0.4±0 a	nd	nd	175.6±39.1 ab	306±131.8 bc	18.1±2 b	0.9±0.5 a	1.1±0.1 a	0.2±0.4 a	0±0 a	0.7±0.4 a	5.6±1.9 c	6.8±1.7 c	2.9±1.1 b
3S	10.9±4.8 a	0.6±0 b	nd	nd	159.5±34.1 a	192.8±81.1 a	15.4±1.7 a	1.1±0.2 ab	0.8±0.4 a	0±0 a	0±0 a	0.8±0.4 a	5±1.2 ac	5.1±0.7 ab	2.8±0.4 b



The percentages of factors explaining the observed variance in these seed characteristics are presented in Figure V.4 and Table V.S1. This analysis, carried out over 8 years with a minimum of 5 genotypes at 6 stages of development, showed that the year of collection explained a large part of the variance (for the content of dw, total carbohydrates, sucrose, as well as the germination). Harvest date was also involved (for water activity, stachyose, fructose and glucose content) as well as genotype (for lipid and raffinose content).

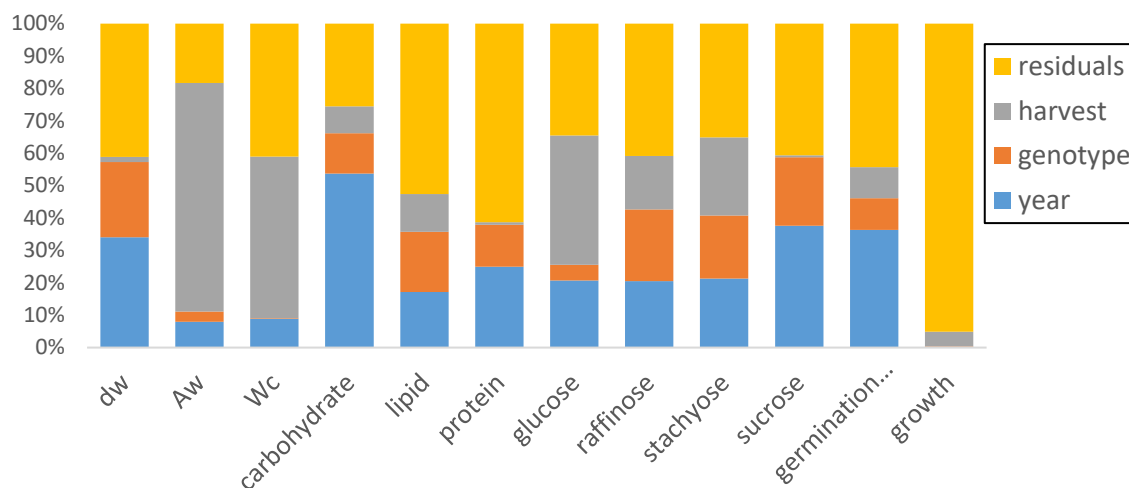


Figure V.4. Percentage of the factors, harvest genotype or year, in the explained variance for the parameters in the abscise axis. Dw, dry weight; Aw, water activity; Wc, water content.

Table V.S1 Percentage of explained variance for each parameter. Years: n=7-8; genotypes: n: up to 7; harvests: n=6.

parameter	ANOVA				
	year	genotype	harvest	interaction year:genotype	interaction year:harvest
fructose	20.4 ***	5.9 ***	37.5 ***	8.9 ***	11.8 ***
galactose	82.1 ***	2 ***	2.2 ***	4.7 ***	1.5 ***
glucose	20.7 ***	4.9 ***	39.9 ***	9.7 ***	9.9 ***
myo-Inositol	53.4 ***	3.7 ***	22.9 ***	2.8 ***	10.2 ***
raffinose	20.5 ***	22.2 ***	16.5 ***	9.4 ***	7 ***
stachyose	21.3 ***	19.5 ***	24.1 ***	5.6 ***	5.3 ***
sucrose	37.6 ***	21.2 ***	0.6 ***	7.9 ***	7.4 ***
tot carb.	53.7 ***	12.5 ***	8.3 ***	6.6 ***	5.7 ***
protein	25 ***	12.9 ***	0.8 ***	35 ***	3.5 ***
lipid	17.2 ***	18.5 ***	11.7 ***	6.7 ***	8.9 ***
Aw	8 ***	3.1 ***	70.6 ***	2.3 ***	13 ***
Wc	8.8 ***	0.2 .	49.9 ***	1 ***	19.4 ***
dw	34.1 ***	23.2 ***	1.6 ***	1.0 *	6.3 ***
germination rate	36.3 ***	9.8 ***	9.6 ***	2.6 ***	16.3 ***
growth	0.1	0.3	4.5 ***	3.2 ***	1.7 ***

Tot carb., total carbohydrate; \*\*\*, pvalue < 0.0001; \*, pvalue < 0.05; ., pvalue < 0.1.

Proteomic studies were carried out at these 6 harvests comparing on the one hand the harvests 1, 2 and 3 and on the other hand the harvests 1S, 2S and 3S, in order to understand the effect of maturation on the proteomes and to analyze if this maturation effect persists after drying. A total of 1510 different proteins were identified, with 1158 proteins in the fresh seeds including 740 common to the 3 harvests, and 1198 in the dried seeds, including 798 common to the 3 corresponding harvests. These proteomes were very similar to each other, leading to a small number of proteins with statistically significant abundance difference ( $p < 0.05$ ). Their characteristics are presented in Table V.S2 with the condition when they appeared significant. The functional analysis of these proteins was made using the terms of Genes ontology (GO) associated with proteins. For many proteins, the number of associated GOs of the Biological Process category was too large to be explicit and to allow their interpretation, then a reduction of these terms was made by assigning a GO biological process keyword (named kBP) to each protein (Table V.S2).

In the seeds, the biological process activated or decreased for each study are presented in Table V.2. The proteins associated with the translation BPs are progressively reduced with the maturation of the seeds, whereas protein modifications and transports are important at each harvest. Many "lipid metabolic processes" are activated during the maturation, corresponding more to structure modification than new lipid synthesis. All these activities are supported by the production of precursor metabolites and energy. The protein GEM-like protein 5, associated to the biological process "seed maturation" is activated in the harvest 2 and 3 in comparison to harvest 1. It is involved in the dormancy activation in the seed during the late maturation stage. The numerous responses to stress, to biotic/abiotic stimuli are amplified with maturation, having some consequences on the stabilization of proteins, the organization of the cytoskeleton in order to regulate cell homeostasis.

As in fresh seeds, the proteomes are not identical in seeds dried for 18 weeks, they are dependent on the date of collection. Overall, the primary metabolism changes little between the 1S, 2S and 3S harvests as shown by the weak change in the abundance of the proteins involved in these reactions. Nevertheless, the enzymes participating into the degradation of proteins, or amino acids, are less and less expressed in harvests from 1S to 3S. And the lipid metabolism increases for the 2S and 3S harvests, accompanied by a degradation of these lipids (neutral ceramidase), by oxidation of the fatty acids (acetyl-CoA acetyltransferase). Proteins involved in protein modification processes are further modulated depending on harvest date. This is the case for proteins involved in protein folding (HSP, chaperone, RuBisCo). This biological process is not systematically linked to a perception of stress in the cells. However, several stresses are detected as revealed by the changes in the abundance of proteins linked to the maintenance of homeostasis (Late embryogenesis abundant protein 47) and the prevention (or neutralization) of oxidation-reduction reactions. This stress seems to be greater in the 2S harvest (transaldolase with formation of NADPH, nucleoside diphosphate kinase) than in the other 2 harvests. In the 1S and 2S harvests, peroxiredoxin, superoxide dismutase [Cu-Zn] are overexpressed compared to the 3S harvest. During these 1S and 2S harvests, the proteins involved in the organization of the cytoskeleton are significantly less abundant than during the 3S harvest.

Table V.2. Gene ontology Biological process keywords (kBP) for biological process of proteins expressed differently when comparing A/ the maturation stage on undried seeds (harvests 1, 2 and 3) ; B/ the maturation stage on dried seeds (harvests 1, 2 and 3) ; C/ the effect of drying according to the maturation of the seeds (all harvests). <sup>a</sup> x/y comparison of the 2 seed proteomes from the harvest x and y respectively, <sup>b</sup> correspond to proteins expressed more in the 1<sup>st</sup> harvest (x) in comparison to the second harvest of the ratio (y) and *vice versa*.

A/ kBP	1 / 2 <sup>a</sup> up <sup>b</sup>	1 / 3 up	2 / 3 up	1 / 2 down <sup>b</sup>	1 / 3 down	2 / 3 down
amino acid catabolic process				1	1	
anatomical structure development			1	1	1	
carbohydrate catabolic process	1				1	1
carbohydrate metabolic process	5	2	2	1	2	
cell growth		1	1			
cell wall organization or biogenesis			1			
cellular homeostasis						1
cellular oxidant detoxification				2		
chromosome organization			1	1		1
cytoskeleton organization		1		1	1	2
embryo development		1		1		
generation of precursor metabolites and energy	2	2	2			2
lipid catabolic process		1				
lipid metabolic process	1	2	1			1
mRNA processing		1		1	1	
multicellular organism development			1			
nucleobase-containing compound metabolic process			1			
photorespiration			1			
protein catabolic process		1	1			
protein folding	1	2	1			1
protein metabolic process	1	1			1	1
protein modification process			2			1
protein stabilisation						1
protein targeting				1	1	1
response to abiotic stimulus		2		1	2	1
response to abiotic stress						1
response to biotic stimulus	1			1	1	1
response to stress	1	1	2	1	1	3
response to stress;protein folding		1	1	1	1	
response to stress;protein maturation			1			
rna metabolic process						1
secondary metabolic process			1			
seed maturation					1	1
small molecule metabolic process	1	2	1	1	1	
translation	5	7	3		1	1
transport			2	1	1	3

B/ kBP	1S / 2S <sup>a</sup> up <sup>b</sup>	1S / 3S up	2S / 3S up	1S / 2S down <sup>b</sup>	1S / 3S down	2S / 3S down
anatomical structure development				1	1	1
carbohydrate metabolic process	1			1	1	
cell wall organization or biogenesis				1	1	
cellular homeostasis	1	1				
cellular oxidant detoxification		3				
chromosome organization	2				1	2
cytoskeleton organization	1	3	1			1
generation of precursor metabolites and energy	1	1		1	2	
killing of cells of another organism					1	1
lipid catabolic process			1		2	1
lipid metabolic process					1	2
mRNA processing		1	1			
nucleobase-containing compound metabolic process	1	2		3	1	2
post-embryonic development		1	1			
protein catabolic process	2	2	1			
protein folding		1	1		1	1
protein metabolic process					1	
protein modification process	1	1	3	2	1	2
protein targeting			2	1		1
regulation of gene expression		1				
response to abiotic stimulus		1			1	
response to biotic stimulus				1	1	1
response to stress		1	1	1		
response to stress;protein folding		1	2	4		
response to stress;protein maturation			1			
response to stress;water deprivation				1	1	
rna metabolic process	1			1	1	
seed maturation		2	1		2	
small molecule metabolic process	1			1	1	1
translation	1	3	1	2	3	3
transport	2				1	1

C/ kBP	1S / 1 <sup>a</sup> up <sup>b</sup>	2S / 2 up	3S / 3 up	1S / 1 down <sup>b</sup>	2S / 2 down	3S / 3 down
amino acid catabolic process	1					
anatomical structure development				2		
carbohydrate catabolic process	1	2	1			
carbohydrate metabolic process		3		3	2	1
cell wall organization		1				
cell wall organization or biogenesis		1				
cellular homeostasis				1		
cellular oxidant detoxification		1				2
chromosome organization					1	
cytoskeleton organization		1	1			2
defense response to bacterium						1
dna metabolic process		1				
generation of precursor metabolites and energy		1		1		
killing of cells of another organism			1			
lipid catabolic process		1	1		1	2
lipid metabolic process		1		1		
mRNA processing						1
protein catabolic process		3		1	2	
protein folding		1	2		1	1
protein metabolic process		1				
protein modification process			2	1	1	1
protein targeting	1	1			2	3
regulation of gene expression					1	
regulation of molecular function						1
response to abiotic stimulus	1	1				
response to biotic stimulus	2		1		1	
response to stress			2	1		
response to stress;protein catabolic process		1				
response to stress;protein folding	1	1		1	1	3
secondary metabolic process	1				1	
seed maturation			1			1
small molecule metabolic process	1	3		1	3	
translation		4	2	2		
transport		1			1	

## **Question 2: What are the biochemical and molecular changes in response to the drying of seeds?**

The analysis of the evolution of the characteristics between fresh seeds and dry seeds at each harvest date (Figure V.S1) should provide elements of knowledge on the modifications taking place in the seeds during this stage. For this we compared the evolution of the biochemical characteristics of the seeds before and after drying, comparing 1 with 1S, 2 with 2S and 3 with 3S (Figure V.1, Table V.1).

Water activity, a marker of water content, decreases during drying to a common value for the dried seeds of the 3 harvests, this decrease was higher for harvests 1 and 2 than for the harvest 3. The protein and carbohydrate contents showed no change following this drying. But the drying modified the carbohydrate profile: glucose, fructose, pinitol and myo-inositol decreased, while raffinose and stachyose increased during drying for the 3 harvests. The lipid content decreased for the harvests 1 and 2, while it was unchanged by the drying of the harvest 3.

The proteomic analysis corresponded to the comparison of the proteomes of the seeds of each harvest before and after drying. Among the 1510 proteins identified in these proteomes, few proteins had a statistically significant difference in abundance between these 2 hydration states: around 27 for 1-1S and 3-3S while this number is 50 for comparison 2 -2S. The stringent conditions chosen ( $p < 0.05$  for a minimum of 3 biological replicates out of the 5 carried out) could explain these results. Among the 91 significant proteins observed in this study, only 15 were common to at least 2 comparisons. These proteins have been mainly analyzed through the biological processes in which they participate. Proteins whose abundance was modulated by drying were very relevant to primary metabolism and stress responses. Regarding protein metabolism, the biological processes involved in their synthesis were amplified in dry seeds. Those related to their modification, refolding and catabolism were active in both seed states, whereas those related to their transport were amplified in fresh seeds. The drying of the seeds on the biological processes related to carbohydrates induced an increase in their catabolism while the various structural modifications of the carbohydrates were increased or decreased by the drying in order, among other things, to support variable metabolic pathways. Some of these carbohydrate metabolic processes, like lipid catabolic processes, reduce NADH, thereby activating redox pathways to control the oxidative state of cells.

The other major type of biological process modulated by drying is the response to stress, whatever its type (biotic, abiotic, stimulus, etc.). Responses could be activated both in the fresh and dry state of the seeds, responding to different stimuli and sometimes involving specific signaling pathways. Thus, the lack of water seemed to be one of the factors triggering the responses to abiotic stresses in the seeds of the 1S and 2S harvests. And biotic stress responses were activated in association with abscisic acid (ABA) and auxin by drying the seeds of harvests 1 and 3, but repressed by drying the seeds of harvest 2. Drying the seeds of harvest 3 also caused the activation of a protein involved in antifungal resistance. One of the responses to these stresses was the increase in proteins involved in the maintenance or folding of present proteins (BP response to stress; protein folding). An amplification of this response was detected both in fresh and dry seeds from harvests 1 and 2, whereas it was reduced during the drying of seeds from harvest 3. The higher number of significant proteins in the seed proteome of harvest 2 revealed a greater impact of drying at this maturation stage than at an earlier or later stage. Biological processes modulated by drying often relate to seed maturation and the protections put in place for the molecular preservation of seed content. They are: cellular oxidant detoxification, response to

stress; protein catabolic process, response to abiotic stimulus, cytoskeleton organization, cell wall organization or biogenesis (participation in the seed dormancy establishment).

### Question 3: What is the optimal harvest date?

This search for the optimum date for harvesting the seeds was carried out taking into account the expectation of the profession to have seeds with the best germination and growth capacities. The germination tests were carried out with seeds from the 6 harvests, and were followed by the planting of the seedlings in the ground and their growth measurement after 2 years. The results are presented in Table V.3. The different harvest dates had no significant effect on the germination rates, which varied from 67.2% to 76.5%, whether the seeds had been previously dried or not. Only the last seeds harvested after drying (harvest 3S) were significantly different from those harvested at the most immature stage (harvests 1 and 1S). The growth of the plants seems linked to the duration of maturation, independently of their drying (harvest 1S < harvests 2-2S < harvests 3-3S). Analysis of the correlation coefficients between this growth and the biochemical characteristics of the seeds revealed the effect of the total carbohydrate content ( $R^2=0.79$ ). Among carbohydrates, the strongest correlations were observed with simple sugars such as galactose ( $R^2=0.75$ ), myo-inositol ( $R^2=0.72$ ) and sucrose ( $R^2=0.72$ ).

Table V.3. Germination yields and growth of the seedling 2 years after sowing, in relation to the harvest of the seeds. Data are presented as mean values  $\pm$  standard deviations of 4 biological replicates of seed lots. Significant differences at  $P < 0.05$  are indicated by letters (ANOVA, Tukey). The harvests 1S, 2S and 3S correspond respectively to the harvests 1,2 and 3 after 18 weeks of drying. n=225

Harvest	Germination rate (%)	Growth (mm)
1	67.2 $\pm$ 20 <sup>ab</sup>	nd
2	70.9 $\pm$ 11 <sup>ac</sup>	nd
3	76.5 $\pm$ 11 <sup>bc</sup>	851.4 $\pm$ 217 <sup>b</sup>
1S	64 $\pm$ 14 <sup>a</sup>	777.6 $\pm$ 247 <sup>a</sup>
2S	71.8 $\pm$ 13 <sup>a</sup>	820.4 $\pm$ 214 <sup>b</sup>
3S	76.7 $\pm$ 9 <sup>c</sup>	848.1 $\pm$ 222 <sup>b</sup>

Table V.4. Coefficients of correlation of linear regression between biochemical components of the seed content and seedling growth 2 years after germination.

	R <sup>2</sup>
A <sub>w</sub>	-0.11
dw (mg.seed <sup>-1</sup> )	-0.37
lipid (µg.mg <sup>-1</sup> dw)	0.43
protein (µg.mg <sup>-1</sup> fw)	0.3
carbohydrate (µg.mg <sup>-1</sup> dw)	0.79
galactose (µg.mg <sup>-1</sup> dw)	0.75
glucose (µg.mg <sup>-1</sup> dw)	0.66
fructose (µg.mg <sup>-1</sup> dw)	0.7
m-inositol (µg.mg <sup>-1</sup> dw)	0.72
raffinose (µg.mg <sup>-1</sup> dw)	0.46
saccharose (µg.mg <sup>-1</sup> dw)	0.72
stachyose (µg.mg <sup>-1</sup> dw)	0.1

A<sub>w</sub>: water activity; dw: dry weight; m-iositol : myo\_inositol.

Along with the analysis of the composition of the seeds, mid-IR measurements were made for 10 seeds from each batch. Figure V.5 presents the PCA established from these spectra according to the harvest. Crops 1 and 2 are clearly separated from the other crops according to the 1<sup>st</sup> principal component. The 2nd principal component hardly separates the harvests from each other. The infra-red absorbance is correlated to the biochemical content of the seeds. The prediction models of the biochemical components were established on the basis of statistical model PLS-R of analysis of the spectra. The statistics of these models are shown in Table V.5. The models yielded better coefficients of determination for A<sub>w</sub>, W<sub>c</sub> and galactose (R<sup>2</sup> from 0.82 to 0.76) than lipid (R<sup>2</sup> =0.57) and protein (R<sup>2</sup>=0.54) than the other soluble carbohydrates (R<sup>2</sup> close to 0.50). The starch was badly predicted (R<sup>2</sup>=0.35).



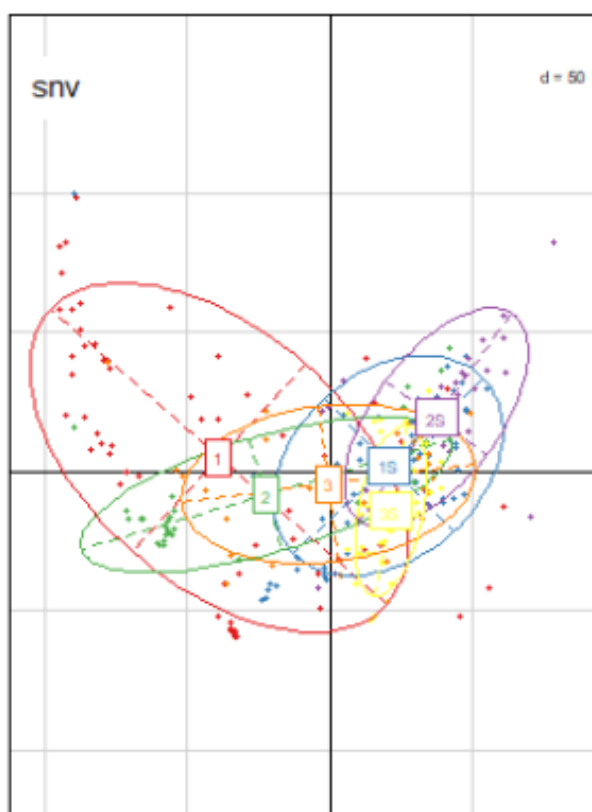


Figure V.5. PCA (PC1-PC2) of the mid-IR absorbance spectra of seeds at the 6 different harvests: 1, 2, 3 of fresh seeds between July and August and 1S, 2S and 3S of desiccated seeds after 18 weeks of drying.

Table V.5. Statistics for the prediction of biochemical content in larch seeds using PLS-R method.

	nLV	Train			Test		
		n	RMSEP	R <sup>2</sup>	n	RMSEP	R <sup>2</sup>
A <sub>w</sub>	15	504	0.1	0.75	168	0.07	0.83
Carbohydrates	15	643	3.07	0.47	215	2.68	0.51
Fructose	15	468	0.86	0.55	156	0.72	0.54
Galactose	15	264	0.25	0.7	88	0.19	0.81
Glucose	15	522	0.89	0.57	174	0.59	0.47
Lipid	15	432	42.48	0.63	144	26.91	0.51
Myo-inositol	15	570	0.29	0.52	191	0.24	0.63
Pinitol	15	666	0.43	0.57	222	0.41	0.52
Protein	15	576	56.26	0.53	192	56.64	0.54
Raffinose	15	688	1.05	0.5	230	1.05	0.53
Starch	15	668	0.64	0.35	223	0.62	0.35
Sucrose	15	697	1.03	0.44	233	0.97	0.41
W <sub>c</sub>	15	263	0.06	0.8	88	0.04	0.83

A<sub>w</sub>, water activity; nLV, number of latence variables; n, number of samples; RMSEP, root mean square error of prediction; R<sup>2</sup>, coefficient of determination; W<sub>c</sub>, water content.

A PLS-DA models based on mid-IR spectra were developed to discriminate the maturity stage of the seeds based on the harvest dates. The efficiency of the PLS-DA model in discriminating the different classes can be evaluated by the confusion matrix showing the percentage of correctly classified and misclassified samples (Table V.6). PLS-DA discriminated classes with varying degrees of accuracy, 88.9% for the harvest 1, 86.2% for the harvest 2, and 96.9% for the last one, which is the best predicted.

Table V.6. Calibration (A) and test (B) confusion matrix of PLS-DA classification expressed as percentage according to class corresponding to harvests, used as a proxy of maturity stage of larix seeds.

Note: The values in bold correspond to the correct predictions of each class.

A/		Real class			B/		Real class		
		1	2	3			1	2	3
Predicted class	1	<b>90</b>	5.2	2.4	Predicted class	1	<b>83.3</b>	2.7	0
	2	5.6	<b>84.3</b>	2.4		2	16.7	<b>91.9</b>	0
	3	4.4	10.4	<b>95.2</b>		3	0	5.4	<b>100</b>

**Question 4: What impacts of weather on seed maturity?**

*Ces résultats ne font pas partie de la thèse. Ils ne seront rédigés dès lorsqu'ils seront définitifs.*

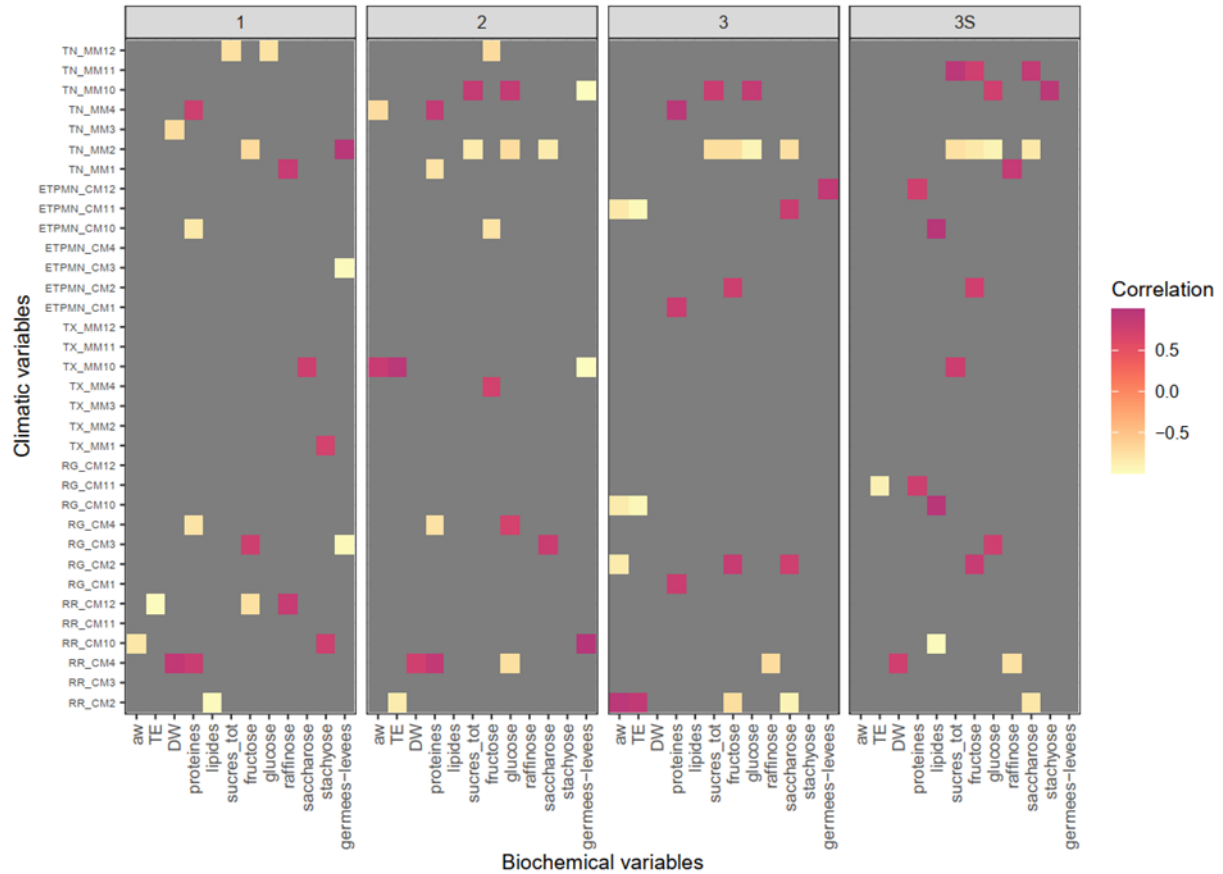


Figure V.6. Heatmap of the correlation values between the studied climatic variables and the measured biochemical variables. The number associated to a given climatic variable name represents the month of the sliding year, where month 1 is September and month 12 is August. For the sake of readability, variables from January to May are not represented. The climatic variables are the following: RR\_CM, precipitations; RG\_CM, solar radiation; TX\_MM, maximum temperature; ETPMN\_CM, evapotranspiration; TN\_MM: minimum temperature. Aw, water activity; TE, water content.

## Discussion

### Question 1: What happens during the end of seed maturation, before or after drying?

Seed maturation is a complex process involving various biochemical and physiological changes in the developing seed. Here we investigated some key aspects of biochemical evolutions occurring in larch seeds during late maturation steps, and after 18 weeks of drying under room temperature (Figure V.1).

During the collection period, from mid of July to end of August (harvest 1 to 3), a decrease in the water activity was clearly observed (from 0.9 to 0.6). According to statistical analyses, the activity of water and the water content were highly dependent on the harvest date. These results can be interpreted as reflecting the desiccation phase which resulted in a greatly reduced water content ( $0.1 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ dw}$  at harvest 3). This desiccation phase is crucial for the seed for its preparation to a quiescent state and germination (Angelovici et al., 2010). This stage still coincides with an active metabolism especially regarding the carbohydrate metabolism, as we saw with the evolution of some soluble carbohydrate contents. We notably observed the decrease in glucose and fructose content and the synthesis of RFO (raffinose, stachyose). Regarding carbohydrate composition, the decrease of hexoses and RFO accumulation were previously observed in ZE from *Picea abies* and *Pinus pinaster*, where it was considered to be a specific event occurring during late embryogenesis (Gösslová et al., 2001 ; Morel et al., 2014). In the seeds of numerous species, RFO have been regarded as being involved in desiccation tolerance et permit the survival of the seed under reduce water availability (Keller and Ludlow 1993; Black et al. 1999; Bailly et al. 2001; Hell et al., 2019). The active metabolic activity was also supported by our proteomic results showing the amplification of primary metabolic activity (translation, protein metabolic process, lipid metabolic process) and production of precursor metabolites and energy. This latter, is notably necessary for supporting the metabolic activity which are crucial for the seed to successfully achieved the transition to the quiescent state and promote the seed for further germination (Angelovici et al., 2010). For the harvest 2 and 3 in comparison to harvest 1, the protein GEM-like protein 5, associated to the kBP “seed maturation” was up-regulated. This protein is involved in the dormancy activation during the late maturation stage (Mauri et al., 2016). So from harvest 2, seed dormancy began to established and thus, marked the final phase of seed maturation (Bewley et al., 2013). Nevertheless, additional phytohormones analysis are needed to confirm the establishment of dormancy since ABA and gibberellins balance deeply regulate this process (Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006). In proteomic analyses, repressed kBP included “anatomical structure development”. This result supported that between harvest 1 and 3, the embryogenesis was completed and the reserve accumulation peak was passed while desiccation established. The end maturation was also supported by our analyses of seed reserve. Indeed, no significant evolution of the dw was observed, as well as the total protein content and composition as observed in their electrophoretic profile . It is state in *Arabidopsis* seeds that storage compound synthesis ends while the embryo becomes tolerant to desiccation (Baud et al., 2008). This is in accordance with our results. Regarding the dw and the reserve composition, they were mainly influenced by the year of harvest and the seed genotype (Figure V.4). In other terms, seed weight and composition can vary from year to year and can also be genotype-specific. The high impact of year and genotype over the seed composition is a common phenomenon

observed for different type of seeds and various types of seed reserve components (Lubowicki et al., 2005 ; Tulukcu et al., 2012 ; Sipeniece et al., 2021).

After the characterization of the seed maturation on tree, we would like to know if differences observed between 1, 2 and 3 seeds were whether maintained or fade after drying. For this purpose, we compared 1S, 2S and 3S seeds regarding their biochemical composition. After the drying of seed, the protein content decreased slightly between the 1S and 3S harvests. However, as observed for the harvest 1, 2 and 3, electrophoretic gel showed no changes in the storage protein profile or proportion in the proteome. The absence of major modifications of protein content is in accordance with the results at the proteome level which showed that the enzymes participating into the degradation of proteins, or amino acids, are less and less expressed in harvests from 1S to 3S. Total carbohydrate content did not change between seeds from 1S, 2S and 3S, but their carbohydrate profiles changed with notably an increase in raffinose and stachyose with a higher content for the seeds of the 3S harvest. These changes in RFO content and the synthesis of specific proteins implicated in desiccation tolerance support that maturation continues even if the cones were collected from the trees. During these 18 weeks of storage at outside temperature, the seeds are still in cones, which can encourage the continuation of the maturation processes. This is an advantage since an early harvest could probably be realized. Moreover, several stresses are detected as revealed by the changes in the abundance of proteins linked to the maintenance of homeostasis (Late embryogenesis abundant protein 47) and the prevention (or neutralization) of oxidation-reduction reactions. In the 1S and 2S harvests, peroxiredoxin, superoxide dismutase [Cu-Zn] are overexpressed compared to the 3S harvest. The appearance of these specific proteins are mostly implicated in desiccation tolerance (Oliver et al., 2020). These synthesis, as well as the increase in lipid content, revealed to be interesting since they demonstrated that the maturation is still active, particularly the events leading to desiccation tolerance, which participate to the final seed quality (Kijak and Ratajczak, 2020).

In conclusion, we saw that between harvest 1 and 3, seed composition and metabolic activity still evolved and even during the storage period (between harvest 1S and 3S).

## **Question 2: What are the biochemical and molecular changes in response to the drying of seeds?**

Cones containing seeds are usually collected and stored in a dry place with air circulation until they are processed. During this storage biochemical changes occurred as we saw previously. In this part we investigated the modifications made in seeds after 18 weeks of storage during which a drying of the cones, and consequently the seeds, occurred. Here we compared dried seeds to non-dried seeds, in other terms, we compared seeds from harvest 1 to 1S, 2 to 2S and 3 to 3S.

Regardless of the harvest date, the desiccation reduced the water content to  $0.1 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ dw}$  at the end of the drying treatment. The drying permitted seeds collected precociously to reach the level of that seeds collected from the harvest 3. This suggest that the drying allow the reduction of water content to a safe limit which maintain the seed viability during storage, allow long term storage and prevent fermentation and precocious germination (Bradford et al., 2018). Concerning the composition of seed reserves, significant variations in response to drying were observed for seeds collected at the harvest 1 and 2 while seeds collected at harvest 3 showed no biochemical modification after drying. This suggest that harvest 3 seeds had finished its reserve

accumulation at this harvest date. When seeds were collected at the harvest 1 and 2, regarding protein and lipid, we observed that drying induced the increase of protein content while lipid content decreased. After drying, no change in the total carbohydrate and sucrose content were observed. Nevertheless, galactose, glucose, fructose, myo-inositol and pinitol content diminished while stachyose and raffinose content increased. The modifications observed after drying were similar to those observed from harvest 1 to 3 on seeds that matured directly on the trees. This notably supports that the drying permitted the progression of the maturation. However, it is important to note that de modifications occurring after drying were enhanced compared to those occurring naturally during maturation on trees. As we discussed previously, to survive in the dry state, orthodox seeds acquire desiccation tolerance during their maturation (Matilla, 2022). The desiccation tolerance mechanisms allow seeds to remain dry without losing their ability to germinate (Leprince et al., 1993). Our results suggest that the application of a drying treatment after cones collection could improve the acquisition of desiccation tolerance in larch seeds. This latter is supported by the proteomic analysis in which protein and enzymes implicated in desiccation tolerance i.e. Late embryogenesis proteins, Heat shock proteins, Superoxide dismutase were up-regulated in dried seeds compared to non-dried seeds. The drying process also led to the amplification of proteins involved in the response to stress. We can suppose that the reduced water content could be one of the factors triggering these responses as it is the case for other species (Wang et al., 2015; Koobaz et al., 2020). One of the responses to these stresses was the increase in proteins involved in the maintenance or folding of proteins. An amplification of this response was detected both in seeds from harvests 1 and 2, whereas it was reduced after drying of seeds from harvest 3. The higher number of significant proteins in the seed proteome of harvest 2 revealed a greater impact of drying at this maturation stage than at an earlier or later stage. This suggests that harvest 2 seeds could be mature enough to permit drying to trigger accumulation of protective compounds against damages induced by water loss. In contrary, for seeds collected at harvest 1, the less effect of the drying could be attributed to the lack of seed maturity. For seeds collected at harvest 3, it is possible that they already acquired all the reserve needed, thus the drying is useless at this stage. Another possibility could be that the low water content ( $0.1 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ dw}$ ) at the harvest date prevented metabolic activities (El-Maarouf-Bouteau, 2022). Moreover, perhaps the harvest 3 seeds already enter the quiescent state at this time resulting in the slowdown of major metabolic activities (Considine et al., 2016). This latter hypothesis is supported by the down-regulation of many biological processes including “mRNA processing”, “protein folding”, “protein modification process” and “regulation of molecular function”. In conclusion, we showed in this part that (1) seed drying permitted seed harvested precociously to reach the level of water content of that seeds collected at the harvest 3, (2) drying induced changes in the reserve composition and triggered events related to acquisition of desiccation tolerance and (3) some slight differences especially on soluble carbohydrates content existed between 1S, 2S and 3S seeds and that drying did not permit precociously harvested seeds to recover characteristics of seeds collected at harvest 3.

### **Question 3: What is the optimum seed harvest date? and how to define it?**

High-quality seeds are essential for ensuring the reproduction and propagation of trees. Seed quality refers to the overall characteristics of seeds that determine their ability to germinate and establish vigorous plants (Hampton 2002). Methods of

evaluation of seed quality providing accurate prediction of seed performance under field conditions are needed by the seed industry (Matthews et al., 2012). Therefore, it is crucial to identify parameters defining the best seed quality in order to collect them at the right time to take advantage of their maximum potential and to ensure vigorous germination and plant growth. In this study, we identified these parameters by correlating the plant growth rate to the different biochemical components measured in larch seeds. Among the various biochemical compounds measured, total carbohydrate, galactose, myo-inositol and sucrose revealed a strong positive correlation ( $>0.7$ ) with plant growth rate. Carbohydrates are of great interest for the assessment of seed quality and vigor since they contribute to seed germinability and may influence the vigor during seedling establishment via various pathways (Gibson, 2005; Corbineau, 2012 ; Leprince and Buitink, 2010). Indeed, carbohydrates fulfil diverse major roles in seeds such as carbon and energy sources, stress protectants, osmotic regulators and signal molecules (Aguirre et al., 2018). Oligosaccharides, mainly RFO accumulate during seed maturation and are considered as storage reserve and a marker of desiccation tolerance (Buitink and Leprince, 2008; Bernal-Lugo and Leopold, 1995). These compounds could therefore be considered as potential predictors of plant growth capacity and consequently of seed quality. However, seed quality is a complex trait, so a single type of marker (carbohydrates) is not sufficient for a precise evaluation of seed quality (Corbineau, 2012). Thanks to these knowledges, besides the classical germination tests, the prediction of larch seed quality could be improved resulting in facilitating the decision-making regarding seed harvest. It is important to note that tests carried out in our study in watered soils, could have not permit seeds to express all their potential related the seed quality and plant growth.

Cones should be collected before they open to potentially limit seed loss. Moreover, cones collected too early may not have completed the maturation process, leading to an incomplete reserve accumulation that may affect seed quality. As well, if the cone moisture is too high, it can unfortunately lead to fermentation. Cutting tests can be used to determine if cones are ready to be harvested depending on embryo appearance and the level of desiccation (Owens, 2008). However, although this test is routinely used, it does not give a reliable representation of the seed status over the entire cones on the tree. Since seed drying triggers beneficial biochemical changes, it could potentially permit early harvesting and production of high-quality seeds (Martinez-Munoz et al., 2019). The drying process we investigated in this study consisted in storage of cones in unheated rooms for 18 weeks which is practical to apply in large scale. To determine if the seed maturation could end within the cone during the drying and if an early harvest could be considered without impacting seed performance, we compared 1S and 2S seeds to our reference, the 3S seeds, regarding their biochemical composition, germination and plant growth.

1S seed germination reached 64% which is less than for 2S and 3S seeds (72% and 77% respectively). As well, plants obtained from 1S seeds were smaller (777.6 mm on average) than those obtained from 2S and 3S seeds (820.4 mm and 848.1 mm on average respectively). Through these results, we can conclude that 1S seeds are less performant than 2S and 3S seeds which are equivalent in terms of their germination and plant growth. The difference between the performance of 1S seeds and 2S and 3S seeds could be attributed to the differences in the seed biochemical composition, as we saw with the question 1. 1S seed are then not mature enough to be collected

unlike 2S seeds. Our results proved that early harvest could finally be considered without affecting seed performance.

### **PLS-R models for the quantitative prediction of larch seed biochemical composition**

The seed industry needs a rapid evaluation method for seed characterization. IR spectroscopy is a technic that has been proved to be powerful for assessing seed quality (Rahman and Cho, 2016).

We investigated in this study the potential of mid-IR models to determine larch seed quality through quantitative prediction of their biochemical composition without any prior analysis, thereby saving time and seeds. The PLS-R calibration models developed in this study for the prediction of biochemical compound contents in larch seeds presented various level of correlation coefficients and predictive errors depending on the biochemical variable (see table V.5).  $W_c$ ,  $A_w$  and galactose were well-predicted ( $R^2 > 0.7$ ). Fructose, glucose, lipid, myo-inositol, pinitol, protein and raffinose showed an average quality prediction ( $R^2 = 0.5-0.6$ ). Total carbohydrate, starch and sucrose were badly-predicted ( $R^2 < 0.5$ ). For all models,  $R^2$  and RMSEP of the train data were similar with those of test data, thus suggesting that overfitting of model was not detected. Nonetheless, our models did not show very high correlation between spectra and laboratory measurement compared to models developed for other species which showed very high  $R^2$ . For carrot and Scots pine seeds the prediction of moisture content which is equivalent to the water content or activity of water reached a  $R^2$  greater than 0.9 (Lestander and Geladi, 2003; Szulc et al., 2020). In pumpkin seeds, total carbohydrate content was predicted with  $r^2$  reaching 0.91 (Ifmalinda et al., 2021). As well, protein and lipid are also usually predicted with high  $R^2$  value in seeds of various species (Baye et al., 2006; Kumar and Andy, 2013; Grunvald et al., 2014; Fassio et al., 2015; Jasinski et al., 2016; Zhang et al., 2018; Hacisalihoglu et al., 2020 ; Xu et al., 2020; Zhong et al., 2021). The difference in the prediction ability of our models compared to other studies can be explained since our seeds can present a great individual variability. Moreover, single-seed measurement gives noisier data than bulk seed measurement as reported Lestander and Geladi (2005) for pine seeds. Moreover, spectra acquisition and laboratory measurements were not carried out at the same time and with the exactly same seed since our method of spectra acquisition is destructive. This could notably induce a gap between spectra and biochemical reference values obtained from laboratory resulting in a decrease of the performance of the calibration models.

In summary, PLS-R models developed in this study for the characterization of larch seed composition presented high correlation coefficients and low predictive errors for water content, activity of water and glucose. These models can therefore be used. For the other variables, the correlation coefficients of models were not high enough to be utilized. To improve these models, the implementation of more samples is needed. Moreover, using near-IR instead of mid-IR could be relevant. As well, instead of PLS models, other statistical method for the correlation may improve the robustness of the model as it was demonstrated with the use of support vector machine method which is based on machine learning and fit better with non-linear regression as is could be the case for the complex variables observed in our study.



### **PLS-DA models for the discrimination of seeds in function of the maturation stage**

Our objective was to develop a model to discriminate larch seeds in function of their maturity level in order to rapidly determined if seeds should be collected or not. For this purpose, a classification model was developed using the statistical PLS-DA method to enable discriminant analysis according to the similarities and differences found in the mid-IR spectra. The robustness of the PLS-DA model is based on its ability to recognize members of a given group while rejecting non-members. The percentage of accuracy, which has to be as high as possible, gives the effectiveness of the model. The PLS-DA model included seeds from harvest 1 to 3, representative of different maturation levels. This model can predict the different classes with high accuracies for both calibration and test data (see table 5). The high prediction ability of the model for every class enables the use of this model with low possibility of misclassification. In conclusion, our results demonstrated the potential of mid-IR spectroscopy to successfully classify larch seed according to their maturation stage. This is very interesting particularly for forest seed industry which needs easy-to-use tools that facilitating decision-making for seed harvest. Many studies had demonstrated the power of infrared spectroscopy to discriminate seeds according to qualitative parameters i.e. seed provenance, seed viability but this study demonstrates for the first time that IR spectroscopy can be used for discrimination of larch seeds based on the level of maturation which is represented by the different harvests (harvest 1, 2 and 3) (Daneshvar et al., 2015; Farhadi et al., 2015; Farhadi et al., 2016; Farhadi et al., 2017; Tigabu et al. 2004; Tigabu et al. 2005). However, the main drawback of our method is that it is destructive. Nevertheless, it will be possible to adapt this method to non-destructive technic such as near-IR spectroscopy which is in addition portable for field measurement. This notably allows the direct decision making in seed orchard.

#### **Question 4: What impacts of weather on seed maturity?**

Discussion basée principalement sur des travaux non inclus dans cette thèse. Elle sera rédigée ultérieurement lorsque les résultats seront définitifs.

#### **Author Contributions**

Conceptualization, C.T., P.S. and M-A. L-W.; methodology, A.D., C.R., C.T., M-A. L-W., N.Bo. and P.S.; writing - original draft preparation, C.T., D.X. and P.S.; review, M-A. L-W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

#### **Acknowledgments**

We thank the INRAE-GBFor experimental unit in Orléans, (<https://doi.org/10.15454/1.5572308287502317E12>) and specially Benjamin Dimouro and Clémentine Bourderiau for all the seed preparations. We are grateful to Phénobois facility (INRAE, 2018. <https://doi.org/10.15454/1.5572410490640864E12>) for its facility for generation of the mid-IR raw data and its contribution to the methodologic development in infrared spectrometry and chimiometrics. This research has received fundings from the French Région Centre-Val de Loire (grant no. 2019 00134938) and FEDER (grant no. EX010182) by the *PRESTO* project, from French Ministères (grants no. XXX and 2014-352) by the *SECUR MFR* and *Quasegraine* projects respectively. We thank the PNRGF of Peyrat-le-Chateau and Guéméné-Penfao for the germination tests. We gratefully acknowledge Odile Rogier, for her valuable contribution to the bioinformatic help for proteomic studies.

### Data availability statement

Mid-IR data supporting the findings of this study are available from the corresponding author on request.

### References

1. Aguirre M, Kiegle E, Leo G, Ezquer I (2018) Carbohydrate reserves and seed development: an overview. *Plant Reproduction* 31(3): 263-290
2. Alan Ö, Eser B (2008) The effect of fruit maturity and post-harvest ripening on seed quality in hot and conic pepper cultivars. *Seed Science and Technology*. 36(2), 467-474
3. Alfonso OB, Ariza Mateos, David, Palacios Rodríguez, Guillermo, Ginhas, Manuel Alexandre, & Ruiz Gómez, Francisco J (2020) Seed protein profile of *Pinus greggii* and *Pinus patula* through functional genomics analysis. *Bosque (Valdivia)*, 41(3), 333-344
4. Angelovici R, Galili G, Fernie AR, Fait A (2010) Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends Plant Sci* 15(4): 211-218
5. Bailly C, Audigier C, Ladonne F, Wagner MH, Coste F, Corbineau F, Côme D (2001) Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. *Journal of Experimental Botany* 52(357): 701-708
6. Baud S, Dubreucq B, Miquel M, Rochat C, Lepiniec L (2008) Storage reserve accumulation in *Arabidopsis*: metabolic and developmental control of seed filling. *Arabidopsis Book*. 6, e0113.
7. Baye TM, Pearson TC, Settles AM (2006) Development of a calibration to predict maize seed composition using single kernel near infrared spectroscopy. *Journal of Cereal Science* 43(2): 236-243
8. Bernal-Lugo I, Leopold AC (1995) Seed stability during storage: Raffinose content and seed glassy state. *Seed Science Research* 5(2): 75-80
9. Bewley JD, Bradford KJ, Hilhorst HWM, Nonogaki H (2013) *Seeds: physiology of development, germination and dormancy*, 3rd ed Edn. Springer, New York, NY, p 392
10. Black M, Corbineau F, Gee H, Côme D (1999) Water content, raffinose, and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos. *Plant Physiology* 120(2): 463-472
11. Bradford KJ, Dahal P, Van Asbrouk J, Kunusoth K, Bello P, Thompson J, Wu F (2018) The dry chain: reducing postharvest losses and improving food safety in humid climates. *Trends Food Science Technology*. 71, 84–93.
12. Buitink J, Leprince O (2008) Intracellular glasses and seed survival in the dry state. *Comptes Rendus Biologies* 331(10): 788-795

13. Casimiro-Soriguer CS, Muñoz-Mérida A, Pérez-Pulido AJ (2017) Sma3s: A universal tool for easy functional annotation of proteomes and transcriptomes. *PROTEOMICS* 17(12): 1700071
14. Coelho CMM, Benedito VA Seed Development and Reserve Compound Accumulation in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). 2008 2008,
15. Corbineau F (2012) Markers of seed quality: from present to future. *Seed Science Research* 22(S1): S61-S68
16. Crawford AD, Plummer JA, Probert RJ, Steadman KJ (2011) The influence of cone age on the relative longevity of *Banksia* seeds. *Annals of Botany* 107(2): 303-309
17. Daneshvar A, Tigabu M, Karimidoost A, Oden P (2015) Single seed near infrared spectroscopy discriminates viable and non-viable seeds of *Juniperus polycarpus*. *Silva Fennica* 49(5)
18. Dinakar C, Bartels D (2013) Desiccation tolerance in resurrection plants: new insights from transcriptome, proteome and metabolome analysis. *Front Plant Sci* 4: 482
19. Dray S, Dufour A-B (2007) The ade4 Package: Implementing the Duality Diagram for Ecologists. *Journal of Statistical Software* 22(4): 1 - 20
20. Dronne S, Label P, Lelu M-A (1997) Desiccation decreases abscisic acid content in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*) somatic embryos. *Physiologia Plantarum* 99(3): 433-438
21. El-Maarouf-Bouteau H (2022) The seed and the metabolism regulation. *Biology* (Basel). 11(2), 168
22. Engel J, Gerretzen J, Szymańska E, Jansen JJ, Downey G, Blanchet L, Buydens LMC (2013) Breaking with trends in pre-processing? *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 50: 96-106
23. Farhadi M, Tigabu M, Odén P (2015) Near Infrared Spectroscopy as non-destructive method for sorting viable, petrified and empty seeds of *Larix sibirica*. *Silva Fennica* 49(5)
24. Farhadi M, Tigabu M, Pietrzykowski M, Danusevičius D, Odén PC (2017) Application of near infrared spectroscopy for authentication of *Picea abies* seed provenance. *New Forests* 48(5): 629-642
25. Farhadi M, Tigabu M, Stener L-G, Odén PC (2016) Feasibility of visible + near infrared spectroscopy for non-destructive verification of European x Japanese larch hybrid seeds. *New Forests* 47(2): 271-285
26. Fassio AS, Restaino EA, Cozzolino D (2015) Determination of oil content in whole corn (*Zea mays* L.) seeds by means of near infrared reflectance spectroscopy. *Computers and Electronics in Agriculture* 110: 171-175
27. Feder ME, Hofmann GE (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology* 61(1): 243-282

28. Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G (2006) Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* 171(3): 501-523
29. Font R, Del Río-Celestino M, De Haro-Bailón A (2006) The use of near-infrared spectroscopy (NIRS) in the study of seed quality components in plant breeding programs. *Ind Crop Prod* 24(3): 307-313
30. Gautier F, Eliášová K, Leplé J-C, Vondráková Z, Lomenech A-M, Le Metté C, Label P, Costa G, Trontin J-F, Teyssier C, Lelu-Walter M-A (2018) Repetitive somatic embryogenesis induced cytological and proteomic changes in embryogenic lines of *Pseudotsuga menziesii* [Mirb.]. *BMC Plant Biology* 18(1): 164-188
31. Gautier F, Label P, Eliášová K, Leplé J-C, Motyka V, Boizot N, Vondráková Z, Malbeck J, Trávníčková A, Le Metté C, Lesage-Descauses M-C, Lomenech A-M, Trontin J-F, Costa G, Lelu-Walter M-A, Teyssier C (2019) Cytological, biochemical and molecular events of the embryogenic state in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* [Mirb.]). *Frontiers in Plant Science* 10(118)
32. Gibson SI (2005) Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 8(1): 93-102
33. Gorian F, Pasquini S, Daws MI (2007) Seed size and chilling affect germination of *Larix decidua* Mill. seeds. *Seed Science and Technology* 35(2): 508-513
34. Gösslová M, Svobodová H, Lipavská H, Albrechtová J, Vreugdenhil D (2001) Comparing carbohydrate status during norway spruce seed development and somatic embryo formation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 37(1): 24-28
35. Graham IA (2008) Seed Storage Oil Mobilization. *Annual Review of Plant Biology* 59(1): 115-142
36. Grunvald AK, Carvalho CGPD, Leite RS, Mandarino JMG, Andrade CADB, Scapim CA (2014) Predicting the oil contents in sunflower genotype seeds using near-infrared reflectance (NIR) spectroscopy. *Acta Scientiarum Agronomy* 36(2): 233
37. Hacisalihoglu G, Freeman J, Armstrong PR, Seabourn BW, Porter LD, Settles AM, Gustin JL (2020) Protein, weight, and oil prediction by single-seed near-infrared spectroscopy for selection of seed quality and yield traits in pea (*Pisum sativum*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 100(8): 3488-3497
38. Hackett-Pain A, Bogdziewicz M (2021) Climate change and plant reproduction: trends and drivers of mast seeding change. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 376(1839): 20200379
39. Hampton J G (2002) What is seed quality. *Seed Science Technology* 30, 1-10.
40. Hartmann H, Trumbore S (2016) Understanding the roles of nonstructural carbohydrates in forest trees – from what we can measure to what we want to know. *New Phytologist* 211(2): 386-403
41. Hell AF, Kretschmar FS, Simões K, Heyer AG, Barbedo CJ, Braga MR, Centeno DC (2019) Metabolic changes on the acquisition of desiccation tolerance in seeds of the brazilian native tree *Erythrina speciosa*. *Frontiers in Plant Science* 10: 1356

42. Hoekstra FA, Golovina EA, Buitink J (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science* 6(9): 431-438
43. Ifmalinda, Andasuryani, Santosa, Putri I (2021) The application of NIRS method for non-destructive measurement of fat and carbohydrates in pumpkin seeds. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Vol 922.
44. Jasinski S, Lécureuil A, Durandet M, Bernard-Moulin P, Guerche P (2016) Arabidopsis Seed Content QTL Mapping Using High-Throughput Phenotyping: The Assets of Near Infrared Spectroscopy. *Frontiers in Plant Science* 7
45. Keller F, Ludlow MM (1993) Carbohydrate metabolism in drought-stressed leaves of pigeonpea (*Cajanus cajan*). *Journal of Experimental Botany* 44(8): 1351-1359
46. Kermode AR (2011) Plant Storage Products (Carbohydrates, Oils and Proteins). In: John Wiley & Sons L (ed) eLS, 1 Edn. Wiley,
47. Kermode AR, Finch-Savage BE (2002) Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development., Vol 4. CABI Books, Wallingford, pp 149–184
48. Kijak H, Ratajczak E (2020) What do we know about the genetic basis of seed desiccation tolerance and longevity? *International Journal of Molecular Sciences*. 21(10), 3612
49. Koobaz P, Reza Ghaffari M, Heidari M, Mirzaei M, Ghanati F, Amirkhani A, Mortazavi SE, Moradi F, Hajirezaei MR, Salekdeh GH (2020) Proteomic and metabolomic analysis of desiccation tolerance in wheat young seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 146: 349-362
50. Kumar S (2013) Fourier transform-near infrared reflectance spectroscopy calibration development for screening of oil content of intact safflower seeds. *International Food Research Journal* 20: 759-762
51. Leadem C (1996) A guide to the biology and use of forest tree seeds. Province of British Columbia, Ministry of Forests Research Program, Victoria, British Columbia
52. Lefebvre M, Villar M, Boizot N, Delile A, Dimouro B, Lomenech A-M, Teyssier C (2022) Variability in seeds' physicochemical characteristics, germination and seedling growth within and between two French *Populus nigra* L. populations. . *Peer Community Journal* 2(e10)
53. Leprince O, Buitink J (2010) Desiccation tolerance: From genomics to the field. *Plant Science* 179(6): 554-564
54. Leprince O, Hendry GAF, McKersie BD (1993) The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Science Research* 3(4): 231-246
55. Lesnoff M (2021) R package rchemo: Dimension reduction, Regression and Discrimination for Chemometrics. <https://github.com/mlesnoff/rchemo>. CIRAD, UMR SELMET, Montpellier, France.
56. Lestander TA, Geladi P (2003) NIR spectroscopic measurement of moisture content in Scots pine seeds. *The Analyst* 128(4): 389

57. Lestander TA, Geladi P (2005) NIR spectral information used to predict water content of pine seeds from multivariate calibration. *Canadian Journal of Forest Research* 35(5): 1139-1148
58. Lubowicki R, Kotlarz A, Jaskowska I (2005) Effect of cultivar and harvest year on the composition of yellow lupin seeds. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 14(Suppl. 1), 373-376
59. Maity A, Paul D, Lamichaney A, Sarkar A, Babbar N, Mandal N, Dutta S, Maity PP, Chakrabarty SK (2023) Climate Change Impacts on Seed Production and Quality: Current Knowledge, Implications, and Mitigation Strategies. *Seed Science and Technology* 51(1): 65-96
60. Martinez-Munoz M, Ayala-Garay OJ, Aguilar-Rincon VH, Conde-Martinez V, Corona-Torres T (2019) Seed quality and LEA-protein expression in relation to fruit maturation and post-harvest storage of two chilies types. *Horticult J* 88(2): 245-252
61. Matilla AJ (2021) The Orthodox Dry Seeds Are Alive: A Clear Example of Desiccation Tolerance. *Plants* 11(1): 20
62. Matthews S, Noli E, Demir I, Khajeh-Hosseini M, Wagner MH (2012) Evaluation of seed quality: from physiology to international standardization. *Seed Science Research* 22(S1): S69-S73
63. Mauri N, Fernández-Marcos M, Costas C, Desvoyes B, Pichel A, Caro E, Gutierrez C (2016) GEM, a member of the GRAM domain family of proteins, is part of the ABA signaling pathway. *Scientific Reports* 6(1): 22660
64. Mevik B-H, Wehrens R (2015) Introduction to the pls Package. R Foundation for Statistical Computing, 1-23 edn., Vienna, Austria
65. Mishra P, Biancolillo A, Roger JM, Marini F, Rutledge DN (2020) New data preprocessing trends based on ensemble of multiple preprocessing techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 132: 116045
66. Morel A, Trontin J-F, Corbineau F, Lomenech A-M, Beaufour M, Reymond I, Le Metté C, Ader K, Harvengt L, Cadene M, Label P, Teyssier C, Lelu-Walter M-A (2014) Cotyledonary somatic embryos of *Pinus pinaster* Ait. most closely resemble fresh, maturing cotyledonary zygotic embryos: biological, carbohydrate and proteomic analyses. *Planta* 240(5): 1075-1095
67. Oliver MJ, Farrant JM, Hilhorst HWM, Mundree S, Williams B, Bewley JD (2020) Desiccation tolerance: avoiding cellular damage during drying and rehydration. *Annu Rev Plant Biol* 71: 435-460
68. Oliver AE, Leprince O, Wolkers WF, Hinch DK, Heyer AG, Crowe JH (2001) Non-Disaccharide-Based Mechanisms of Protection during Drying. *Cryobiology* 43(2): 151-167
69. Owens JN (2008) The reproductive biology of western larch. Inland Empire Tree Improvement Cooperative, Victoria, B.C.
70. Phartyal SS, Thapliyal RC, Koedam N, Godefroid S (2002) Ex situ conservation of rare and valuable forest tree species through seed-gene bank. *Current Science* 83(11): 1351-1357

71. Rahman A, Cho B-K (2016) Assessment of seed quality using non-destructive measurement techniques: a review. *Seed Science Research* 26(4): 285-305
72. Rajani K, Ranjan R, Ranjan T, Kumar A (2017) GLOBAL APPROACHES FOR IDENTIFICATION OF MARKERS OF SEED QUALITY- A REVIEW. 29-43
73. Rajendra Prasad S (2023) Testing seed for quality. In: Dadlani M, Yadava DK (eds) *Seed Science and Technology*. Springer Nature Singapore, Singapore, pp 299-334
74. Ramos KMO, Matos JMM, Martins RCC, Martins IS (2012) Electrical conductivity testing as applied to the assessment of freshly collected *Kielmeyera coriacea* Mart. seeds. *ISRN Agronomy* 2012: 5
75. Roger J-M, Biancolillo A, Marini F (2020) Sequential preprocessing through ORThogonalization (SPORT) and its application to near infrared spectroscopy. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 199: 103975
76. Sghaier-Hammami B, B.M. Hammami S, Baazaoui N, Gómez-Díaz C, Jorrín-Novo JV (2020) Dissecting the seed maturation and germination processes in the non-orthodox *Quercus ilex* species based on protein signatures as revealed by 2-DE coupled to MALDI-TOF/TOF proteomics strategy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(14):4870.
77. Sipeiece E, Mišina I, Grygier A, Qian Y, Rudzińska M, Kaufmane E, Seglina D, Siger A, Górnaś P (2021) Impact of the harvest year of three cultivars of Japanese quince (*Chaenomeles japonica*) on the oil content and its composition. *Scientia Horticulturae*. 275, 109683
78. Škvareninová J, Mrekaj I (2022) Impact of Climate Change on Norway Spruce Flowering in the Southern Part of the Western Carpathians. *Frontiers in Ecology and Evolution* 10: 865471
79. Szulc J, Gozdecka G, Poćwiardowski W (2020) The application of NIR spectroscopy in moisture determining of vegetable seeds. *Czech Journal of Food Sciences* 38(2): 131-136
80. Tigabu M (2003) Characterization of forest tree seed quality with near infrared spectroscopy and multivariate analysis.
81. Tigabu M, Odén PC, Lindgren D (2005) Identification of seed sources and parents of *Pinus sylvestris* L. using visible–near infrared reflectance spectra and multivariate analysis. *Trees* 19(4): 468-476
82. Tigabu M, Odén PC, Shen TY (2004) Application of near-infrared spectroscopy for the detection of internal insect infestation in *Picea abies* seed lots. *Canadian Journal of Forest Research* 34(1): 76-84
83. Tulukcu E, Yalcin H, Ozturk I, Sagdic O (2012) Changes in the fatty acid compositions and bioactivities of clary sage seeds depending on harvest year. *Industrial Crops and Products*. 39, 69-73.
84. Vertucci CW, Farrant JM (1995) Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: *Seed development and germination*. Marcel Dekker, New York, pp 237–271
85. Vizcaíno JA, Csordas A, del-Toro N, Dianas JA, Griss J, Lavidas I, Mayer G, Perez-Riverol Y, Reisinger F, Ternent T, Xu Q-W, Wang R, Hermjakob H (2016) 2016

- update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Research* 44(D1): D447-D456
86. Wahid N, Bounoua L (2013) The relationship between seed weight, germination and biochemical reserves of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) in Morocco. *New Forests* 44(3): 385-397
87. Wang W-Q, Liu S-J, Song S-Q, Møller IM (2015) Proteomics of seed development, desiccation tolerance, germination and vigor. *Plant Physiology and Biochemistry* 86(0): 1-15
88. Wang W-Q, Ye J-Q, Rogowska-Wrzesinska A, Wojdyla KI, Jensen ON, Møller IM, Song S-Q (2014) Proteomic comparison between maturation drying and prematurely imposed drying of *Zea mays* seeds reveals a potential role of maturation drying in preparing proteins for seed germination, seedling vigor, and pathogen resistance. *Journal of Proteome Research* 13(2): 606-626
89. Xu R, Hu W, Zhou Y, Zhang X, Xu S, Guo Q, Qi P, Chen L, Yang X, Zhang F, Liu L, Qiu L, Wang J (2020) Use of near-infrared spectroscopy for the rapid evaluation of soybean [*Glycine max* (L.) Merri.] water soluble protein content. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 224: 117400
90. Zhang H, Wang W-Q, Liu S-J, Møller IM, Song S-Q (2015) Proteome analysis of poplar seed vigor. *PLOS ONE* 10(7): e0132509
91. Zhang Y, Zhang L, Wang J, Tang X, Wu H, Wang M, Zeng W, Mo Q, Li Y, Li J, Huang Y, Xu B, Zhang M (2018) Rapid Determination of the Oil and Moisture Contents in *Camellia gauchowensis* Chang and *Camellia semiserrata* Chi Seeds Kernels by Near-infrared Reflectance Spectroscopy. *Molecules* 23(9): 2332
92. Zhong Y, Zhang Z, Chen J, Niu J, Shi Y, Wang Y, Chen T, Sun Z, Chen J, Luan M (2021) Physicochemical properties, content, composition and partial least squares models of *A. trifoliata* seeds oil. *Food Chemistry: X* 12: 100131



Table V.S2. Characteristics of differentially expressed proteins in *Larix* seeds collected at the 6 different harvests (1, 2, 3, 1S, 2S and 3S). The protein accession numbers and assignments were retrieved from *Larix siberica* assemblage data base. Some proteins only have GOs related to Molecular Function or Cellular Component, then no GO keywords are not be assigned. <sup>a</sup>: GOSLIM\_biological process\_keywords; <sup>b</sup>: ratios of protein abundance between the 2 considered harvests.

Accession	Uniprot	Protein assignment	kBP <sup>a</sup>	1 / 2 <sup>b</sup>	1 / 3 <sup>b</sup>	1/2 <sup>b</sup>	1S / 1 <sup>b</sup>	2S / 2 <sup>b</sup>	3S / 3 <sup>b</sup>	1S / 2S <sup>b</sup>	1S / 3S <sup>b</sup>	2S / 3S <sup>b</sup>
LS_100767-0.0-mRNA-1	O23016	Potassium channel beta subunit	transport			0.0041						
LS_101068-0.1-mRNA-1	P53492	Actin-7	cytoskeleton organization						0.0184		0.0435	
LS_10138-0.3-mRNA-1	P0DKK7	60S ribosomal protein L7a	translation		0.0004							
LS_10185562-0.0-mRNA-1	Q91060	Tubulin alpha chain	cytoskeleton organization							0.0231		0.0238
LS_103512-0.1-mRNA-1	P13853	17.5 kd heat shock family protein	response to stress;protein folding	6.00E-17	5.00E-17		6.00E-09					
LS_103854-0.0-mRNA-1	Q9LFN6	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 56	mRNA processing		0.0332							
LS_104355-0.3-mRNA-1	P46248	Aspartate aminotransferase, chloroplatic	generation of precursor metabolites and energy		7.00E-05	4.00E-05						
LS_104753-0.1-mRNA-1	P15170	Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3A	translation								0.0206	
LS_105964-0.1-mRNA-1	Q4I8E9	Putative choline transporter-like protein 3-like	transport			0.0266						
LS_106091-0.3-mRNA-1	Q9FHW7	SKP1-like protein 1B	embryo development		0.0093							
LS_10808-0.3-mRNA-1	Q336R3	E3 ubiquitin-protein ligase BRE1-like 2	chromosome organization			0.0007		0.0048				

LS_109729-0.0-mRNA-1	Q08080	Chaperone protein DnaK	protein folding				0.0212		
LS_110260-0.3-mRNA-1	Q94K05	T-complex protein 1 subunit theta	protein folding						0.0025
LS_110264-0.2-mRNA-1	Q6ZLK0	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase	protein modification process				0.0051		0.0003 0.0111
LS_11214-0.2-mRNA-1	Q40082	Xylose isomerase	carbohydrate metabolic process	3.00E-10	0.0134			1.00E-12	0.0025
LS_112385-0.1-mRNA-1	O82143	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4	protein catabolic process				0.0066		
LS_11383-0.1-mRNA-1	Q9ZQ97	UDP-glycosyltransferase 73C4						0.018	
LS_115494-0.1-mRNA-1	O24415	60S acidic ribosomal protein P2B	translation				2.00E-05		
LS_115642-0.1-mRNA-1	P30222	Small heat shock protein, chloroplatic	response to stress		3.00E-06				
LS_1220-0.1-mRNA-1	P56333	Eukaryotic translation initiation factor 5A	translation	2.00E-07					0.0498
LS_127105-0.1-mRNA-1	P49292	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	carbohydrate metabolic process	2.00E-11				1.00E-10	
LS_13026-0.1-mRNA-1	Q9F234	Putative uncharacterized protein Sb02g010050	carbohydrate metabolic process	0.0059					
LS_13077-0.1-mRNA-1	O26373	UPF0098 protein MTH_273		3.00E-05			5.00E-07		
LS_1318-0.2-mRNA-1	Q39085	Delta(24)-sterol reductase	anatomical structure development			0.0295			0.0212
LS_134217-0.1-mRNA-1	Q9RV96	Dipeptidyl peptidase family member 6	small molecule metabolic process				0.0002		

LS_13870-0.4-mRNA-1	Q9LLC1	Biotin carboxyl carrier protein subunit	lipid metabolic process				
LS_1454-0.5-mRNA-1	Q9LNW0	17.8 kDa class I heat shock protein	response to abiotic stimulus			0.0009	
LS_14931-0.2-mRNA-1	Q07764	HVA22-like protein	response to abiotic stimulus				0.0176
LS_16848-0.1-mRNA-1	Q9SS48	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase SDP6, mitochondrial	carbohydrate metabolic process	5.00E-05		0.0113	
LS_1695-0.1-mRNA-1	Q9SCV3	Beta-galactosidase	carbohydrate metabolic process			3.00E-08	
LS_17320-0.1-mRNA-1	Q8LC68	NAP1-related protein 2	chromosome organization	0.0321			
LS_18084-0.2-mRNA-1	Q9FNX5	Phragmoplastin DRP1E	cell wall organization or biogenesis			0.0012	0.0406
LS_182-0.1-mRNA-1	Q0JAA0	Predicted protein				0.0326	
LS_2007320-0.0-mRNA-1	Q43207	70 kDa peptidyl-prolyl isomerase	response to stress;protein folding			0.0233	0.0002
LS_20442-0.3-mRNA-1	Q9LDD8	3-methylcrotonyl-CoA carboxylase non-biotin containing subunit	amino acid catabolic process	0.0068	0.003		
LS_2159456-0.1-mRNA-1	Q8L7C9	Glutathione S-transferase U20	post-embryonic development				0.0005
LS_22029-0.2-mRNA-1	O24412	26S proteasome regulatory subunit rpn-8	protein catabolic process			0.0207	
LS_22738-0.2-mRNA-1	Q9SKR2	Synaptotagmin-1	response to abiotic stimulus			0.0241	

LS_2278205-0.0-mRNA-1	Q5ZHW4	Ras-related protein Rab-5A	transport							0.0233
LS_23190-0.5-mRNA-1	P38661	Protein disulfide isomerase-like 2-2	protein modification process							7.00E-05 0.0291
LS_2362-0.5-mRNA-1	Q8LKS5	Long chain acyl-CoA synthetase 7, peroxisomal	lipid metabolic process							0.0011
LS_24169-0.1-mRNA-1	P58223	K Homology domain-containing protein	regulation of gene expression							0.0045
LS_2424021-0.0-mRNA-1	Q9Y7R8	Malate dehydrogenase	generation of precursor metabolites and energy	0.0498						0.0153 0.0003
LS_24246-0.3-mRNA-1	Q8K3P4	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 27C, putative	translation	4.00E-13	1.00E-10					0.0065 7.00E-13 1.00E-14 0.0445
LS_2439420-0.1-mRNA-1	Q9FIK7	Acetyl-CoA acetyltransferase	lipid catabolic process							0.0144 0.0163
LS_2480840-0.0-mRNA-1	O42700	Transaldolase	small molecule metabolic process							0.0384
LS_25394-0.3-mRNA-1	O22711	Peroxioredoxin	cellular oxidant detoxification							0.0049 0.0461
LS_25585-0.4-mRNA-1	Q5KTS5	Glucose and ribitol dehydrogenase	seed maturation							0.008
LS_2596659-0.1-mRNA-1	Q5KTS5	Glucose and ribitol dehydrogenase	seed maturation							0.0121
LS_25992-0.6-mRNA-1	P52903	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	small molecule metabolic process							0.001
LS_27151-0.2-mRNA-1	Q944K2	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase	protein modification process							0.0349

Chapitre V – Caractérisation des graines de mélèze au cours de leur maturation, avant et après séchage, en vue d'une récolte précoce des graines

LS_27406-0.2-mRNA-1	P27880	17.5 kd heat shock family protein	response to stress;protein folding					0.0024
LS_2833287-0.1-mRNA-1	Q9LYV6	GEM-like protein 5	seed maturation	0.0344	0.0158			
LS_28782-0.0-mRNA-1	Q9LIR4	Dihydroxy-acid dehydratase	protein metabolic process	0.0003	0.0016	0.0002		
LS_2982375-0.1-mRNA-1	Q03968	Late embryogenesis abundant protein, group 3	response to stress					0.0441
LS_29991-0.3-mRNA-1	B0BNC9	Quinone oxidoreductase-like protein 2	nucleobase-containing compound metabolic process					0.0074
LS_30419-0.0-mRNA-1	Q76MV0	Histone H3	chromosome organization					0.0007
LS_3042662-0.1-mRNA-1	Q5NTA4	Class IV chitinase		0.0014				
LS_30848-0.1-mRNA-1	Q9SR15	Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic	nucleobase-containing compound metabolic process				0.0078	0.0284
LS_31354-0.3-mRNA-1	O49816	Late embryogenesis abundant protein 1	seed maturation			5.00E-17		4.00E-12
LS_3235606-0.1-mRNA-1	O24301	Sucrose synthase	carbohydrate metabolic process		0.0393			
LS_3374029-0.1-mRNA-1	Q9M2C0	Nodulin-21	cellular homeostasis		0.002			
LS_33968-0.1-mRNA-1	Q9C5Z1	Eukaryotic translation initiation factor 3	translation		0.0056		0.0002	
LS_3402-0.2-mRNA-1	P23974	Putative 2-succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadiene-1-carboxylate synthase	small molecule metabolic process				0.0005	0.008

LS_34072-0.0-mRNA-1	Q38931	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	protein folding					2.00E-06	
LS_34121-0.2-mRNA-1	P08926	60 kDa chaperonin	protein folding	0.0496				0.0065	
LS_34249-0.0-mRNA-1	Q7XBW0	Inositol-tetrakisphosphate 1-kinase	seed maturation						0.0047
LS_3433726-0.0-mRNA-1	Q38806	22.0 kDa heat shock protein	response to abiotic stress			0.0442			
LS_3440878-0.1-mRNA-1	P02519	Heat shock protein HSP17.2IA, small	response to stress;protein folding					0.032	0.0281 0.0311
LS_3442-0.5-mRNA-1	Q6YZX6	Aconitate hydratase	generation of precursor metabolites and energy			9.00E-06			
LS_3462291-0.0-mRNA-1	P24669	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	cellular oxidant detoxification	0.0252	0.0032			0.0018	2.00E-05
LS_3481496-0.1-mRNA-1	Q07469	Bark storage protein A	nucleobase-containing compound metabolic process						0.0428
LS_3498905-0.0-mRNA-1	Q84WV8	Nicotinate phosphoribosyltransferase	small molecule metabolic process					0.0336	
LS_3522-0.1-mRNA-1	P09189	Heat shock protein 70	response to stress;protein folding					0.0058	0.0074 0.0416
LS_35839-0.1-mRNA-1	M1T9X3	Phenylcoumaran benzylic ether reductase IRL1	secondary metabolic process					0.0333	
LS_36182-0.4-mRNA-1	P41918	GTP-binding nuclear protein				0.0193			
LS_3623886-0.1-mRNA-1	Q9HZP7	Electron transfer flavoprotein subunit beta	generation of precursor metabolites and energy	0.0011	0.002			0.0039	0.0002

LS_3627412-0.0-mRNA-1	Q940M2	Alanine--glyoxylate aminotransferase 2, mitochondrial	photorespiration	0.0476		
LS_3696992-0.1-mRNA-1	Q40864	Late embryogenesis abundant protein B19.1A	response to abiotic stress	0.006		
LS_3707-0.2-mRNA-1	P27161	Calmodulin	response to abiotic stimulus	0.035		
LS_3733844-0.1-mRNA-1	COHJB3	Alpha-mannosidase	carbohydrate metabolic process		0.0163	0.0001
LS_3740601-0.1-mRNA-1	P28475	NADP-dependent D-sorbitol-6-phosphate dehydrogenase	small molecule metabolic process	0.0017	4.00E-11	
LS_3741362-0.0-mRNA-1	O64815	Acyl-CoA N-acyltransferases (NAT) superfamily protein	protein modification process		0.0099	0.0123
LS_3745538-0.3-mRNA-1	Q9LF37	Chaperone protein ClpB	response to stress;protein folding	0.0014	0.0233	
LS_3747920-0.2-mRNA-1	Q9C7F5	Nuclear transport factor 2	transport		0.0149	0.0306
LS_3750637-0.0-mRNA-1	Q9LT75	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN	lipid metabolic process	0.0399		
LS_3767713-0.0-mRNA-1	Q9M5Z9	40S ribosomal protein	translation			1.00E-06
LS_3770456-0.0-mRNA-1	Q9AT63	Probable pyridoxal 5'-phosphate synthase subunit PDX1	response to stress		0.0108	

LS_3776996-0.1-mRNA-1	Q9FPT1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 12	anatomical structure development	0.0012	0.044			
LS_3777308-0.1-mRNA-1	Q9AUV6	UDP-glucose 6-dehydrogenase	nucleobase-containing compound metabolic process			0.0006		
LS_3782063-0.1-mRNA-1	O22431	60S ribosomal protein L10	protein metabolic process		0.0015			
LS_3830646-0.1-mRNA-1	O49290	Carboxyvinyl-carboxyphosphonate phosphorylmutase	small molecule metabolic process		0.0035			
LS_3833067-0.1-mRNA-1	Q9R1M5	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 5	embryo development	0.0465				
LS_3844133-0.1-mRNA-1	O49460	Prohibitin-2	protein stabilisation			0.0342		
LS_3869927-0.1-mRNA-1	P32045	Pathogenesis-related protein 4						0.0317
LS_3880805-0.0-mRNA-1	Q9SKY8	Heat shock protein 70	response to stress;protein folding		0.0317	0.0025	0.0008	
LS_3886036-0.1-mRNA-1	Q9MAH3	Dihydroxyacetone kinase	response to stress		0.0025			
LS_3893751-0.1-mRNA-1	Q8GYH6	Reticulon-like protein				9.00E-05		
LS_3900279-0.1-mRNA-1	A9NQ1	Antifungal protein ginkbilobin-like protein	killing of cells of another organism			0.0479	0.0238	0.0036
LS_3929-1.3-mRNA-1	Q0AI05	Lipoyl synthase	protein modification process				7.00E-07	
LS_3936222-0.1-mRNA-1	O24301	Sucrose synthase	carbohydrate metabolic process	0.0076				



LS_3974426-0.1-mRNA-1	Q8H995	Thaumatococcus-like protein	response to biotic stimulus						0.0027
LS_3989612-0.1-mRNA-1	P46547	Alpha/beta hydrolase	protein catabolic process						
LS_3996978-0.1-mRNA-1	Q9FGT8	Temperature-induced lipocalin	response to abiotic stimulus	4.00E-06		2.00E-07			0.0074
LS_3999-0.1-mRNA-1	Q8VY57	ADP-ribosylation factor-like protein 8B	chromosome organization					0.0012	0.0002
LS_4001939-0.0-mRNA-1	Q8H6A5	Translationally-controlled tumor protein homolog	cytoskeleton organization				0.003	0.0479	
LS_4013391-0.1-mRNA-1	P49098	Cytochrome b5	cell growth	0.0009	0.0265				
LS_40199-0.1-mRNA-1	Q10M12	Ricin B-like lectin R40C1	defense response to bacterium					1.00E-05	
LS_4022645-0.1-mRNA-1	Q9M084	Aspartyl-tRNA synthetase	translation	0.0034	1.00E-12	0.0223		9.00E-06	0.014
LS_4025705-0.3-mRNA-1	Q6NKZ8	Cytochrome P450 714A2	cellular homeostasis			0.0209			
LS_4028516-0.2-mRNA-1	Q9T0A0	Long-Chain Acyl-CoA Synthetase	lipid metabolic process	0.0008	0.013	0.0289			0.0079 0.0489
LS_4030003-0.1-mRNA-1	Q304B9	Neutral ceramidase	lipid catabolic process					0.005	0.0002 0.0002
LS_4030808-0.1-mRNA-1	Q9FLF0	40S ribosomal protein	translation	0.007	0.0012	0.02			
LS_4030905-0.1-mRNA-1	P23799	Putative adenylate cyclase regulatory protein	regulation of molecular function					0.0198	
LS_4037911-0.2-mRNA-1	P31542	ATPase AAA-2 domain protein	protein catabolic process					0.0173	

LS_4040867-0.1-mRNA-1	Q0E3C8	Chaperone protein ClpB	response to stress;protein maturation			2.00E-07			0.0367
LS_4056809-0.1-mRNA-1	Q9LHE5	Mitochondrial import receptor subunit TOM40-1	protein targeting	0.0038	0.0444		0.0045	0.0184	
LS_4059499-0.1-mRNA-1	Q9SK27	Early nodulin-like protein 1	generation of precursor metabolites and energy						0.0173
LS_4068568-0.0-mRNA-1	O74407	Aspartate--tRNA ligase	rna metabolic process			0.0001			
LS_4084094-0.1-mRNA-1	Q6NL24	Enoyl-CoA hydratase	lipid catabolic process		0.0011		5.00E-09		
LS_4094010-0.1-mRNA-1	P24314	Proliferating cell nuclear antigen	dna metabolic process					0.0006	
LS_4106588-0.1-mRNA-1	Q9ZPN9	Beta-tubulin	cytoskeleton organization			0.0008			
LS_4107358-0.1-mRNA-1	Q93ZN2	Aldo/keto reductase	cellular oxidant detoxification						0.0004
LS_4111422-0.2-mRNA-1	O64982	26S protease regulatory subunit 7	response to stress;protein catabolic process					0.0023	
LS_4155040-0.1-mRNA-1	P52712	Serine carboxypeptidase-like	protein catabolic process		0.0031				
LS_4160195-0.0-mRNA-1	P29696	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial	generation of precursor metabolites and energy			0.0013			
LS_4161385-0.1-mRNA-1	P42056	Porin/voltage-dependent anion-selective channel protein	transport						0.0012

LS_4180642-0.1-mRNA-1	Q54JE4	2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial	small molecule metabolic process	0.0344	0.0048	4.00E-06
LS_4181912-0.1-mRNA-1	Q9XHM1	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 8	translation			
LS_4186308-0.1-mRNA-1	P51063	Phosphoenolpyruvate carboxylase	carbohydrate metabolic process		0.0285	0.0031
LS_4201616-0.0-mRNA-1	Q9FM19	Hypersensitive-induced response protein		0.0276	0.0108	
LS_4212989-0.1-mRNA-1	Q9ASR1	Elongation factor 2		0.0252	0.0012	
LS_42146-0.1-mRNA-1	Q9LK23	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase 5	small molecule metabolic process	0.0293		0.0006
LS_42210-0.1-mRNA-1	Q9SCU0	Short-chain dehydrogenase reductase 2a	secondary metabolic process		0.0004	
LS_42252-0.1-mRNA-1	P27880	17.5 kd heat shock family protein	response to stress;protein folding		0.0028	
LS_4256263-0.2-mRNA-1	P25698	Elongation factor 1-alpha	protein metabolic process			0.0483
LS_4262797-0.1-mRNA-1	O49296	Endoglucanase 4	cell wall organization			
LS_4268526-0.1-mRNA-1	P33624	Tubulin alpha-1 chain	cytoskeleton organization			2.00E-09
LS_4288503-0.1-mRNA-1	Q94B38	Glucose-6-phosphate/phosphate translocator 1, chloroplastic	carbohydrate catabolic process			0.0498
LS_4289985-0.0-mRNA-1	Q6K641	Eukaryotic translation initiation factor 4G	translation			0.0032

Chapitre V – Caractérisation des graines de mélèze au cours de leur maturation, avant et après séchage, en vue d'une récolte précoce des graines

LS_4308986-0.1-mRNA-1	O81221	Actin	cytoskeleton organization	0.0005	0.0014	0.0196
LS_4313113-0.1-mRNA-1	G7ID19	RNA-binding protein 2	rna metabolic process		2.00E-05	0.0357
LS_4314704-0.0-mRNA-1	Q1RMU4	Erlin-2	lipid catabolic process		0.0112	0.0173
LS_4343768-0.0-mRNA-1	P34924	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	carbohydrate catabolic process		0.0022	
LS_4370360-0.1-mRNA-1	Q9FSY7	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	protein modification process	0.0004		2.00E-05
LS_4376-0.5-mRNA-1	Q9CAP8	Long chain acyl-CoA synthetase 9, chloroplastic	lipid metabolic process			0.0199
LS_4397356-0.1-mRNA-1	Q9C6Z3	Pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit	small molecule metabolic process	0.0042		
LS_4438277-0.1-mRNA-1	Q9M9Q6	Serine carboxypeptidase-like 50	protein catabolic process		0.0015	
LS_4448877-0.1-mRNA-1	Q9SKP0	Late embryogenesis abundant protein ECP63	seed maturation		0.0092	
LS_4468363-0.1-mRNA-1	Q9SCU0	Short-chain dehydrogenase reductase 2a	secondary metabolic process		1.00E-04	
LS_4469884-0.1-mRNA-1	Q9FIK7	Acetyl-CoA acetyltransferase	lipid catabolic process			0.0092
LS_4471468-0.1-mRNA-1	Q8VZH2	Puromycin-sensitive aminopeptidase	protein catabolic process			0.0342
LS_4476293-0.1-mRNA-1	Q05737	GTP-binding protein ypt1	transport	0.0075		

LS_4488933-0.0-mRNA-1	Q9SYB5	Probable dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 3B	protein modification process			0.0085		0.0063
LS_45147-0.1-mRNA-1	P52855	60S acidic ribosomal protein P1	translation	2.00E-05	5.00E-13			0.0428
LS_4532457-0.1-mRNA-1	Q8L611	Protein transport protein SEC31	protein targeting				0.033	
LS_4553274-0.1-mRNA-1	Q9LIS2	Glycine-rich RNA-binding protein 4, mitochondrial	response to stress;water deprivation					0.0084 0.0263
LS_45628-0.2-mRNA-1	Q852S5	Nucleoside diphosphate kinase	nucleobase-containing compound metabolic process					2.00E-09
LS_4569086-0.2-mRNA-1	O00410	Importin subunit beta-3	transport					1.00E-06
LS_4628945-0.1-mRNA-1	Q9ZRW8	Glutathione S-transferase U19	response to abiotic stimulus					
LS_4638286-0.1-mRNA-1	Q9SNC6	U-box domain-containing protein 13	response to biotic stimulus				0.0084	
LS_4642987-0.0-mRNA-1	Q9SXP2	Formate dehydrogenase	response to stress					0.0064
LS_4663271-0.0-mRNA-1	O23617	Trehalose-6-phosphate synthase	carbohydrate metabolic process	0.0071	0.0013			
LS_4670367-0.0-mRNA-1	Q2V6J9	Glycosyltransferase						
LS_4674396-0.1-mRNA-1	Q9LT08	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 14	protein catabolic process					0.0144

LS_4681270-0.1-mRNA-1	Q39002	ADP,ATP carrier protein 1	transport		0.013
LS_4682042-0.1-mRNA-1	Q93VD3	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 23	response to stress	0.0277	
LS_4695153-0.0-mRNA-1	Q9C3Y4	GTP-binding protein rhoA	anatomical structure development		0.0019
LS_4712866-0.2-mRNA-1	O81221	Actin-7	cytoskeleton organization		
LS_4716269-0.0-mRNA-1	Q7F911	ATPase AAA-2 domain protein	protein catabolic process		
LS_4724924-0.0-mRNA-1	Q9SLF3	Translocase of chloroplast 132, chloroplastic	protein targeting		0.0173
LS_4725612-0.2-mRNA-1	Q8N5L8	Ribonuclease P protein subunit p25-like protein	rna metabolic process		0.0178
LS_4730653-0.0-mRNA-1	Q9FJD4	Importin subunit beta-1	response to stress		0.0211
LS_4749231-0.1-mRNA-1	Q10RI7	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 38	translation	0.0223	
LS_4792315-0.2-mRNA-1	Q9LD55	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	translation	0.0448	
LS_4810097-0.0-mRNA-1	P27880	18.2 kDa class I heat shock protein	response to stress	0.0167	1.00E-05
LS_4813209-0.1-mRNA-1	Q9FLG1	Beta-xylosidase/alpha-L-arabinofuranosidase 1	carbohydrate metabolic process	9.00E-05	0.0039
LS_4833535-0.0-mRNA-1	P42056	Porin/voltage-dependent anion-selective channel protein	transport		0.0046

Chapitre V – Caractérisation des graines de mélèze au cours de leur maturation, avant et après séchage, en vue d'une récolte précoce des graines

LS_4839234-0.1-mRNA-1	P09887	Small heat shock protein, chloroplastic	response to stress							0.0345
LS_4852289-0.0-mRNA-1	P08927	60 kDa chaperonin	protein folding	0.0296		0.0062		0.0278		
LS_4880610-0.1-mRNA-1	Q9T074	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	carbohydrate metabolic process							0.0481
LS_4889346-0.1-mRNA-1	Q94JX5	LIM domain-containing protein WLIM1	cytoskeleton organization	0.0002		7.00E-05				
LS_4891236-0.0-mRNA-1	O23372	Putative histone-lysine N-methyltransferase ATXR3	chromosome organization							0.0007
LS_4892-0.1-mRNA-1	Q8VYL3	Aspartic proteinase	protein catabolic process			0.0044				0.0024
LS_4899426-0.1-mRNA-1	Q8GWT7	Late embryogenesis abundant protein 47	cellular homeostasis							0.0058
LS_49063-0.1-mRNA-1	O65084	Proteasome subunit beta type	protein catabolic process							1.00E-08
LS_4956964-0.2-mRNA-1	Q54XX1	Signal recognition particle receptor	protein targeting			3.00E-09	7.00E-17	7.00E-17	9.00E-06	3.00E-06
LS_5030652-0.2-mRNA-1	Q94CD1	BAHD family acyltransferase, clade V	cell wall organization or biogenesis					6.00E-10		
LS_5079399-0.0-mRNA-1	O74196	Ubiquitin-conjugating enzyme	protein modification process							4.00E-07
LS_5115612-0.2-mRNA-1	A7SDW5	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	mRNA processing	0.0255	0.0281				0.0002	0.0014
LS_51254-0.1-mRNA-1	P08823	RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha	protein folding						0.0448	8.00E-06
										4.00E-05

LS_5129713-0.0-mRNA-1	Q8DJF2	Phosphoriboisomerase A	nucleobase-containing compound metabolic process						0.0302	0.0023
LS_5135291-0.1-mRNA-1	Q9XFK7	Flowering locus T	post-embryonic development							0.0494
LS_5138785-0.0-mRNA-1	Q9LDZ0	Chaperone protein DnaK	protein folding							0.0354
LS_5160590-0.1-mRNA-1	O04331	Prohibitin-3, mitochondrial	response to stress		0.0365	0.0405				
LS_5186552-0.1-mRNA-1	Q9FX21	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase	protein modification process						0.0207	0.0087
LS_5205236-0.1-mRNA-1	P80030	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH], chloroplastic	lipid metabolic process			0.0001				
LS_5212941-0.1-mRNA-1	A5UTB6	Phosphoglycerate kinase	carbohydrate catabolic process	0.0025	0.0009	2.00E-10	0.0243	1.00E-05		
LS_5326-0.5-mRNA-1	Q9SVM8	Glycine-rich RNA-binding protein	response to stress	0.0207						
LS_53916-0.1-mRNA-1	Q9SK82	Glycosyltransferase	small molecule metabolic process	2.00E-13	1.00E-14		5.00E-09	0.0137		
LS_5668-0.1-mRNA-1	Q9LY87	E3 ubiquitin-protein ligase RGLG2	response to biotic stimulus						0.0003	1.00E-10 4.00E-08
LS_60336-0.1-mRNA-1	Q9SGA6	40S ribosomal protein	translation						0.0011	0.0442
LS_60865-0.0-mRNA-1	Q07469	Bark storage protein A	nucleobase-containing compound metabolic process							0.0226



Chapitre V – Caractérisation des graines de mélèze au cours de leur maturation, avant et après séchage, en vue d'une récolte précoce des graines

LS_6104-0.2- mRNA-1	P46209	Protein usf		5.00E- 06				
LS_62817- 0.1-mRNA-1	Q9ZVX8	Probable aquaporin	PIP2 transport		0.0159			
LS_653-0.2- mRNA-1	Q0DJ99	Coatomer subunit delta-1	protein targeting			1.00E- 05		0.0002
LS_6596-0.4- mRNA-1	Q89BK7	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	carbohydrate metabolic process			0.0401		
LS_66474- 0.1-mRNA-1	Q8L7N0	T-complex protein 1 subunit zeta	protein folding	0.0185	3.00E- 07			
LS_6817-0.1- mRNA-1	P37841	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	generation of precursor metabolites and energy			0.0089		
LS_68757- 0.1-mRNA-1	Q9M1E7	Tetraspanin-3	anatomical structure development		0.0212		8.00E- 06	8.00E- 09
LS_6878-0.3- mRNA-1	P11890	Heat shock protein, small	response to stress			1.00E- 05		
LS_68967- 0.3-mRNA-1	Q9FY64	40S ribosomal protein	translation	0.0092				
LS_6943-0.1- mRNA-1	O22317	Glucan endo-1,3-beta- glucosidase	seed maturation				4.00E- 06	
LS_70294- 0.1-mRNA-1	P58223	RNA-binding KH domain protein	regulation of gene expression			0.0323		
LS_7081342- 0.0-mRNA-1	P49637	60S ribosomal protein L27a	translation			0.0235	0.0427	0.0007
LS_74082- 0.0-mRNA-1	Q9LFR7	Probable carboxylesterase 17			0.0105			

LS_80788-0.2-mRNA-1	B7K6D3	Ribose-5-phosphate isomerase A	nucleobase-containing compound metabolic process						0.0086
LS_80929-0.1-mRNA-1	Q9S7V4	HVA22-like protein	response to abiotic stimulus		0.0002				
LS_8397-0.0-mRNA-1	Q9FYB5	Chaperone protein dnaJ 11, chloroplastic	protein targeting				0.0362		0.0036
LS_8480-0.1-mRNA-1	Q9WXI7	PTS system glucose-specific EIIA component	transport	0.0207	0.0045				
LS_8498-0.3-mRNA-1	Q9S7Y7	Alpha-xylosidase 1	cell wall organization or biogenesis				0.0037		
LS_96501-0.0-mRNA-1	COLGT6	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase EFR	response to biotic stimulus	6.00E-08	3.00E-13	0.0468	0.0012		0.0042
LS_9685-0.2-mRNA-1	Q9LYK9	40S ribosomal protein	translation					0.0315	
LS_9690-0.1-mRNA-1	Q9S7L9	Cytochrome c oxidase subunit 6b-1	generation of precursor metabolites and energy				0.0018		0.0035
LS_98690-0.1-mRNA-1	Q43497	Monodehydroascorbate reductase	cellular oxidant detoxification	0.0406					
LS_98822-0.1-mRNA-1	O65049	Thioredoxin H-type	cellular oxidant detoxification					0.0167	
LS_99562-0.2-mRNA-1	P13853	17.6 kDa class I heat shock protein 3	response to stress;protein folding						0.0131

## Conclusions du chapitre 4

Dans de ce chapitre, nous avons caractérisé les graines de mélèze au cours de leur maturation, avant et après séchage post-récolte, au regard de leur composition biochimique et de leur protéome. Les résultats obtenus ont montré que les graines en cours de maturation présentaient (1) une réduction de leur teneur en eau, (2) la synthèse de RFO et (3) l'amplification des protéines impliquées dans le métabolisme primaire, la production d'énergie et la mise en place de la dormance. En condition où les graines ont été soumise à un séchage, les résultats nous indiquent que le métabolisme des graines restait toujours actif et que la maturation se poursuivait.

Nous avons aussi étudié l'impact général du séchage des graines, et avons mis en évidence que (1) le séchage des graines leur permettait, malgré une récolte précoce, d'atteindre une teneur en eau identique aux graines récoltées à la date de récolte commerciale, (2) le séchage induisait des modifications biochimiques en faveur de l'acquisition de la tolérance à la déshydratation (synthèse de RFO, LEA, HSP70, superoxyde dismutase) et (3) le séchage n'a pas permis d'atténuer les différences observées au regard de la composition des réserves entre les graines récoltées de manière précoce et les graines récoltées à la date de récolte commerciale.

Ensuite, nous avons réussi à définir les variables biochimiques impactant la qualité des graines. Ces variables correspondent notamment à des sucres solubles (sucres totaux, galactose, myo-inositol, sucrose). Ces derniers influencent particulièrement la croissance des plants.

Enfin, nous nous sommes attachées à définir si une récolte précoce pouvait être réalisée sans conséquence sur la qualité des graines. Nous avons démontré que malgré une composition biochimique différente entre les graines précocement récoltées et les graines de référence (graines récoltées à la date de récolte commerciale actuelle), une récolte avancée de 3 semaines pouvait être envisagée sans conséquence ni sur la germination, ni sur la croissance des plants.

Pour finir, nous avons également proposé des modèles de prédiction par spectrométrie infrarouge permettant la caractérisation des graines de mélèze. Parmi les modèles permettant la prédiction quantitative de la composition biochimiques des graines, 3 modèles en particulier ont démontré une performance élevée de prédiction pour : la teneur en eau, l'activité de l'eau et le glucose. Par ailleurs, nous avons aussi proposé un modèle de prédiction du stade de maturité des graines. Ce modèle a montré une capacité de prédiction élevée avec une probabilité d'erreur faible.

L'étude menée dans ce chapitre a fourni de nouvelles connaissances au regard de la maturation des graines de conifères qui est actuellement encore peu documentée. De plus, elle fournit pour la première fois la preuve de la faisabilité d'une récolte précoce basée sur des paramètres biochimiques précis. Par ailleurs, le développement des modèles de prédiction par spectrométrie infrarouge offre une perspective intéressante aux professionnels ayant le besoin d'outils de caractérisation précise des graines forestières.

## Références

- Aguirre M, Kiegle E, Leo G, Ezquer I** (2018) Carbohydrate reserves and seed development: an overview. *Plant Repro.* 31(3), 263-290.
- Alan Ö, Eser B** (2008) The effect of fruit maturity and post-harvest ripening on seed quality in hot and conic pepper cultivars. *Seed Sci. Technol.* 36(2), 467-474.
- Alfonso O B, Ariza Mateos D, Palacios Rodríguez G, Ginhas M A, Ruiz Gómez F J** (2020) Seed protein profile of *Pinus greggii* and *Pinus patula* through functional genomics analysis. *Bosque (Valdivia)*, 41(3), 333-344.
- Angelovici R, Galili G, Fernie A R, Fait A** (2010) Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends Plant Sci.* 15(4): 211-218.
- Bailly C, Audigier C, Ladonne F, Wagner M H, Coste F, Corbineau F, Côme D** (2001) Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. *J. Exp. Bot.* 52(357), 701-708.
- Baud S, Dubreucq B, Miquel M, Rochat C, Lepiniec L** (2008) Storage reserve accumulation in *Arabidopsis*: metabolic and developmental control of seed filling. *Arabidopsis Book.* 6, e0113.
- Baye T M, Pearson T C, Settles A M** (2006) Development of a calibration to predict maize seed composition using single kernel near infrared spectroscopy. *J. Cereal Sci.* 43(2), 236-243.
- Bernal-Lugo I, Leopold A C** (1995) Seed stability during storage: Raffinose content and seed glassy state. *Seed Sci. Res.* 5(2), 75-80.
- Bewley J D, Bradford K J, Hilhorst H W M, Nonogaki H** (2013) *Seeds: physiology of development, germination and dormancy*, 3rd ed Edn. Springer, New York, NY, p 392.
- Black M, Corbineau F, Gee H, Côme D** (1999) Water content, raffinose, and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos. *Plant Physiol.* 120(2), 463-472.
- Bradford K J, Dahal P, Van Asbrouk J, Kunusoth K, Bello P, Thompson J, Wu F** (2018) The dry chain: reducing postharvest losses and improving food safety in humid climates. *Trends Food Sci. Technol.* 71, 84–93.
- Buitink J, Leprince O** (2008) Intracellular glasses and seed survival in the dry state. *C. R. Biol.* 331(10), 788-795.
- Casimiro-Soriguer C S, Muñoz-Mérida A, Pérez-Pulido A J** (2017) Sma3s: A universal tool for easy functional annotation of proteomes and transcriptomes. *PROTEOMICS* 17(12), 1700071.
- Clark J S, Andrus R, Aubry-Kientz M et al.** (2021) Continent-wide tree fecundity driven by indirect climate effects. *Nat. Commun.* 12, 1242.
- Coelho C M M, Benedito V A** (2008) Seed development and reserve compound accumulation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Seed Sci. Biotechnol.* 2, 42–52.
- Corbineau F** (2012) Markers of seed quality: from present to future. *Seed Sci. Res.* 22(S1), S61-S68.
- Crawford A D, Plummer J A, Probert R J, Steadman K J** (2011) The influence of cone age on the relative longevity of *Banksia* seeds. *Ann. Bot.* 107(2), 303-309.
- Daneshvar A, Tigabu M, Karimidoost A, Oden P** (2015) Single seed near infrared spectroscopy discriminates viable and non-viable seeds of *Juniperus polycarpus*. *Silva Fennica* 49(5), 1334.
- Dinakar C, Bartels D** (2013) Desiccation tolerance in resurrection plants: new insights from transcriptome, proteome and metabolome analysis. *Front. Plant Sci.* 4,

482.

- Dray S, Dufour A B** (2007) The ade4 Package: implementing the duality diagram for ecologists. *J. Stat. Softw.* 22(4), 1-20.
- Dronne S, Label P, Lelu M A** (1997) Desiccation decreases abscisic acid content in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*) somatic embryos. *Physiol. Plant.* 99(3), 433-438.
- El-Maarouf-Bouteau H** (2022) The seed and the metabolism regulation. *Biology (Basel)*. 11(2), 168.
- Engel J, Gerretzen J, Szymańska E, Jansen J J, Downey G, Blanchet L, Buydens L M C** (2013) Breaking with trends in pre-processing? *TrAC Trends Ann. Chem.* 50, 96-106.
- Farhadi M, Tigabu M, Odén P C** (2015) Near infrared spectroscopy as non-destructive method for sorting viable, petrified and empty seeds of *Larix sibirica*. *Silva Fenn.* 49(5), 1340.
- Farhadi M, Tigabu M, Pietrzykowski M, Danusevičius D, Odén P C** (2017) Application of near infrared spectroscopy for authentication of *Picea abies* seed provenance. *New For.* 48, 629-642.
- Farhadi M, Tigabu M, Stener L G, Odén P C** (2016) Feasibility of visible + near infrared spectroscopy for non-destructive verification of European x Japanese larch hybrid seeds. *New For.* 47, 271-285.
- Fassio A S, Restaino E A, Cozzolino D** (2015) Determination of oil content in whole corn (*Zea mays* L.) seeds by means of near infrared reflectance spectroscopy. *Comput. Electron. Agric.* 110, 171-175.
- Feder M E, Hofmann G E** (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61(1), 243-282.
- Finch-Savage W E, Leubner-Metzger G** (2006) Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.* 171(3), 501-523.
- Font R, Del Río-Celestino M, De Haro-Bailón A** (2006) The use of near-infrared spectroscopy (NIRS) in the study of seed quality components in plant breeding programs. *Ind Crop Prod* 24(3), 307-313.
- Font R, Del Río-Celestino M, De Haro-Bailón A** (2006) The use of near-infrared spectroscopy (NIRS) in the study of seed quality components in plant breeding programs. *Ind. Crop Prod.* 24(3), 307-313.
- Gautier F, Eliášová K, Leplé J C, Vondráková Z, Lomenech A M, Le Metté C, Label P, Costa G, Trontin J F, Teyssier C, Lelu-Walter M A** (2018) Repetitive somatic embryogenesis induced cytological and proteomic changes in embryogenic lines of *Pseudotsuga menziesii* [Mirb.]. *BMC Plant Biol.* 18(1), 164-188.
- Gautier F, Label P, Eliášová K, Leplé J C, Motyka V, Boizot N, Vondráková Z, Malbeck J, Trávníčková A, Le Metté C, Lesage-Descauses M C, Lomenech A M, Trontin J F, Costa G, Lelu-Walter M A, Teyssier C** (2019) Cytological, biochemical and molecular events of the embryogenic state in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* [Mirb.]). *Front. Plant Sci.* 10, 118.
- Gibson S I** (2005) Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8(1), 93-102.
- Gorian F, Pasquini S, Daws M I** (2007) Seed size and chilling affect germination of *Larix decidua* Mill. seeds. *Seed Sci. Technol.* 35, 508-513.
- Gösslová M, Svobodová H, Lipavská H, Albrechtová J, Vreugdenhil D** (2001) Comparing carbohydrate status during norway spruce seed development and

- somatic embryo formation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 37(1), 24-28.
- Graham I A** (2008) Seed Storage Oil Mobilization. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59(1), 115-142.
- Grunvald A K, Carvalho C G P D, Leite R S, Mandarino J M G, Andrade C A D B, Scapim C A** (2014) Predicting the oil contents in sunflower genotype seeds using near-infrared reflectance (NIR) spectroscopy. *Acta Sci. Agron.* 36(2), 233.
- Hacisalihoglu G, Freeman J, Armstrong P R, Seabourn B W, Porter L D, Settles A M, Gustin J L** (2020) Protein, weight, and oil prediction by single-seed near-infrared spectroscopy for selection of seed quality and yield traits in pea (*Pisum sativum*). *J. Sci. Food Agric.* 100(8), 3488-3497.
- Hacket-Pain A, Bogdziewicz M** (2021) Climate change and plant reproduction: trends and drivers of mast seeding change. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 376(1839), 20200379.
- Hampton J G** (2002) What is seed quality. *Seed Sci. Technol.* 30, 1-10.
- Hartmann H, Trumbore S** (2016) Understanding the roles of nonstructural carbohydrates in forest trees – from what we can measure to what we want to know. *New Phytol.* 211(2), 386-403.
- Hell A F, Kretschmar F S, Simões K, Heyer A G, Barbedo C J, Braga M R, Centeno D C** (2019) Metabolic changes on the acquisition of desiccation tolerance in seeds of the brazilian native tree *Erythrina speciosa*. *Front. Plant Sci.* 10, 1356.
- Hoekstra F A, Golovina E A, Buitink J** (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci.* 6(9), 431-438.
- Ifmalinda, Andasuryani, Santosa, Putri I** (2021) The application of NIRS method for non-destructive measurement of fat and carbohydrates in pumpkin seeds. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, Vol 922.
- Jasinski S, Lécureuil A, Durandet M, Bernard-Moulin P, Guerche P** (2016) Arabidopsis Seed Content QTL Mapping Using High-Throughput Phenotyping: The Assets of Near Infrared Spectroscopy. *Front. Plant Sci.* 7, 1682.
- Keller F, Ludlow M M** (1993) Carbohydrate metabolism in drought-stressed leaves of pigeonpea (*Cajanus cajan*). *Exp. Bot.* 44(8), 1351-1359.
- Kermode A R** (2011) Plant storage products (carbohydrates, oils and proteins). In: John Wiley & Sons L (ed) *eLS*, 1 Edn. Wiley, 1-20.
- Kermode A R, Finch-Savage B E** (2002) Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development., Vol 4. *CABI Books*, Wallingford, pp 149–184.
- Kijak H, Ratajczak E** (2020) What do we know about the genetic basis of seed desiccation tolerance and longevity? *Int. J. Mol. Sci.* 21(10), 3612.
- Koobaz P, Reza Ghaffari M, Heidari M, Mirzaei M, Ghanati F, Amirkhani A, Mortazavi SE, Moradi F, Hajirezaei M R, Salekdeh G H** (2020) Proteomic and metabolomic analysis of desiccation tolerance in wheat young seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* 146, 349-362.
- Kumar S** (2013) Fourier transform-near infrared reflectance spectroscopy calibration development for screening of oil content of intact safflower seeds. *Int. Food Res. J.* 20, 759-762.
- Leadem C** (1996) A guide to the biology and use of forest tree seeds. Province of British Columbia, Ministry of Forests Research Program, Victoria, British Columbia.
- Lefebvre M, Villar M, Boizot N, Delile A, Dimouro B, Lomenech A M, Teyssier C** (2022) Variability in seeds' physicochemical characteristics, germination and

- seedling growth within and between two French *Populus nigra* L. populations. . Peer Community Journal 2(e10).
- Leprince O, Buitink J** (2010) Desiccation tolerance: From genomics to the field. *Plant Sci.* 179(6), 554-564.
- Leprince O, Hendry G A F, McKersie B D** (1993) The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Sci. Res.* 3(4), 231-246.
- Lesnoff M** (2021) R package rchemo: Dimension reduction, Regression and Discrimination for Chemometrics. <https://github.com/mlesnoff/rchemo>. CIRAD, UMR SELMET, Montpellier, France.
- Lestander T A, Geladi P** (2003) NIR spectroscopic measurement of moisture content in Scots pine seeds. *The Analyst* 128(4), 389-396.
- Lestander T A, Geladi P** (2005) NIR spectral information used to predict water content of pine seeds from multivariate calibration. *Can. J. For. Res.* 35(5), 1139-1148.
- Lubowicki R, Kotlarz A, Jaskowska I** (2005) Effect of cultivar and harvest year on the composition of yellow lupin seeds. *J. Anim. Feed Sci.* 14(Suppl. 1), 373-376.
- Maity A, Paul D, Lamichaney A, Sarkar A, Babbar N, Mandal N, Dutta S, Maity P P, Chakrabarty S K** (2023) Climate change impacts on seed production and quality: current knowledge, implications, and mitigation strategies. *Seed Sci. Technol.* 51(1):65-96.
- Martinez-Munoz M, Ayala-Garay O J, Aguilar-Rincon V H, Conde-Martinez V, Corona-Torres T** (2019) Seed quality and LEA-protein expression in relation to fruit maturation and post-harvest storage of two chilies types. *Horticult. J.* 88(2), 245-252.
- Matilla A J** (2021) The orthodox dry seeds are alive: a clear example of desiccation tolerance. *Plants* 11(1), 20.
- Matthews S, Noli E, Demir I, Khajeh-Hosseini M, Wagner M H** (2012) Evaluation of seed quality: from physiology to international standardization. *Seed Sci. Res.* 22(S1), S69-S73.
- Mauri N, Fernández-Marcos M, Costas C, Desvoyes B, Pichel A, Caro E, Gutierrez C** (2016) GEM, a member of the GRAM domain family of proteins, is part of the ABA signaling pathway. *Sci. Rep.* 6(1), 22660.
- Mevik B H, Wehrens R** (2015) Introduction to the pls Package. R Foundation for Statistical Computing, 1-23 edn., Vienna, Austria.
- Mishra P, Biancolillo A, Roger J M, Marini F, Rutledge D N** (2020) New data preprocessing trends based on ensemble of multiple preprocessing techniques. *TrAC Trends Anal. Chem.* 132, 116045.
- Morel A, Trontin J F, Corbineau F, Lomenech A M, Beaufour M, Reymond I, Le Metté C, Ader K, Harvengt L, Cadene M, Label P, Teyssier C, Lelu-Walter M A** (2014) Cotyledonary somatic embryos of *Pinus pinaster* Ait. most closely resemble fresh, maturing cotyledonary zygotic embryos: biological, carbohydrate and proteomic analyses. *Planta* 240(5), 1075-1095.
- Oliver A E, Leprince O, Wolkers W F, Hinch D K, Heyer A G, Crowe J H** (2001) Non-disaccharide-based mechanisms of protection during drying. *Cryobiol.* 43(2), 151-167.
- Oliver M J, Farrant J M, Hilhorst H W M, Mundree S, Williams B, Bewley J D** (2020) Desiccation tolerance: avoiding cellular damage during drying and rehydration. *Annu. Rev. Plant Biol.* 71, 435-460.
- Owens J N** (2008) The reproductive biology of western larch. Inland Empire Tree Improvement Cooperative, Victoria, B.C.
- Phartyal S S, Thapliyal R C, Koedam N, Godefroid S** (2002) *Ex situ* conservation of

- rare and valuable forest tree species through seed-gene bank. *Curr. Sci.* 83(11), 1351-1357.
- Poncet B N, Garat P, Manel S, Bru N, Sachet J M, Roques A, Depres L** (2009) The effect of climate on masting in the European larch and on its specific seed predators. *Oecologia* 159, 527–537.
- Pulkka S, Segura V, Harju A, Tapanila T, Tanner J, Pâques L E, Charpentier J P** (2016) Prediction of stilbene content from heartwood increment cores of scots pine using near infrared spectroscopy methodology. *J. Near Infrared Spectroscop.* 24(6), 517–528.
- Rahman A, Cho B K** (2016) Assessment of seed quality using non-destructive measurement techniques: a review. *Seed Sci. Res.* 26(4), 285-305.
- Rajani K, Ranjan R, Ranjan T, Kumar A** (2017) Global approaches for identification of markers of seed quality- a review. *Int. j. adv. agric. sci. technol.* 4(4), 29-43.
- Rajendra Prasad S** (2023) Testing seed for quality. In: Dadlani M, Yadava D K (eds) *Seed Science and Technology*. Springer Nature Singapore, Singapore, pp 299-334.
- Ramos K M O, Matos J M M, Martins R C C, Martins I S** (2012) Electrical conductivity testing as applied to the assessment of freshly collected *Kielmeyera coriacea* Mart. seeds. *ISRN Agronomy* 2012, 378139.
- Roger J M, Biancolillo A, Marini F** (2020) Sequential preprocessing through ORThogonalization (SPORT) and its application to near infrared spectroscopy. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 199, 103975.
- Sghaier-Hammami B, Hammami B M S, Baazaoui N, Gómez-Díaz C, Jorrín-Novo J V** (2020) Dissecting the seed maturation and germination processes in the non-orthodox *Quercus ilex* species based on protein signatures as revealed by 2-DE coupled to MALDI-TOF/TOF proteomics strategy. *Int. J. Mol. Sci.* 21(14), 4870.
- Sipeniece E, Mišina I, Grygier A, Qian Y, Rudzińska M, Kaufmane E, Seglina D, Siger A, Górnas P** (2021) Impact of the harvest year of three cultivars of Japanese quince (*Chaenomeles japonica*) on the oil content and its composition. *Sci. Horticult.* 275, 109683.
- Škvareninová J, Mrekaj I** (2022) Impact of climate change on norway spruce flowering in the southern part of the western carpathians. *Front. Ecol. Evol.* 10, 865471.
- Szulc J, Gozdecka G, Poćwiardowski W** (2020) The application of NIR spectroscopy in moisture determining of vegetable seeds. *Czech J. Food Sci.* 38(2), 131-136.
- Tigabu M** (2003) Characterization of forest tree seed quality with near infrared spectroscopy and multivariate analysis. Thesis. Umeå, ISBN 91-576-6508-7.
- Tigabu M, Odén P C, Lindgren D** (2005) Identification of seed sources and parents of *Pinus sylvestris* L. using visible-near infrared reflectance spectra and multivariate analysis. *Trees* 19, 468-476.
- Tigabu M, Odén P C, Shen T Y** (2004) Application of near-infrared spectroscopy for the detection of internal insect infestation in *Picea abies* seed lots. *Can. J. For. Res.* 34(1), 76-84.
- Tsuchikawa S, Kobori H** (2015) A review of recent application of near infrared spectroscopy to wood science and technology. *J. Wood Sci.* 61, 213-220.
- Tsuchikawa S, Ma T, Inagaki T** (2022) Application of near-infrared spectroscopy to agriculture and forestry. *Anal. Sci.* 38, 635-642.
- Tulukcu E, Yalcin H, Ozturk I, Sagdic O** (2012) Changes in the fatty acid compositions and bioactivities of clary sage seeds depending on harvest year. *In: J. Crops Prod.* 39, 69-73.



- Vertucci C W, Farrant J M** (1995) Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: Seed development and germination. Marcel Dekker, New York, pp 237–271.
- Vizcaíno J A, Csordas A, del-Toro N, Dianas J A, Griss J, Lavidas I, Mayer G, Perez-Riverol Y, Reisinger F, Ternent T, Xu Q W, Wang R, Hermjakob H** (2016) 2016 update of the PRIDE database and its related tools. Nucleic Acids Res. 44(D1), D447-D456.
- Wahid N, Bounoua L** (2013) The relationship between seed weight, germination and biochemical reserves of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) in Morocco. New For. 44(3), 385-397.
- Wang W Q, Liu S J, Song S Q, Møller I M** (2015) Proteomics of seed development, desiccation tolerance, germination and vigor. Plant Physiol. Biochem. 86, 1-15.
- Wang W Q, Ye J Q, Rogowska-Wrzesinska A, Wojdyla K I, Jensen O N, Møller I M, Song S Q** (2014) Proteomic comparison between maturation drying and prematurely imposed drying of *Zea mays* seeds reveals a potential role of maturation drying in preparing proteins for seed germination, seedling vigor, and pathogen resistance. J. Proteome Res. 13(2), 606-626.
- Xu R, Hu W, Zhou Y, Zhang X, Xu S, Guo Q, Qi P, Chen L, Yang X, Zhang F, Liu L, Qiu L, Wang J** (2020) Use of near-infrared spectroscopy for the rapid evaluation of soybean [*Glycine max* (L.) Merri.] water soluble protein content. Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. 224, 117400.
- Zhang H, Wang W Q, Liu S J, Møller I M, Song S Q** (2015) Proteome analysis of poplar seed vigor. PLoS one 10(7), e0132509.
- Zhang Y, Zhang L, Wang J, Tang X, Wu H, Wang M, Zeng W, Mo Q, Li Y, Li J, Huang Y, Xu B, Zhang M** (2018) Rapid Determination of the Oil and Moisture Contents in *Camellia gauchowensis* Chang and *Camellia semiserrata* Chi Seeds Kernels by Near-infrared Reflectance Spectroscopy. Molecules 23(9), 2332.
- Zhong Y, Zhang Z, Chen J, Niu J, Shi Y, Wang Y, Chen T, Sun Z, Chen J, Luan M** (2021) Physicochemical properties, content, composition and partial least squares models of *A. trifoliata* seeds oil. Food Chem.: X 12, 100131.

## Chapitre VI – Perspectives

### VI.1. La déshydratation des ES : analyses complémentaires pour une meilleure compréhension du processus et pour un développement optimal des plants

Les RFO sont impliqués dans la tolérance à la déshydratation (Hoekstra et al., 2001; Smolikova et al., 2020). Ils agissent en protégeant l'intégrité des cellules, en stabilisant les membranes cellulaires et auraient un rôle dans la machinerie d'élimination des radicaux libres (Nishizawa et al., 2008). Dans notre étude, les traitements de déshydratation n'ont pas permis d'induire la synthèse de RFO. Or cette synthèse est nécessaire pour permettre aux ES de se rapprocher des caractéristiques biochimiques des EZ. Chez *Picea abies*, la synthèse de RFO a été rapportée suite à une déshydratation d'une durée de 3 semaines (Eliášová et al. 2022). A l'image de cette étude, nous pouvons envisager d'augmenter la durée de notre traitement de déshydratation de 1 à 2 voire 3 semaines, et mesurer la teneur en RFO pour observer si une accumulation est initiée et si elle impacte le développement ultérieur des ES. Cette étude sera très aisée à mettre en œuvre et fournira rapidement des résultats étant donné la maîtrise de la méthode de déshydratation et de la méthode analytique. Les lipides sont des composants majeurs de la membrane des cellules, jouent un rôle de molécules signal et participent à la tolérance à la déshydratation (Munnik et Testerink, 2009 ; Munnik and Vermeer, 2010 ; González-Morales et al., 2016). Chaque type de lipide possède des propriétés uniques, et par conséquent la composition en lipides joue un rôle déterminant dans la réponse à la déshydratation (Torres-Franklin et al., 2007). La diminution des galactolipides et l'augmentation du ratio digalactosyldiacylglycérole:monogalactosyldiacylglycérole font parties des réponses observées suite à une déshydratation (Gigon et al., 2004; Torres-Franklin et al., 2007). Ces changements sont également accompagnés de l'accumulation des lipides non-polaires (Quartacci et al., 1997; Gigon et al., 2004), la diminution du degré de saturation des acides gras (Daklma et al., 1995) et des réactions de peroxydation (Varghese et Naithani, (2002) ; Feng et al, 2017). Ces réponses sont souvent corrélées à un effet positif sur la résistance des plantes et des graines à une déshydratation. Plus spécifiquement chez les ES de conifères, la connaissance des modifications du profil des lipides en réponse à une déshydratation est encore peu développée. A notre connaissance, une seule étude s'y est intéressée (Ling et al., 2022). Dans celle-ci, les auteurs ont réussi à identifier 6 groupes de phospholipides différents ainsi que des galactolipides incluant des digalactosyldiacylglycérole et monogalactosyldiacylglycérole chez les ES de *Picea asperata* soumis à une déshydratation partielle pendant 2 semaines. De cette étude il en est ressorti que les acides phosphatidiques représentent les principaux types de lipides impliqués dans la réponse à la déshydratation. Les auteurs ont émis l'hypothèse que la synthèse d'acide phosphatidique pouvait affecter les propriétés physicochimiques de la membrane et que par ailleurs, cette synthèse pouvait influencer la germination des ES en jouant sur les voies de signalisation hormonale. Dans cette thèse, seule la teneur en lipides totaux a été considérée aucune analyse qualitative n'ayant été réalisée. Or, l'étude du profil des lipides entre les ES déshydratés et les ES témoins de 8 semaines permettrait de mieux comprendre les

mécanismes de réponse à la déshydratation et fournirait des connaissances fondamentales qui manquent chez les ES de conifères. La spectrométrie de masse est couramment utilisée pour quantifier les lipides et analyser leur profil. Cette méthode pourrait notamment être utilisée pour les ES de mélèze hybride à l'image de ce qui a été fait pour les ES de *Picea asperata*. L'analyse du profil des lipides chez les ES de mélèze, impliquera que la méthode d'extraction réalisée dans cette thèse soit ajustée et que les extraits soient envoyés à des plateformes possédant un spectromètre de masse adapté à l'analyse des lipides. De plus, il sera nécessaire d'avoir une expertise pour le traitement et l'analyse des résultats obtenus. La quantité de matériel nécessaire pour les analyses est envisageable pour des ES de mélèze (10 à 50 mg de MS, Welti et al., 2002). Cette étude nous semble réalisable à court-terme (environ 6 mois).

## **VI.2. La transcriptomique pour compléter la protéomique : une approche holistique vers une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la déshydratation**

La transcriptomique et la protéomique sont deux approches complémentaires pour étudier les processus biologiques au niveau moléculaire. La transcriptomique se concentre sur l'analyse des niveaux d'expression des gènes, c'est-à-dire les ARN messagers, tandis que la protéomique se concentre sur l'analyse des protéines produites à partir de ces ARN messagers. L'analyse des résultats de ces deux approches peut fournir une compréhension plus complète et précise des mécanismes moléculaires régulant les processus biologiques. Dans le contexte d'étude de la déshydratation, la transcriptomique offre plusieurs avantages. Dans notre étude, nous sommes parvenus à identifier des protéines différentiellement exprimées entre les ES déshydratés et les témoins non déshydratés. Cependant, le nombre de protéines était assez faible. Bien que dans certains cas un faible nombre de protéines identifiées puisse être attendu, par exemple dans un matériel déshydraté où l'activité métabolique est ralentie, il est important de comprendre les causes potentielles de ce faible nombre de protéines identifiées. Ainsi, l'intégration des données de transcriptomique en association avec les données de protéomique pourrait renforcer la fiabilité des résultats obtenus. Si les deux approches convergent vers la même conclusion, cela renforce la confiance dans les conclusions tirées dans notre étude. Si ce n'est pas le cas alors il faudra identifier l'origine de cette divergence pour tenter de l'expliquer. Par ailleurs, l'approche transcriptomique permet d'acquérir une compréhension approfondie des processus moléculaires impliqués notamment lors de la déshydratation. Chez les ES de *Picea asperata* elle a permis d'identifier les gènes qui sont régulés à la hausse ou à la baisse en réponse à la déshydratation, ainsi que les voies de signalisation qui interviennent dans cette réponse (Ling et al., 2022 ; Ling et al., 2023). Afin de compléter nos résultats de protéomique, il serait intéressant d'analyser l'expression différentielle des transcrits avant et après déshydratation des ES pour avoir une vue holistique de la régulation de ce processus. Par ailleurs, nous serons capables de fournir des résultats originaux en regard du profil transcriptomique d'ES déshydratés sous faible humidité relative.

En utilisant des techniques de séquençage à haut débit, comme le séquençage RNA-Seq, il est possible de caractériser de manière exhaustive le transcriptome des ES en réponse à une déshydratation. Par ailleurs, la disponibilité d'une base de données de séquences annotées obtenues chez des ES de mélèze du Japon offre des informations directement utilisables pour analyser les transcriptomes de nos ES (Zhang et al., 2012). Cette étude transcriptomique chez les ES de mélèze hybride

pourrait fournir des résultats à moyen terme, au bout de 2-3 ans. En effet, les données transcriptomiques constituent une large base de données qui nécessite des traitements bioinformatiques complexes nécessitant un certain temps d'analyse de la littérature pour aboutir à une synthèse complète, informative et précise des mécanismes moléculaires impliqués dans la déshydratation.

### **VI.3. La spectrométrie infrarouge : un outil performant de caractérisation aux multiples utilisations**

#### **VI.3.1. Pour la caractérisation des graines forestières sur le terrain**

La spectrométrie infrarouge est une technique prometteuse pour caractériser les graines en fournissant des informations rapides sur leur composition biochimique, leur qualité ou leur provenance comme nous avons pu le voir dans les précédentes études dont la nôtre sur les graines de mélèze (chapitre 4 ; Tigabu et al., 2004 ; Farhadi et al., 2015 ; Farhadi et al., 2016). Pour les professionnels la caractérisation des graines à l'aide de la spectrométrie infrarouge peut avoir plusieurs applications intéressantes. Elle peut servir à l'évaluation de la qualité des graines qui est un facteur crucial pour le succès de la reforestation et de la régénération forestière. La spectrométrie infrarouge peut être utilisée pour évaluer la composition biochimique des graines, ce qui peut donner des indications sur leur viabilité et leur potentiel de germination. Comme nous l'avons vu (chapitre 4), la spectrométrie permet aussi le suivi de la maturation. En effet, elle peut permettre de suivre les changements biochimiques au fil du temps, offrant des informations pour le moment optimal de la récolte des graines. Pour effectuer des mesures sur le terrain, des spectromètres infrarouge portables sont utilisés offrant une analyse et/ou un diagnostic rapide et non-destructif (Zhu et al., 2022). Ainsi, le transfert de nos modèles prédictifs pour l'utilisation sur le terrain offrirait un avantage considérable à l'industrie forestière.

Pour mettre en œuvre cette perspective de transfert de nos modèles pour une utilisation sur le terrain, afin de répondre au besoin des professionnels, le travail réalisé dans le chapitre 4 constitue une base importante, étant donné les moyens considérables mis en place pour établir une base de données obtenues sur 6 années avec l'acquisition de plus de 1100 spectres. Chaque graine a été mesurée par spectroscopie infrarouge avec un spectromètre fixe de laboratoire pour obtenir les mesures quantitatives de 13 variables biochimiques différentes. De manière générale, chaque modèle de spectromètre possède son propre mode d'acquisition ce qui justifie de créer des modèles validant la possibilité d'un transfert des spectres d'un appareil de laboratoire vers un appareil portable. Le transfert de méthode pour la caractérisation et l'optimisation de la récolte des prunes d'Entes a été réalisé avec succès et nous conforte dans la faisabilité de cette perspective de transfert de méthode, spécifiquement pour les graines de mélèze (Lallemand et al., 2015 ; Capelle et Aubert, 2019). Pour ce faire, il s'agira dans un premier temps d'accumuler des spectres obtenus avec le spectromètre de laboratoire et celui utilisé sur le terrain. Il s'agira ensuite de comparer les deux jeux de spectres afin de déterminer ce qui les différencie (déformation, décalage des valeurs d'absorbance) grâce à des méthodes mathématiques complexes. Une fois ces différences identifiées, il sera possible de transformer les anciens spectres afin qu'ils soient conformes à une utilisation sur l'appareil portable et inversement. A terme, cela permettra d'incrémenter des nouveaux spectres, obtenus avec un appareil différent, aux données déjà acquises durant les 6 années précédentes. Cela offre la possibilité d'optimiser et faciliter l'utilisation d'un nouvel appareil tout en bénéficiant des données préalablement

acquises et du lourd travail de caractérisation de graines déjà réalisé en amont. Par ailleurs, cela permettra un gain de temps énorme en regard du développement des modèles de calibration pour la caractérisation des graines de mélèze sur le terrain. Il ne sera pas nécessaire de recommencer la procédure de développement des modèles depuis le départ, c'est-à-dire depuis l'acquisition et le cumul des données spectrales et biochimiques qui constitue la partie la plus fastidieuse et chronophage, offrant ainsi la possibilité de mettre en œuvre cette perspective rapidement pour les graines de mélèze (moins de 1 an). Cette étude est originale car elle n'a jamais été réalisée pour les graines forestières. Par ailleurs, elle est particulièrement intéressante étant donné la demande de méthode de caractérisation simple, rapide, non-destructive et précise de la part des professionnels.

### **VI.3.2. Pour un tri rapide et précis des ES produits en bioréacteur**

La production d'ES en bioréacteur (culture en milieu liquide) marque une avancée significative dans le domaine de la biotechnologie végétale et de la propagation des plantes. Les bioréacteurs constituent des environnements contrôlés et automatisés où les conditions de culture peuvent être minutieusement ajustées pour favoriser la croissance et le développement des ES (Monja-Mio et al., 2016). L'utilisation de bioréacteurs permet ainsi d'améliorer l'efficacité, la qualité et la rentabilité du processus d'embryogenèse somatique. Par ailleurs, cette approche présente un avantage pour la production en masse d'ES comme il a été observé pour de nombreuses espèces ligneuses (Afreen et al., 2002 ; Ducos et al., 2004 ; Niemenak et al., 2008 ; Egertsdotter et al., 2019) dont le mélèze hybride (Le et al., 2021). Cependant, malgré ses avantages, la production d'ES en bioréacteur n'est pas exempte de problèmes. Le développement asynchrone (Etienne et al., 2012) et la malformation de l'embryon sont des caractéristiques souvent observées (Aguilar et al., 2022). Cette hétérogénéité peut induire une variabilité de l'efficacité de conversion en plantes et des retards de croissance en pépinière (Barry-Etienne et al., 2002). Le succès de la culture en bioréacteur repose sur l'obtention *in fine* d'un plus grand nombre de plantes. Cela nécessite l'amélioration du tri des embryons en fonction de leurs caractéristiques morphologiques et biochimiques pour garantir leur développement et la croissance des plantes en conditions *ex vitro*. Pour ce faire, la sélection des ES produits en bioréacteur pourrait être faite par spectrométrie infrarouge pour une caractérisation à haut débit et individuelle des ES, remplaçant ainsi une sélection insatisfaisante basée sur les seuls critères morphologiques (Le et al., 2021). Par ailleurs, avec la spectrométrie infrarouge il est possible d'optimiser les conditions de culture des ES en temps réel. Si les échantillons montrent des variations non désirées dans leurs spectres infrarouges, cela peut indiquer des problèmes de culture permettant alors des ajustements rapides pour améliorer la performance du bioréacteur.

En résumé, l'association de la spectrométrie infrarouge avec le tri des ES issus de bioréacteurs permettrait de contrôler, de caractériser et de sélectionner les ES en fonction de leurs caractéristiques biochimiques. La qualité des ES peut en être améliorée en vue d'une production à l'échelle industrielle. Cette association n'a jamais été réalisée et nécessite par conséquent des ajustements techniques. En effet, les conditions environnementales des bioréacteurs pourraient influencer l'allure des spectres infrarouges pris sur les ES, changeant ainsi la calibration des modèles de prédiction. Afin d'obtenir des modèles suffisamment précis et robustes pour effectuer un tri efficace avec le moins d'erreurs possible, il sera nécessaire de développer des modèles de prédiction propres à ces ES. Cela implique de réaliser un nouvel

échantillonnage à partir des ES issus de bioréacteurs, une prise de spectres ainsi que des mesures biochimiques des paramètres à prédire, puis de développer et valider les modèles de prédiction. Cette perspective est réalisable à moyen-terme, le développement complet des modèles pouvant aboutir en 2 ans.

#### **VI.4. Étude du développement des plants *ex vitro* : analyse de l'impact des traitements de déshydratation et comparaison avec des semis**

L'étude du comportement des plants issus d'ES constitue une étape nécessaire pour évaluer l'impact des différents traitements notamment de déshydratation (chapitre 3). Cette étude *ex vitro* se concentre sur les paramètres qui régissent l'adaptation des plants somatiques à des conditions plus variables, telles que l'exposition à la lumière naturelle, la variation de température et les fluctuations d'humidité. Elle pourrait notamment inclure des aspects tels que l'évaluation de la croissance, la rectitude, la branchaison, le débourrement et de la phénologie florale. L'objectif principal est de déterminer dans quelle mesure les traitements réalisés *in vitro* impactent ou non le développement ultérieur des plants somatiques *ex vitro*. Pour ce faire, il s'agira d'observer le phénotype des plants issus d'ES déshydratés en comparaison avec les plants issus des ES témoins non déshydratés. Par ailleurs, la comparaison de ces plants somatiques par rapport à des semis permettra de déterminer si la méthode de production des ES de mélèze hybride et les traitements appliqués permettent d'obtenir des plants somatiques semblables à des semis pour répondre au besoin des améliorateurs voulant intégrer l'embryogenèse somatique dans leur programme d'amélioration (Högberg et al., 1998 ; Lelu-Walter et Pâques, 2009 ; Lelu-Walter et al., 2013). Au cours des premiers mois voire années de croissance, des différences peuvent exister entre des plants issus d'ES et des semis (Grossnickle et al., 1994a ; Trontin et al., 2013). Ces différences s'estompent après 5 années de croissance sur le terrain comme rapportées chez l'épicéa (Grossnickle et al., 1994c), le pin maritime (Trontin et al., 2013) voire le café (Georget et al., 2017). L'évaluation de la performance des plants doit donc être réalisée après plusieurs années, les différences observées au cours des premières années pouvant être le résultat d'un stress engendré par l'acclimatation lors du transfert des plants en conditions *ex vitro*.

L'acclimatation de plants issus d'ES est de manière générale réussie chez les conifères (Grossnickle et Folk, 2007 ; Egertsdotter, 2019 ; Reeves et al., 2023). La réussite de la transition *ex vitro* dépend de plusieurs facteurs dont le choix des ES mis en germination, le choix des plants qui seront acclimatés et la maîtrise de la méthode d'acclimatation (Nielsen et al., 2022). En général le choix des ES se base sur leur morphologie cependant grâce au travail réalisé dans cette thèse, il sera possible de choisir le stade de maturation optimal en se basant sur la composition des réserves des ES, qui est déterminante pour leur développement ultérieur. Par ailleurs, les conditions de culture en boîte de Petri ne semblent pas optimales. En effet, des déformations sont parfois observées (courbures racine, hypocotyle...) pouvant être irréversibles et rédhibitoires à l'obtention de plants de qualité sur le terrain. Par ailleurs, il a également été rapporté que la taille de l'épicotyle et la présence de racines latérales constituent des traits importants à prendre en compte lors du transfert *ex vitro* (Högberg et al., 2003). Aussi, afin de minimiser l'impact de la culture *in vitro*, une possibilité est d'en limiter sa durée. Chez *Picea abies*, la réduction de la durée de germination *in vitro* a un fort effet positif sur la survie et la croissance ultérieures des plants (Tikkinen et al., 2018). Dans cette étude, les ES sont mis en germination pendant seulement une semaine avant leur acclimatation. A ce stade, les ES germés ne présentent qu'une racine de quelques millimètres.

L'étude du comportement des plants sur le terrain en comparaison avec des semis, pourra être mis en place rapidement mais nécessitera un suivi d'au moins 5 ans.

## Références

- Afreen F, Zobayed S M A, Kozai T** (2002) Photoautotrophic culture of *Coffea arabusta* somatic embryos: photosynthetic ability and growth of different stage embryos. *Ann. Bot.* 90(1), 11-9.
- Aguilar M E, Wang X Y, Escalona M, Yan L, Huang L F** (2022) Somatic embryogenesis of *Arabica* coffee in temporary immersion culture : advances, limitations, and perspectives for mass propagation of selected genotypes. *Front. Plant Sci.* 13, 994578.
- Barry-Etienne D, Bertrand B, Vásquez N, Etienne H** (2002) Comparison of somatic embryogenesis derived coffee (*Coffea arabica* L.) plantlets regenerated *in vitro* or *ex vitro* conditions: morphological, mineral and water characteristics. *Ann. Bot.* 90, 77–85.
- Capelle M, Aubert S** (2019) Évaluation de la maturité de la prune d'Ente par Spectroscopie proche infrarouge – 20èmes Rencontres HéliosPIR 2019 – Montpellier, France.
- Daklma W S, Zarrouk M, Cherif A** (1995) Effects of drought-stress on lipids in rape leaves. *Phytochem.* 40, 1383–1386.
- Ducos J P, Lambot C, Pétiard V** (2007) Bioreactors for coffee mass propagation by somatic embryogenesis. *Int. J. Plant Dev. Biol.* 1(1), 1-12.
- Egertsdotter U** (2019) Plant physiological and genetical aspects of the somatic embryogenesis process in conifers. *Scand. J. For. Res.* 34(5), 360-369.
- Egertsdotter U, Ahmad I, Clapham D** (2019) Automation and scale up of somatic embryogenesis for commercial plant production, with emphasis on conifers. *Front. Plant Sci.* 18, 10-109.
- Eliášová K, Konrádová H, Dobrev P I, Motyka V, Lomenech A M, Fischerová L, Lelu-Walter M A, Vondráková Z, Teyssier C** (2022) Desiccation as a post-maturation treatment helps complete maturation of Norway spruce somatic embryos: carbohydrates, phytohormones and proteomic status. *Front. Plant Sci.* 13, 823617.
- Etienne H, Bertrand B, Montagnon C, Bobadilla Landey R, Dechamp E, Jourdan I, Alpizar E, Malo E, Georget F** (2012) Un exemple de transfert de technologie réussi dans le domaine de la micropropagation: la multiplication de *Coffea arabica* par embryogenèse somatique. *Cah. Agric.* 21, 115–124.
- Farhadi M, Tigabu M, Odén P C** (2015) Near infrared spectroscopy as non-destructive method for sorting viable, petrified and empty seeds of *Larix sibirica*. *Silva Fenn.* 49(5), 12p.
- Farhadi M, Tigabu M, Stener L G, Odén P C** (2016) Feasibility of visible + near infrared spectroscopy for non-destructive verification of European x Japanese larch hybrid seeds. *New For.* 47(2), 271–285.
- Feng J, Shen Y, Shi F, Li C** (2017) Changes in seed germination ability, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Ginkgo biloba* seed during desiccation. *Forests* 8(8),286.
- Georget F, Courtel P, Garcia E M, Hidalgo M, Alpizar E, Breitler J C, Bertrand B, Etienne H** (2017) Somatic embryogenesis-derived coffee plantlets can be efficiently propagated by horticultural rooted mini-cuttings: a boost for somatic embryogenesis. *Sci. Hortic.* 216, 177–185.
- Gigon A, Matos A R, Laffray D, Zuily-Fodil Y, Pham-Thi A T** (2004) Effect of drought stress on lipid metabolism in the leaves of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia). *Ann. Bot.* 94, 345-351.
- González-Morales S I, Chávez-Montes R A, Hayano-Kanashiro C, Alejo-Jacuinde**



- G, Rico-Cambron T Y, de Folter S, Herrera-Estrella L** (2016) Regulatory network analysis reveals novel regulators of seed desiccation tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 113, 5232–5241.
- Grossnickle S C, Folk R S** (2007) Field performance potential of a somatic interior spruce seedlot. New For. 34(1), 51–72.
- Grossnickle S C, Major J E, Folk R S** (1994a) Interior spruce seedlings compared to emblings produced from somatic embryogenesis. (I) Nursery development, fall acclimation and over-winter storage. Can. J. For. Res. 24(7), 1376–1384.
- Grossnickle S C, Major J E, Folk R S** (1994c) Interior spruce seedlings compared to emblings produced from somatic embryogenesis. (III) Physiological response and morphological development on a reforestation site. Can. J. For. Res. 24(7), 1397–1407.
- Hoekstra F A, Golovina E A, Buitink J** (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. Trends Plant Sci. 6, 431–438.
- Högberg K A, Ekberg I, Norell L, von Arnold S** (1998) Integration of somatic embryogenesis in a tree breeding programme: a case study with *Picea abies*. Can J For Res 28:1536–1545
- Högberg K, Bozhkov P V, von Arnold S** (2003) Early selection improves clonal performance and reduces intraclonal variation of Norway spruce plants propagated by somatic embryogenesis. Tree Physiol. 23, 211–216.
- Lallemand J, Roussel S, Rashidi S, Capelle M** (2015) Evaluation of Ente plum maturity by infrared spectroscopy – 17th International Conference on Near Infrared Spectroscopy (NIR 2015) – Foz do Iguassu, Brazil.
- Le K C, Dedicova B, Johansson S, Lelu-Walter M A, Egertsdotter U** (2021) Temporary immersion bioreactor system for propagation by somatic embryogenesis of hybrid larch (*Larix eurolepis* Henry). Biotechnol. Rep. 32, e00684.
- Lelu-Walter M A, Paques L E** (2009) Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix x eurolepis* and *Larix x marschlinsii*). Perspectives for breeding. Ann. For. Sci. 66(104), p1–104 p10.
- Lelu-Walter M A, Thompson D, Harvengt L, Sanchez L, Toribio M, Pâques L E** (2013) Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction. Tree Genet. Genomes 9, 883–899.
- Ling J, Xia Y, Hu J, Zhu T, Wang J, Zhang H, Kong L** (2022) Integrated lipidomic and transcriptomic analysis reveals phospholipid changes in somatic embryos of *Picea asperata* in response to partial desiccation. Int. J. Mol. Sci. 23(12), 6494.
- Ling J, Hu J, Wang J, An S, Wang L, Xu N, Zhu T** (2023) Effects of desiccation on anatomical structure of somatic embryo and expression of cell wall remodeling gene of *Picea asperata*. Forest Research. doi: 10.12403/j.1001-1498.20230157.
- Monja-Mio K M, Herrera-Alamillo M, Robert M L** (2016) Somatic embryogenesis in temporary immersion bioreactors. Dans MonjaMio K M, Herrera-Alamillo M Á, Robert M L (eds) Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications. Springer, Cham, 435–454.
- Munnik T, Testerink C** (2009) Plant phospholipid signaling: “in a nut-shell”. J. Lipid Res. 50(Supplement), 260–265.
- Munnik T, Vermeer J E M** (2010) Osmotic stress-induced phosphoinositide and inositolphosphate signalling in plants. Plant Cell Environ. 33, 655–669.
- Niemenak N, Saare-Surminski K, Rohsius C, Omokolo Ndoumou D, Lieberei R**

- (2008) Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. *Plant Cell. Rep.* 27, 667–676.
- Nielsen U B, Hansen C B, Hansen U, Johansen V K, Egertsdotter U** (2022) Accumulated effects of factors determining plant development from somatic embryos of *Abies nordmanniana* and *Abies bornmuelleriana*. *Front. Plant Sci.* 13, 989484.
- Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S** (2008) Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol.* 147, 1251–1263.
- Quartacci M F, Forli M, Dalla-Vecchia, F, Bochicchio A, Navari-Izzo F** (1997) Desiccation-tolerant *Sporobolus stapfianus*: lipid composition and cellular ultrastructure during dehydration and rehydration. *J. Exp. Bot.* 48, 1269–1279.
- Reeves C, Tikkinen M, Aronen T, Krajnakova J** (2023) Application of cold storage and short *in vitro* germination for somatic embryos of *Pinus radiata* and *P. sylvestris*. *Plants (Basel)*. 12(11), 2095.
- Smolikova G, Leonova T, Vashurina N, Frolov A, Medvedev S** (2020) Desiccation tolerance as the basis of long-term seed viability. *Int. J. Mol. Sci.* 22(1), 101.
- Tigabu M, Odén P C, Shen T Y** (2004) Application of near-infrared spectroscopy for the detection of internal insect infestation in *Picea abies* seed lots. *Can. J. For. Res.* 34(1), 76–84.
- Tikkinen M, Varis S, Peltola H, Aronen T** (2018) Improved germination conditions for Norway spruce somatic cotyledonary embryos increased survival and height growth of emblings. *Trees* 32, 1489–1504.
- Torres-Franklin M L, Gigon A, de Melo D F, Zuily-Fodil Y, Pham-Thi A T** (2007) Drought stress and rehydration affect the balance between MGDG and DGDG synthesis in cowpea leaves. *Physiol. Plant.* 131, 201–210.
- Trontin J F, Canlet F, Reymond I, Debille S, Durandeau K, Harvengt L, Rousseau J, de Boisseson J, Fraysse J, Alazard P, Bailly A, Teyssier C, Le Metté C, Morel A, Label P, Lelu-Walter M** (2013). L'embryogenèse somatique : une méthode de multiplication végétative du pin maritime pour demain ? FCBA - INFO - Août 2013.
- Varghese B, Naithani S C** (2002) Desiccation-induced changes in lipid peroxidation, superoxide level and antioxidant enzymes activity in neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seeds. *Acta Physiol. Plant.* 24, 79–87.
- Welti R, Li W Q, Li M Y, Sang Y M, Biesiad H, Zhou H E, Rajashekar C B, Williams T D, Wang X M** (2002) Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase D alpha in freezing-induced lipid changes in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 277, 31994–32002.
- Zhang Y, Zhang S, Han S, Li X, Qi L** (2012) Transcriptome profiling and *in silico* analysis of somatic embryos in Japanese larch (*Larix leptolepis*). *Plant Cell Rep.* 31, 1637–1657.
- Zhu C, Fu X, Zhang J, Qin K, Wu C** (2022) Review of portable near infrared spectrometers: Current status and new techniques *J. Near Infrared Spectrosc.* 30(2), 51-66.

## Références

- Afreen F, Zobayed S M A, Kozai T (2002)** Photoautotrophic culture of *Coffea arabusta* somatic embryos: photosynthetic ability and growth of different stage embryos. *Ann. Bot.* 90(1), 11-9.
- Aguilar M E, Wang X Y, Escalona M, Yan L, Huang L F (2022)** Somatic embryogenesis of *Arabica* coffee in temporary immersion culture : advances, limitations, and perspectives for mass propagation of selected genotypes. *Front. Plant Sci.* 13, 994578.
- Aguirre M, Kiegle E, Leo G, Ezquer I (2018)** Carbohydrate reserves and seed development: an overview. *Plant Repro.* 31(3), 263-290.
- Alan Ö, Eser B (2008)** The effect of fruit maturity and post-harvest ripening on seed quality in hot and conic pepper cultivars. *Seed Sci. Technol.* 36(2), 467-474.
- Alfonso O B, Ariza Mateos D, Palacios Rodríguez G, Ginhas M A, Ruiz Gómez F J (2020)** Seed protein profile of *Pinus greggii* and *Pinus patula* through functional genomics analysis. *Bosque (Valdivia)*, 41(3), 333-344.
- Allagulova C, Avalbaev A, Fedorova K, Shakirova F (2020)** Methyl jasmonate alleviates water stress-induced damages by promoting dehydrins accumulation in wheat plants. *Plant Physiol. Biochem.* 155, 676-682.
- Allona I, Casado R, Aragoncillo C (1992)** Seed storage protein from *Pinus pinaster* Ait.: homology of major components with 11S proteins from angiosperms. *Plant Sci.* 87, 9–18.
- Alscher R G, Erturk N, Heath L S (2002)** Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 53(372), 1331-1341.
- Amara I, Zaidi I, Masmoudi K, Ludevid M, Pagès M, Goday A, Brini F (2014)** Insights into late embryogenesis abundant (LEA) proteins in plants: from structure to the functions. *Am. J. Plant Sci.* 5, 3440–3455.
- Anandarajah K, Kott L, Beversdorf W D, McKersie B D (1991)** Induction of desiccation tolerance in microspore-derived embryos of *Brassica napus* by thermal stress. *Plant Sci.* 77, 119-123.
- Angelovici R, Galili G, Fernie A R (2010)** Seed desiccation: a bridge between maturation and germination. *Trends Plant Sci.* 15, 211–218.
- Ascough G D, Fennell C W (2004)** The regulation of plant growth and development in liquid culture. *S. Afr. J. Bot.* 70, 181-190.
- Attree S M, Moore D, Sawhney VK, Fowke L C (1991)** Enhanced maturation and desiccation tolerance of white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss] somatic embryos: Effects of a non-plasmolysing water stress and abscisic acid. *Ann. Bot.* 68, 519–525.
- Attree S M, Pomeroy M K, Fowke L C (1994)** Production of vigorous, desiccation tolerant white spruce (*Picea glauca* [Moench] Voss) synthetic seeds in a bioreactor. *Plant Cell Rep.* 13, 601–606.
- Attree S M, Pomeroy M K, Fowke L C (1995)** Development of white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) somatic embryos during culture with abscisic acid and osmoticum and their tolerance to drying and frozen storage. *J. Exp. Bot.* 46, 433-439.
- Bailly C (2004)** Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci.*

- Res. 14, 93–107.
- Bailly C, Audigier C, Ladonne F, Wagner M H, Coste F, Corbineau F, Côme D** (2001) Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. *J. Exp. Bot.* 52(357), 701-708.
- Balbuena T S, Silveira V, Junqueira M, Dias L L C, Santa-Catarina C, Shevchenko A, Floh E I S** (2009) Changes in the 2-DE protein profile during zygotic embryogenesis in the Brazilian Pine (*Araucaria angustifolia*). *J. Proteomics* 72, 337–352.
- Balen B, Tkalec M, Pavoković D, Pevalék-Kozlina B, Krsnik-Rasol M** (2009) Growth conditions in *in vitro* culture can induce oxidative stress in *Mammillaria gracilis* tissues. *J. Plant Growth Regul.* 28, 36-45.
- Ball P** (2008) Water as an active constituent in cell biology. *Chem. Rev.* 108, 74-108.
- Ballesteros D, Pritchard H W, Walters C** (2020) Dry architecture: towards the understanding of the variation of longevity in desiccation-tolerant germplasm. *Seed Sci. Res.* 30, 142-155.
- Barry-Etienne D, Bertrand B, Vásquez N, Etienne H** (2002) Comparison of somatic embryogenesis derived coffee (*Coffea arabica* L.) plantlets regenerated *in vitro* or *ex vitro* conditions: morphological, mineral and water characteristics. *Ann. Bot.* 90, 77–85.
- Bastien J C, Keller R** (1980) Intérêts comparés du mélèze hybride (*Larix x eurolepis* Henry) avec les deux espèces parentes. *Rev. For. Fr.* 32, 521–530.
- Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garciarrubio A, Campos F, Covarrubias A A** (2008) The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol.* 148, 6–24.
- Baud S** (2018) Seeds as oil factories. *Plant Repro.* 31, 213–235.
- Baud S, Dubreucq B, Miquel M, Rochat C, Lepiniec L** (2008) Storage reserve accumulation in *Arabidopsis*: metabolic and developmental control of seed filling. *Arabidopsis Book* 6, e0113.
- Baye T M, Pearson T C, Settles A M** (2006) Development of a calibration to predict maize seed composition using single kernel near infrared spectroscopy. *J. Cereal Sci.* 43(2), 236-243.
- Beardmore T, Charest P J** (1995) Black spruce somatic embryo germination and desiccation tolerance. I. Effects of abscisic acid, cold, and heat treatments on the germinability of mature black spruce somatic embryos. *Can. J. For. Res.* 25, 1763–1772.
- Becwar M R, Nagmani R, Wann S R** (1990) Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Can. J. Bot.* 20(6), 810-817.
- Belousova A C, Tret'iakova I N** (2008) Patterns of somatic embryo formation in *Siberian larch*: embryological aspects. *Ontogenez.* 39(2), 106-15.
- Bergstedt A, Lyck C** (2007) Larch wood: a literature review. *Forest & Landscape working paper* 23, 1–107.
- Berjak P, Pammenter N W** (2007) From *Avicennia* to *Zizania*: seed recalcitrance in perspective. *Ann. Bot.* 101, 213–228.
- Bernal-Lugo I, Leopold A C** (1995) Seed stability during storage: Raffinose content and seed glassy state. *Seed Sci. Res.* 5(2), 75-80.
- Bernatoniene J, Kopustinskiene D M** (2018) The role of catechins in cellular responses to oxidative stress. *Mol.* 23(4), 965.
- Bewley J D, Black M** (1994) *Seeds* dans: Bewley J D, Black M (Eds.) *Seeds:*

- physiology of development and germination. Springer US, Boston, MA, 1–33.
- Bewley J D, Bradford K J, Hilhorst H W M, Nonogaki H** (2013) *Seeds: physiology of development, germination and dormancy*, 3rd edn. Springer Science & Business Media, New York, NY, 381.
- Bhadouriya S L, Mehrotra S, Basantani M K, Loake G J, Mehrotra R** (2021) **Role of chromatin architecture in plant stress responses: an update.** *Front. Plant Sci.* **11**, 603380.
- Bhullar S S** (1995) Bioregulation of starch accumulation in developing seeds. *Curr. Sci.* **68**(5), 507-516.
- Black M, Corbineau F, Gee H, Côme D** (1999) Water content, raffinose, and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos. *Plant Physiol.* **120**(2), 463-472.
- Bomal C, Le V Q, Tremblay F M** (2002) Induction of tolerance to fast desiccation in black spruce (*Picea mariana*) somatic embryos: relationship between partial water loss, sugars, and dehydrins. *Physiol. Plant.* **115**, 523-530.
- Bradford K J, Dahal P, Van Asbrouk J, Kunusoth K, Bello P, Thompson J, Wu F** (2018) The dry chain: reducing postharvest losses and improving food safety in humid climates. *Trends Food Sci. Technol.* **71**, 84–93.
- Bray E** (1993) **Molecular response to water deficit.** *Plant Physiol.* **103**, 1035-1040.
- Brownfield D L, Todd C D, Stone S L, Deyholos M K, Gifford D J** (2007) Patterns of storage protein and triacylglycerol accumulation during loblolly pine somatic embryo maturation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **88**(2), 217-223.
- Brunoni F, Collani S, Casanova-Sáez R, Šimura J, Karady M, Schmid M, Ljung K, Bellini C** (2020) Conifers exhibit a characteristic inactivation of auxin to maintain tissue homeostasis. *New Phytol.* **226**(6), 1753-1765.
- Brunoni F, Pěňčík A, Žukauskaitė A, Ament A, Kopečná M, Collani S, Kopečný D, Novák O** (2023) Amino acid conjugation of oxIAA is a secondary metabolic regulation involved in auxin homeostasis. *New Phytol.* **238**(6), 2264-2270.
- Buitink J, Leprince O** (2008) Intracellular glasses and seed survival in the dry state. *Comptes Rendus Biologies* **331**, 788–795.
- Businge E, Bygdell J, Wingsle G, Moritz T, Egertsdotter U** (2013) The effect of carbohydrates and osmoticum on storage reserve accumulation and germination of Norway spruce somatic embryos. *Physiol. Plant.* **149**, 273–285.
- Capelle M, Aubert S** (2019) Évaluation de la maturité de la prune d'Ente par Spectroscopie proche infrarouge – 20èmes Rencontres HélioSPIR 2019 – Montpellier, France.
- Cardemil L, Reinero A** (1982) Changes of *Araucaria araucana* seed reserves during germination and early seedling growth. *Can. J. Bot.* **60**, 1629–1638.
- Casimiro-Soriguer C S, Muñoz-Mérida A, Pérez-Pulido A J** (2017) Sma3s: A universal tool for easy functional annotation of proteomes and transcriptomes. *PROTEOMICS* **17**(12), 1700071.
- Castander-Olarieta A, Montalbán I A, Moncaleán P** (2023) Multi-strategy approach towards optimization of maturation and germination in radiata pine somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **153**, 173–190.
- Castander-Olarieta A, Pereira C, Montalbán I A, Mendes V M, Correia S, Suárez-Álvarez S, Manadas B, Canhoto J, Moncaleán P** (2021) Proteome-wide analysis of heat-stress in *Pinus radiata* somatic embryos reveals a combined response of sugar metabolism and translational regulation mechanisms. *Front. Plant Sci.* **12**, 631239.
- Chalupa V** (1985) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured

- immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) Kaerst. Commun. Inst. For. Cech. 14, 57–63.
- Chandra J, Keshavkant S** (2018) Desiccation-induced ROS accumulation and lipid catabolism in recalcitrant *Madhuca latifolia* seeds. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 24(1), 75-87.
- Chapman K D, Dyer J M, Mullen R T** (2012) Biogenesis and functions of lipid droplets in plants: Thematic Review Series: Lipid Droplet Synthesis and Metabolism: from Yeast to Man. *J. Lipid Res.* 53(2), 215-226.
- Chen P, Jung N U, Giarola V, Bartels D** (2020) **The dynamic responses of cell walls in resurrection plants during dehydration and rehydration.** *Front. Plant Sci.* 10:1698.
- Clark J S, Andrus R, Aubry-Kientz M et al.** (2021) Continent-wide tree fecundity driven by indirect climate effects. *Nat. Commun.* 12, 1242.
- Coelho C M M, Benedito V A** (2008) Seed development and reserve compound accumulation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Seed Sci. Biotechnol.* 2, 42-52.
- Cole T C H, Hilger H H, Stevens P** (2019) Angiosperm phylogeny poster (APP) – Flowering plant systematics, Peer J Preprints.
- Corbineau F** (2012) Markers of seed quality: from present to future. *Seed Sci. Res.* 22(S1), S61-S68.
- Corbineau F, Picard M A, Fougereaux J A, Ladonne F, Côme D** (2000) Effect of dehydration conditions on desiccation tolerance of developing pea seeds as related to oligosaccharide content and cell membrane properties. *Seed Sci. Res.* 10, 329–339.
- Cornu D, Geoffrion C** (1990) Aspects de l'embryogenèse somatique chez le mélèze, *Bulletin de la Société Botanique de France. Act. Bot.* 137(3-4), 25-34.
- Crawford A D, Plummer J A, Probert R J, Steadman K J** (2011) The influence of cone age on the relative longevity of *Banksia* seeds. *Ann. Bot.* 107(2), 303-309.
- Crouch M L** (1982) Non-zygotic embryos of *Brassica napus* L. contain embryo-specific storage proteins. *Planta* 156, 520-524.
- Crowe J H, Hoekstra F A, Crowe L M** (1992) Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 54, 579–599.
- Daklma W S, Zarrouk M, Cherif A** (1995) Effects of drought-stress on lipids in rape leaves. *Phytochem.* 40, 1383–1386.
- Daneshvar A, Tigabu M, Karimidoost A, Odén P C** (2015) Single seed near infrared spectroscopy discriminates viable and non-viable seeds of *Juniperus polycarpos*. *Silva Fenn.* 49(5), 1334.
- Devic M, Roscoe T** (2016) Seed maturation: simplification of control networks in plants. *Plant Sci.* 252, 335–346.
- Dinakar C, Bartels D** (2013) Desiccation tolerance in resurrection plants: new insights from transcriptome, proteome and metabolome analysis. *Front. Plant Sci.* 4, 482.
- Dogra P D** (1978). Morphology, development and nomenclature of conifer embryo. *Phytomorphology.* 28(3), 307–322.
- Dos Santos A L W, Wiethölter N, El Gueddari N E, Moerschbacher B M** (2006) Protein expression during seed development in *Araucaria angustifolia*: transient accumulation of class IV chitinases and arabinogalactan proteins. *Physiol. Plant.* 127, 138-148.
- Dray S, Dufour A B** (2007) The ade4 Package: Implementing the Duality Diagram for Ecologists. *J. Stat. Softw.* 22(4), 1-20.

- Dreyer A, Dietz K J** (2018) Reactive oxygen species and the redox-regulatory network in cold stress acclimation. *Antioxidants* 7(11), 169.
- Dronne S, Label P, Lelu M A** (1997) Desiccation decreases abscisic acid content in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*) somatic embryos. *Physiol. Plant.* 99(3), 433-438.
- Ducos J P, Lambot C, Pétiard V** (2007) Bioreactors for coffee mass propagation by somatic embryogenesis. *Int. J. Plant Dev. Biol.* 1(1), 1-12.
- Dumont-BéBoux N, Mazari A, Livingston N J, von Aderkas P, Becwar M R, Percy R E, Pond S E** (1996), **Water relations parameters and tissue development in somatic and zygotic embryos of three pinaceous conifers.** *Am. J. Bot.* 83, 992-996.
- Egertsdotter U** (2019) Plant physiological and genetical aspects of the somatic embryogenesis process in conifers. *Scand. J. For. Res.* 34(5), 360-369.
- Egertsdotter U, Ahmad I, Clapham D** (2019) Automation and scale up of somatic embryogenesis for commercial plant production, with emphasis on conifers. *Front. Plant Sci.* 18, 10-109.
- Elango D, Rajendran K, Van der Laan L, Sebastiar S, Raigne J, Thaiparambil N A, El Haddad N, Raja B, Wang W, Ferela A, Chiteri K O, Thudi M, Varshney R K, Chopra S, Singh A, Singh A K** (2022) Raffinose Family Oligosaccharides: Friend or Foe for Human and Plant Health? *Front. Plant Sci.* 13:829118.
- Eliášová K, Konrádová H, Dobrev P I, Motyka V, Lomenech A M, Fischerová L, Lelu-Walter M A, Vondráková Z, Teyssier C** (2022) Desiccation as a post-maturation treatment helps complete maturation of Norway spruce somatic embryos: carbohydrates, phytohormones and proteomic status. *Front. Plant Sci.* 13, 823617.
- Eliášová K, Vondráková Z, Malbeck J, Trávníčková A, Pešek B, Vágner M, Cvikrová M** (2017) Histological and biochemical response of Norway spruce somatic embryos to UV-B irradiation. *Trees* 31, 1279-1293.
- El-Maarouf-Bouteau H** (2022) The seed and the metabolism regulation. *Biology* (Basel). 11(2), 168.
- ElSayed A I, Rafudeen M S, Gollack D** (2014) Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: protection against abiotic stress. *Plant Biol.* (Stuttgart) 16(1), 1-8.
- Engel J, Gerretzen J, Szymańska E, Jansen J J, Downey G, Blanchet L, Buydens L M C** (2013) Breaking with trends in pre-processing? *Trends Anal. Chem.* 50, 96-106.
- Etienne H, Bertrand B, Montagnon C, Bobadilla Landey R, Dechamp E, Jourdan I, Alpizar E, Malo E, Georget F** (2012) Un exemple de transfert de technologie réussi dans le domaine de la micropropagation: la multiplication de *Coffea arabica* par embryogenèse somatique. *Cah. Agric.* 21, 115–124.
- Farhadi M, Tigabu M, Odén P C** (2015) Near infrared spectroscopy as non-destructive method for sorting viable, petrified and empty seeds of *Larix sibirica*. *Silva Fenn.* 49(5), 1340.
- Farhadi M, Tigabu M, Pietrzykowski M, Danusevičius D, Odén P C** (2017) Application of near infrared spectroscopy for authentication of *Picea abies* seed provenance. *New For.* 48, 629-642.
- Farhadi M, Tigabu M, Stener L G, Odén P C** (2016) Feasibility of visible + near infrared spectroscopy for non-destructive verification of European x Japanese larch hybrid seeds. *New For.* 47(2), 271–285.
- Fassio A S, Restaino E A, Cozzolino D** (2015) Determination of oil content in whole

- corn (*Zea mays* L.) seeds by means of near infrared reflectance spectroscopy. *Comput. Electron. Agric.* 110, 171-175.
- Feder M E, Hofmann G E** (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61(1), 243-282.
- Feng J, Shen Y, Shi F, Li C** (2017) Changes in seed germination ability, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Ginkgo biloba* seed during desiccation. *Forests* 8(8),286.
- Fereir R P, Conkey J H, Verhagen S A** (1989) Triglycérides in embryogenic conifer calli: a comparison with zygotic embryos. *Plant Cell Rep.* 8, 207-209.
- Ferreira DS, Galão O F, Pallone J A L, Poppi R J** (2014) Comparison and application of near-infrared (NIR) and mid-infrared (MIR) spectroscopy for determination of quality parameters in soybean samples. *Food Control* 35(1), 227-232.
- Filonova L H, Bozhkov P V, Brukhin V B, Daniel G, Zhivotovsky B, von Arnold S** (2000) Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. *J. Cell Sci.* 24, 4399–4411.
- Finch-Savage W E** (2003) Seed development | Onset of desiccation tolerance dans: Thomas B (Ed.) *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. Elsevier, Oxford, 1279–1284.
- Finch-Savage W E, Leubner-Metzger G** (2006) Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.* 171(3), 501-523.
- Find J I** (1997) Changes in endogenous ABA levels in developing somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in relation to maturation medium, desiccation and germination. *Plant Sci.* 128, 75–83
- Find J, Grace L, Krogstrup P** (2002) Effect of anti-auxins on maturation of embryogenesis tissue cultures of Nordmanns fir (*Abies nordmanniana*). *Physiol. Plant.* 116, 231-237.
- Finkelstein R R, Gampala S S L, Rock C D** (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14(SUPPL.), S15-S45.
- Fischerová L, Gemperlová L, Cvikrová M, Matušíková I, Moravčíková J, Gerši Z, Malbeck J, Kuderna J, Pavlíčková J, Motyka V, Eliášová K, Vondráková Z** (2022) The humidity level matters during the desiccation of Norway spruce somatic embryos. *Front. Plant Sci.* 13, 968982.
- Flinn B S, Roberts D R, Newton C H, Cyr D R, Webster F B, Taylor I E P** (1993) Storage protein gene expression in zygotic and somatic embryos of interior spruce. *Physiol. Plant.* 89, 719–730.
- Font R, Del Río-Celestino M, De Haro-Bailón A** (2006) The use of near-infrared spectroscopy (NIRS) in the study of seed quality components in plant breeding programs. *Ind Crop Prod* 24(3), 307-313.
- Fujiwara T, Nambara E, Yamagishi K, Goto D B, Naito S** (2002) Storage proteins. *Arabidopsis Book* 1, e0020.
- Gaspar T, Kevers C, Franck T, Bisbis B, Billard J P, Huault C, Le Dily F, Petit-Paly G, Rideau M, Penel C, Crèvecoeur M, Greppin H** (1995) Paradoxical results in the analysis of hyperhydric tissues considered as being under stress: questions for a debate. *Bulg. J. Plant Physiol.* 21, 80-97.
- Gautier F, Eliášová K, Leplé J C, Vondráková Z, Lomenech A M, Le Metté C, Label P, Costa G, Trontin J F, Teyssier C, Lelu-Walter M A** (2018) Repetitive somatic embryogenesis induced cytological and proteomic changes in embryogenic lines of *Pseudotsuga menziesii* [Mirb.]. *BMC Plant Biol.* 18(1), 164-



188.

- Gautier F, Label P, Eliášová K, Leplé J C, Motyka V, Boizot N, Vondráková Z, Malbeck J, Trávníčková A, le Metté C, Lesage-Descauses M C, Lomenech A M, Trontin J F, Costa G, Lelu-Walter M A, Teyssier C** (2019) Cytological, biochemical and molecular events of the embryogenic state in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* [Mirb.]). *Front. Plant Sci.* 2019, 10, 118.
- Georget F, Courtel P, Garcia E M, Hidalgo M, Alpizar E, Breitler J C, Bertrand B, Etienne H** (2017) Somatic embryogenesis-derived coffee plantlets can be efficiently propagated by horticultural rooted mini-cuttings: a boost for somatic embryogenesis. *Sci. Hortic.* 216, 177–185.
- Ghaffaripour S, Bilcke N V D, Samson R** (2017) The importance of seed reserve on performance and breeding of tamarind seedlings. *Sci. Hortic.* 222, 145 – 152.
- Gibson S I** (2005) Control of plant development and gene expression by sugar signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8(1), 93-102.
- Gigon A, Matos A R, Laffray D, Zuily-Fodil Y, Pham-Thi A T** (2004) Effect of drought stress on lipid metabolism in the leaves of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia). *Ann. Bot.* 94, 345-351.
- Gill S S, Tuteja N** (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 909–930.
- González-Morales S I, Chávez-Montes R A, Hayano-Kanashiro C, Alejo-Jacuinde G, Rico-Cambron T Y, de Folter S, Herrera-Estrella L** (2016) Regulatory network analysis reveals novel regulators of seed desiccation tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113(35), 5232–5241.
- Gordon G A** (2011) Application of Fourier transform mid-infrared spectroscopy (FTIR) for research into biomass feed-stocks. In: Goran N (ed) *Fourier Transforms*. IntechOpen, Rijeka, p Ch. 4.
- Gorian F, Pasquini S, Daws M I** (2007) Seed size and chilling affect germination of *Larix decidua* Mill. seeds. *Seed Sci. Technol.* 35, 508–513.
- Gösslová M, Svobodová H, Lipavská H, Albrechtová J, Vreugdenhil D** (2001) Comparing carbohydrate status during norway spruce seed development and somatic embryo formation. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 37(1), 24-28.
- Graça J** (2015) Suberin: the biopolyester at the frontier of plants. *Front Chem.* 30, 3-62.
- Graham I A** (2008) Seed Storage Oil Mobilization. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59(1), 115-142.
- Grigová M, Kubeš M, Drážná N, Řezanka T, Lipavská H** (2007) Storage lipid dynamics in somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*): histochemical and quantitative analyses. *Tree Physiol.* 27(11), 1533-1540.
- Grossnickle S C, Folk R S** (2007) Field performance potential of a somatic interior spruce seedlot. *New For.* 34(1), 51–72.
- Grossnickle S C, Major J E, Folk R S** (1994a) Interior spruce seedlings compared to emblings produced from somatic embryogenesis. (I) Nursery development, fall acclimation and over-winter storage. *Can. J. For. Res.* 24(7), 1376–1384.
- Grossnickle S C, Major J E, Folk R S** (1994c) Interior spruce seedlings compared to emblings produced from somatic embryogenesis. (III) Physiological response and morphological development on a reforestation site. *Can. J. For. Res.* 24(7), 1397–1407.
- Grunvald A K, Carvalho C G P D, Leite R S, Mandarino J M G, Andrade C A D B, Scapim C A** (2014) Predicting the oil contents in sunflower genotype seeds using near-infrared reflectance (NIR) spectroscopy. *Acta Sci. Agron.* 36(2), 233.

- Gurr M I** (1980) The Biosynthesis of Triacylglycerols dans: Stumpf P K (Ed.) Lipids: structure and function. Academic Press, 205–248.
- Gutmann M, von Aderkas P, Label P, Lelu M.-A** (1996) Effects of abscisic acid on somatic embryo maturation of hybrid larch. *J. Exp. Bot.* 47, 1905–1917.
- Hacisalihoglu G, Freeman J, Armstrong P R, Seabourn B W, Porter L D, Settles A M, Gustin J L** (2020) Protein, weight, and oil prediction by single-seed near-infrared spectroscopy for selection of seed quality and yield traits in pea (*Pisum sativum*). *J. Sci. Food Agric.* 100(8), 3488-3497.
- Hacket-Pain A, Bogdziewicz M** (2021) Climate change and plant reproduction: trends and drivers of mast seeding change. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 376(1839), 20200379.
- Häggman H, Jokela A, Krajnakova J, Kauppi A, Niemi K, Aronen T** (1999) Somatic embryogenesis of Scots pine: cold treatment and characteristics of explants affecting induction. *J. Exp. Bot.* 50(341), 1769-1778.
- Hakman I** (1993) Embryology in Norway spruce (*Picea abies*). An analysis of the composition of seed storage proteins and deposition of storage reserves during seed development and somatic embryogenesis. *Physiol. Plant.* 87(2), 148-159.
- Hakman I, Fowke L C, Von Arnold S, Eriksson T** (1985) The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). *Plant Sci.* 38, 53–59.
- Hakman I, Stabel P, Engström P, Eriksson T** (1990) Storage protein accumulation during zygotic and somatic embryo development in *Picea abies* (Norway spruce). *Physiol. Plant.* 80, 441–445.
- Hampton J G** (2002) What is seed quality. *Seed Sci. Technol.* 30, 1-10.
- Harry I S, Thorpe T A** (1991) Somatic embryogenesis and plant regeneration from mature zygotic embryos of red spruce. *Bot. Gaz.* 152(4), 446–452.
- Hartmann H, Trumbore S** (2016) Understanding the roles of nonstructural carbohydrates in forest trees – from what we can measure to what we want to know. *New Phytol.* 211(2), 386-403.
- Hayashi K I, Arai K, Aoi Y, Tanaka Y, Hira H, Guo R, Hu Y, Ge C, Zhao Y, Kasahara H, Fukui K** (2021) The main oxidative inactivation pathway of the plant hormone auxin. *Nature Communications* 12(1), 6752.
- Hazarika B N** (2006) Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Sci. Hortic.* 108, 105-120.
- Hazubska-Przybył T, Wawrzyniak M, Obarska A, Bojarczuk K** (2014) Effect of partial drying and desiccation on somatic seedling quality in Norway and Serbian spruce. *Acta Physiol. Plant.* 37, 1735.
- He F, Pan Q H, Shi Y, Duan C Q** (2008) Biosynthesis and genetic regulation of proanthocyanidins in plants. *Mol.* 13(10), 2674-703.
- Hell A F, Kretschmar F S, Simões K, Heyer A G, Barbedo C J, Braga M Rn Centeno D C** (2019) Metabolic changes on the acquisition of desiccation tolerance in seeds of the Brazilian native tree *Erythrina speciosa*. *Front. Plant Sci.* 10, 1356.
- Henry A, Flood M G** (1919) The history of the dunkeld hybrid larch, *Larix eurolepis*, with notes on other hybrid conifers. *Proceedings of the Royal Irish Academy. Section B: Biological, Geological, and Chemical Science* 35, 55–66.
- Heraud P, Caine S, Sanson G, Gleadow R, Wood B R, McNaughton D** (2007) Focal plane array infrared imaging: a new way to analyse leaf tissue. *New Phytol.* 173(1), 216-225.
- Hilhorst H, Finch-Savage W, Buitink J, Bolingue W, Leubner-Metzger G** (2010)

- Dormancy in plant seeds dormancy and resistance in harsh environments, in: Lubzens E, Cerda J, Clark M (Eds.), Springer Berlin / Heidelberg, pp. 43-67.
- Hoekstra F A, Golovina E A, Buitink J** (2001a) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci.* 6, 431–438.
- Hoekstra F A, Golovina E A, Tetteroo F A, Wolkers W F** (2001b) Induction of desiccation tolerance in plant somatic embryos: how exclusive is the protective role of sugars? *Cryobiol.* 43(2), 140-150.
- Hogberg K A, Bozhkov P V, Gronroos R, von Arnold S** (2001) Critical factors affecting ex vitro performance of somatic embryo plants of *Picea abies*. *Scand. J. For. Res.* 16, 295-304.
- Högberg K A, Ekberg I, Norell L, von Arnold S** (1998) Integration of somatic embryogenesis in a tree breeding programme: a case study with *Picea abies*. *Can J For Res* 28:1536–1545.
- Högberg K, Bozhkov P V, von Arnold S** (2003) Early selection improves clonal performance and reduces intraclonal variation of Norway spruce plants propagated by somatic embryogenesis. *Tree Physiol.* 23, 211–216.
- Holloway D M, Brook B, Kang J, Wong C, Wu M** (2016) A quantitative study of cotyledon positioning in conifer development. *Bot.* 94, 1063–1074.
- Horbowicz M, Obendorf R** (1994) Seed desiccation tolerance and storability: Dependence on flatulence-producing oligosaccharides and cyclitols—review and survey. *Seed Sci. Res.* 4(4), 385-405.
- Huang H, Møller I M, Song S Q** (2012) Proteomics of desiccation tolerance during maize embryos. *J. Proteomics* 86, 1-15.
- Huck-Pezzei V A, Pallua J D, Pezzei C, Bittner L K, Schönbichler S A, Abel G, Popp M, Bonn G K, Huck C W** (2012) Fourier transform infrared imaging analysis in discrimination studies of St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *Anal. Bio. Chem.* 404(6-7), 1771-1778.
- Hudec L, Konrádová H, Hašková A, Lipavská H** (2016) Norway spruce embryogenesis: changes in carbohydrate profile, structural development and response to polyethylene glycol. *Tree Physiol.* 36(5), 548-561.
- Ifmalinda, Andasuryani, Santosa, Putri I** (2021) The application of NIRS method for non-destructive measurement of fat and carbohydrates in pumpkin seeds. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, Vol 922.
- Iraqi D, Tremblay F M** (2001) Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugars and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development. *J. Exp. Bot.* 52(365), 2301-2311.
- Janeiro L V, Ballester A, Viéitez M, Ana M** (1995) Effect of cold storage on somatic embryogenesis systems of *Camellia*. *J. Hortic. Sci.* 70(4), 665-672.
- Jasinski S, Lécureuil A, Durandet M, Bernard-Moulin P, Guerche P** (2016) Arabidopsis Seed Content QTL Mapping Using High-Throughput Phenotyping: The Assets of Near Infrared Spectroscopy. *Front. Plant Sci.* 7, 1682.
- Jayasankar S, Van Aman M, Cordts J, Dhekney S, Li Z T, Gray J** (2005) **Low temperature storage of suspension culture-derived grapevine somatic embryos and regeneration of plants. In vitro Cell. Dev. Biol. – Plant** 41, 752-756.
- Jin B, Xie Y, Lu Y, Wang D, Zhang M, Wang L** (2012) Starch granule and protein accumulation during seed development of *Ginkgo biloba* L. *Int. Sch. Res. notices* 2012, 653796.
- Jing D, Zhang J, Xia Y, Kong L, OuYang F, Zhang S, Zhang H, Wang J** (2017)

- Proteomic analysis of stress-related proteins and metabolic pathways in *Picea asperata* somatic embryos during partial desiccation. *Plant Biotechnol. J.* 15(1), 27–38.
- Jolliffe N A, Craddock C P, Frigerio L** (2005) Pathways for protein transport to seed storage vacuoles. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 1016.
- Joy IV R W, Yeung E C, Kong L, Thorpe T A** (1991) Development of white spruce somatic embryos: I. Storage product deposition. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 27(1), 32-41.
- Juarez-Escobar J, Bojórquez-Velázquez E, Elizalde-Contreras J M, Guerrero-Analco J A, Loyola-Vargas V M, Mata-Rosas M, Ruiz-May E** (2021) Current Proteomic and Metabolomic Knowledge of Zygotic and Somatic Embryogenesis in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 11807.
- Kagaya Y, Okuda R, Ban A, Toyoshima R, Tsutsumida K, Usui H, Yamamoto A, Hattori T** (2005) Indirect ABA-dependent regulation of seed storage protein genes by FUSCA3 transcription factor in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physio.* 46(2), 300-311.
- Kalemba E M, Janowiak F, Pukacka S** (2009) Desiccation tolerance acquisition in developing beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds: The contribution of dehydrin-like protein. *Trees – Struct. Funct.* 23(2), 305-315.
- Kalemba E M, Pukacka S** (2007) Possible roles of LEA proteins and sHSPs in seed protection: a short review. *Biol. Lett.* 44(1), 3–16.
- Keller F, Ludlow M M** (1993) Carbohydrate metabolism in drought-stressed leaves of pigeonpea (*Cajanus cajan*). *Exp. Bot.* 44(8), 1351-1359.
- Keller I, Müdsam C, Martins Rodrigues C, Kischka D, Zierer W, Sonnewald U, Harms K, Czarnecki O, Fiedler-Wiechers K, Koch W, Neuhaus H E, Ludewig F, Pommerrenig B** (2021) Cold-triggered induction of ROS- and raffinose metabolism in freezing-sensitive taproot tissue of sugar beet. *Front. Plant Sci.* 12, 715767.
- Kermode A R** (2011) Plant storage products (carbohydrates, oils and proteins). In: John Wiley & Sons L (ed) eLS, 1 Edn. Wiley, 1-20.
- Kermode A R, Finch-Savage B E** (2002) Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. *CABI Books* 149–184.
- Kevers C, Franck T, Strasser R J, Dommes S, Gaspar T** (2004) Hyperhydricity of micropropagated shoots: A typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 77, 181-191.
- Kijak H, Ratajczak E** (2020) What do we know about the genetic basis of seed desiccation tolerance and longevity? *Int. J. Mol. Sci.* 21, 3612.
- Kim Y W** (2015) Initiation of embryogenic callus from mature zygotic embryos in Japanese larch (*Larix kaempferi*). *J. Plant Biotechnol.* 42, 223-227.
- Kim Y W, Youn Y, Noh E R, Kim J C** (1998) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of Japanese larch (*Larix leptolepis*). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 55, 95-101.
- King J E, Gifford D J** (1997) Amino acid utilization in seeds of loblolly pine during germination and early seedling growth (I. arginine and arginase activity). *Plant Physiol.* 113(4), 1125-1135.
- Klimaszewska K** (1989) Plantlet development from immature zygotic embryos of hybrid larch through somatic embryogenesis. *Plant Sci.* 63, 95–103.
- Klimaszewska K, Bernier-Cardou M, Cyr D R, Sutton B C S** (2000) Influence of gelling agents on culture medium gel strength, water availability, tissue water potential, and maturation response in embryogenic cultures of *Pinus strobus* L.

- In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant 36, 279-286.
- Klimaszewska K, Devantier Y, Lachance D, Lelu M A, Charest P J** (1997) *Larix laricina* (tamarack): somatic embryogenesis and genetic transformation. Can. J. For. Res. 27(4): 538-550.
- Klimaszewska K, Hargreaves C, Lelu-Walter M A, Trontin J F** (2016) Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000. Dans: In vitro embryogenesis in Higher plants, Chap. 7, Germanà MA, Lambardi M (éds), Methods in Molecular.
- Klimaszewska K, Morency F, Jones-Overton C, Cooke J** (2004) Accumulation pattern and identification of seed storage proteins in zygotic embryos of *Pinus strobus* and in somatic embryos from different maturation treatments. Physiol. Plant. 121(4), 682-690.
- Klimaszewska K, Smith D R** (1997) Maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* is promoted by a high concentration of gellan gum. Physiol. Plant. 100(4), 949-957.
- Klimaszewska K, Ward C, Cheliak W M** (1992) Cryopreservation and plant regeneration from embryogenic cultures of larch (*Larix X eurolepis*) and black spruce (*Picea mariana*). J. Exp. Bot. 43(246), 73-79.
- Kong L, Yeung E C** (1992) Development of white spruce somatic embryos: II. Continual shoot meristem development during germination. In Vitro Cell. Dev. Biol. 28(3), 125-131.
- Konrádová H, Gricová M, Lipavská H** (2003) Cold-induced accumulation of raffinose oligosaccharides in somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*). In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant 39, 425-427.
- Koobaz P, Reza Ghaffari M, Heidari M, Mirzaei M, Ghanati F, Amirkhani A, Mortazavi SE, Moradi F, Hajirezaei M R, Salekdeh G H** (2020) Proteomic and metabolomic analysis of desiccation tolerance in wheat young seedlings. Plant Physiol. Biochem. 146, 349-362.
- Koornneef M, Bentsink L, Hilhorst H** (2002) Seed dormancy and germination. Curr. Opin. Plant Biol. 5(1), 33-36.
- Kosiński G** (1987) Empty seed production in European larch (*Larix decidua*). For. Ecol. Manag. 19, 241–246.
- Koski V** (1991) Generative reproduction and genetic processes in nature dans: Developments in Plant Genetics and Breeding. Elsevier, 59–72.
- Koster K L, Leopold A C** (1988) Sugars and desiccation tolerance in seeds. Plant Physiol. 88, 829–832.
- Krajňáková J, Häggman H** (2009) Effect of sucrose concentration, polyethylene glycol and activated charcoal on maturation and regeneration of *Abies cephalonica* somatic embryos. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 96, 251-262.
- Krasowski M J, Owens J N** (1993) Ultrastructural and histochemical postfertilization megagametophyte and zygotic embryo development of white spruce (*Picea glauca*) emphasizing the deposition of seed storage products. Can. J. Bot. 71, 98–112.
- Kremer A** (1986) Méthodes et stratégies de sélection. Rev. For. Fr. 38, 89–101.
- Kumar S** (2013) Fourier transform-near infrared reflectance spectroscopy calibration development for screening of oil content of intact safflower seeds. Int. Food Res. J. 20, 759-762.
- Kuo T M, Lowell C A, Nelsen T C** (1997) Occurrence of pinitol in developing soybean seed tissues. Phytochem. 45(1), 29-35.
- Kurauchi T, Kasai A, Tougou M, Senda M** (2011) Endogenous RNA interference of

- chalcone synthase genes in soybean: formation of double-stranded RNA of GmIRCHS transcripts and structure of the 5' and 3' ends of short interfering RNAs. *J. Plant Physiol.* 168, 1264-1270.
- Kuzmin D A, Feranchuk S I, Sharov V V, Cybin A N, Makolov S V, Putintseva Y A, Oreshkova N V, Krutovsky K V** (2019) Stepwise large genome assembly approach: a case of Siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb). *BMC Bioinform.* 20(1), 37.
- Label P, Lelu M A** (2000) Exogenous abscisic acid fate during maturation of hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*) somatic embryos. *Physiol. Plant.* 109(4), 456-462.
- Lallemant J, Roussel S, Rashidi S, Capelle M** (2015) Evaluation of Ente plum maturity by infrared spectroscopy – 17th International Conference on Near Infrared Spectroscopy (NIR 2015) – Foz do Iguassu, Brazil.
- Le K C, Dedicova B, Johansson S, Lelu-Walter M A, Egertsdotter U** (2021) Temporary immersion bioreactor system for propagation by somatic embryogenesis of hybrid larch (*Larix x eurolepis* Henry). *Biotechnol. Rep.* 32, e00684.
- Leadem C** (1996) A guide to the biology and use of forest tree seeds. Province of British Columbia, Ministry of Forests Research Program, Victoria, British Columbia.
- Lebourgeois F, Rathgeber C B K, Ulrich E** (2010) Sensitivity of French temperate coniferous forests to climate variability and extreme events (*Abies alba*, *Picea abies* and *Pinus sylvestris*). *J. Veg. Sci.* 21, 364-376
- Lecouteux C, Tessereau H, Florin B, Courtois D, Petiard V** (1992) Preservation of carrot (*Daucus carota* L.) somatic embryos by dehydration after pretreatment with sucrose. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 314(III), 423-428.
- Lefebvre M, Villar M, Boizot N, Delile A, Dimouro B, Lomenech A M, Teyssier C** (2022) Variability in seeds' physicochemical characteristics, germination and seedling growth within and between two French *Populus nigra* L. populations. *Peer Community Journal* 2(e10).
- Lelu M A, Bastien C, Klimaszewska K, Ward C, Charest P J** (1994a) An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*): Part 1. Somatic embryo maturation. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 36, 107–115.
- Lelu M A, Bastien C, Klimaszewska K, Ward C, Charest P J** (1994b) An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*): Part 2. Control of germination and plantlet development. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 36, 117–127.
- Lelu M A, Bastien C, Klimaszewska K, Ward C, Charest P J** (1994c) Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos and from cotyledons and needles of somatic plantlets of *Larix*. *Can. J. For. Res.* 20, 100–106.
- Lelu M A, Klimaszewska K, Pflaum G, Bastien C** (1995) Effect of maturation duration on desiccation tolerance in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea* Dengler). *In Vitro Cell Dev. Biol.* 31, 15–20.
- Lelu M A, Klimaszewska K, Pflaum G, Bastien C** (1995) Effect of maturation duration on desiccation tolerance in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea* dengler) somatic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 31, 15-20.
- Lelu M A, Label P** (1994) Changes in the levels of abscisic acid and its glucose ester conjugate during maturation of hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*) somatic embryos, in relation to germination and plantlet recovery. *Physiol. Plant.* 92, 53-60.

- Lelu-Walter M A, Bernier-Cardou M, Klimaszewska K** (2008) Clonal plant production from self- and cross-pollinated seed families of *Pinus sylvestris* (L.) through somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 92, 31–45.
- Lelu-Walter M A, Pâques L E** (2009) Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix x* and *Larix x marschlinii*). *Perspectives for breeding. Ann. For. Sci.* 66, 104.
- Lelu-Walter M A, Teyssier C, Guérin V, Pâques L** (2016) Vegetative propagation of larch species: somatic embryogenesis improvement towards its integration in breeding programs. In: Park Y S B J, Moon H K (ed) *Vegetative Propagation of Forest Trees*. National Institute of Forest Science (NIFoS), Seoul, Korea, pp 551-571.
- Lelu-Walter M A, Thompson D, Harvengt L, Sanchez L, Toribio M, Pâques L E** (2013) Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction. *Tree Genet. Genomes* 9, 883-899.
- Lelu-Walter M A, Thompson D, Harvengt L, Sanchez L, Toribio M, Pâques L E** (2013) Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction. *Tree Genet. Genomes* 9, 883-899.
- Leopold A C, Sun W Q, Bernal-Lugo I** (1994) The glassy state in seeds: analysis and function. *Seed Sci. Res.* 4, 267–274.
- Leprince O, Bronchart R, Deltour R** (1990) Changes in starch and soluble sugars in relation to the acquisition of desiccation tolerance during maturation of *Brassica campestris* seed. *Plant Cell Environ.* 13, 539-546.
- Leprince O, Buitink J** (2010) Desiccation tolerance: From genomics to the field. *Plant Sci.* 179(6), 554-564.
- Leprince O, Hendry G A F, McKersie B D** (1993) The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Sci. Res.* 3(4), 231-246.
- Leprince O, Pellizzaro A, Berriri S, Buitink J** (2017) Late seed maturation: drying without dying. *J. Exp. Bot.* 68, 827–841.
- Lesnoff M** (2021) R package rchemo: Dimension reduction, regression and discrimination for chemometrics. <https://github.com/mlesnoff/rchemo>. CIRAD, UMR SELMET, Montpellier, France.
- Lesnoff M, Metz M, Roger J M** (2020) Comparison of locally weighted PLS strategies for regression and discrimination on agronomic NIR data. *J. Chem.* 34, e3209.
- Lestander T A, Geladi P** (2003) NIR spectroscopic measurement of moisture content in Scots pine seeds. *The Analyst* 128(4), 389-396.
- Lestander T A, Geladi P** (2005) NIR spectral information used to predict water content of pine seeds from multivariate calibration. *Can. J. For. Res.* 35(5), 1139-1148.
- Li J, Feng B, Yu P, Fu W, Wang W, Lin J, Qin Y, Li H, Chen T, Xu C, Tao L, Wu Z, Fu G** (2022) Oligomeric proanthocyanidins confer cold tolerance in rice through maintaining energy homeostasis. *Antioxidants* 12(1), 79.
- Ling J, Hu J, Wang J, An S, Wang L, Xu N, Zhu T** (2023) Effects of desiccation on anatomical structure of somatic embryo and expression of cell wall remodeling gene of *Picea asperata*. *For. Res.* doi: 10.12403/j.1001-1498.20230157.
- Ling J, Xia Y, Hu J, Zhu T, Wang J, Zhang H, Kong L** (2022) Integrated lipidomic and transcriptomic analysis reveals phospholipid changes in somatic embryos of *Picea asperata* in response to partial desiccation. *Int. J. Mol. Sci.* 23(12), 6494.
- Linkies A, Graeber K, Knight C, Leubner-Metzger G** (2010) The evolution of seeds. *New Phytol.* 186, 817–831.
- Lipavská H, Konrádová H** (2004) Somatic embryogenesis in conifers: The role of

- carbohydrate metabolism. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 40(1), 23-30.
- Lipavská H, Svobodová H, Albrechtová J, Kumstýřová L, Vágner M, Vondráková Z** (2000) Carbohydrate status during somatic embryo maturation in norway spruce. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 36(4), 260-267.
- Liu Q, Luo L, Zheng L** (2018) Lignins: biosynthesis and biological functions in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 19(2), 335.
- Locher F, Heuwinkel H, Gutser R, Schmidhalter U** (2005) Development of near infrared reflectance spectroscopy calibrations to estimate legume content of multispecies legume-grass mixtures. *Agron. J.* 97(1), 11-17.
- Lubowicki R, Kotlarz A, Jaskowska I** (2005) Effect of cultivar and harvest year on the composition of yellow lupin seeds. *J. Anim. Feed Sci.* 14(Suppl. 1), 373-376.
- Luo X, Xu J, Zheng C, Yang Y, Wang L, Zhang R, Ren X, Wei S, Aziz U, Du J, Liu W, Tan W, Shu K** (2022) Abscisic acid inhibits primary root growth by impairing ABI4-mediated cell cycle and auxin biosynthesis. *Plant Physiol.* 191(1), 265-279.
- MacGillivray H** (1967) Hybrid between tamarack and japanese larch appears promising in south-central New Brunswick. Canada Department of Forestry and Rural Development, Forestry Branch Bimonthly Research Notes 23, 2–3.
- MacNeill G J, Mehrpouyan S, Minow M A A, Patterson J A, Tetlow I J, Emes M J** (2017) Starch as a source, starch as a sink: the bifunctional role of starch in carbon allocation. *J. Exp. Bot.* 68(16), 4433-4453.
- Maity A, Paul D, Lamichaney A, Sarkar A, Babbar N, Mandal N, Dutta S, Maity P P, Chakrabarty S K** (2023) Climate change impacts on seed production and quality: current knowledge, implications, and mitigation strategies. *Seed Sci. Technol.* 51(1):65-96.
- Marescal O, Cheeseman I M** (2020) Cellular mechanisms and regulation of quiescence. *Dev. Cell.* 55(3), 259-271.
- Martinez-Munoz M, Ayala-Garay O J, Aguilar-Rincon V H, Conde-Martinez V, Corona-Torres T** (2019) Seed quality and LEA-protein expression in relation to fruit maturation and post-harvest storage of two chilies types. *Horticult. J.* 88(2), 245-252.
- Maruyama T E, Hosoi Y** (2012) Post-maturation treatment improves and synchronizes somatic embryo germination of three species of Japanese pines. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 110, 45–52.
- Matilla A J** (2021) The orthodox dry seeds are alive: a clear example of desiccation tolerance. *Plants* 11(1), 20.
- Matthews S, Noli E, Demir I, Khajeh-Hosseini M, Wagner M H** (2012) Evaluation of seed quality: from physiology to international standardization. *Seed Sci. Res.* 22(S1), S69-S73.
- Mauri N, Fernández-Marcos M, Costas C, Desvoyes B, Pichel A, Caro E, Gutierrez C** (2016) GEM, a member of the GRAM domain family of proteins, is part of the ABA signaling pathway. *Sci. Rep.* 6(1), 22660.
- Meschine M** (1995) Conservation d'embryons somatiques de daucus carota L. deshydratés et étude du rôle des sucres et de l'ABA dans l'acquisition de la tolérance à la déshydratation. Thèse de doctorat de l'université de technologie de Compiègne.
- Mevik B H, Wehrens R** (2015) Introduction to the pls Package. R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 1–23.
- Mishra P, Biancolillo A, Roger J M, Marini F, Rutledge D N** (2020) New data preprocessing trends based on ensemble of multiple preprocessing techniques.



- Trends Anal. Chem. 132, 116045.
- Monja-Mio K M, Herrera-Alamillo M, Robert M L** (2016) Somatic embryogenesis in temporary immersion bioreactors. Dans MonjaMio K M, Herrera-Alamillo M Á, Robert M L (eds) Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications. Springer, Cham, 435–454.
- Morel A, Teyssier C, Trontin J F, Eliášová K, Pešek B, Beaufour M, Morabito D, Boizot N, le Metté C, Belal-Bessai L, Reymond I, Harvengt L, Cadene M, Corbineau F, Vágner M, Label P, Lelu-Walter M A** (2014a) Early molecular events involved in *Pinus pinaster* Ait. somatic embryo development under reduced water availability: Transcriptomic and proteomic analyses. *Physiol. Plant.* 152, 184–201.
- Morel A, Trontin J F, Corbineau F, Lomenech A M, Beaufour M, Reymond I, Le Metté C, Ader K, Harvengt L, Cadene M, Label P, Teyssier C, Lelu-Walter M A** (2014b) Cotyledonary somatic embryos of *Pinus pinaster* Ait. most closely resemble fresh, maturing cotyledonary zygotic embryos: biological, carbohydrate and proteomic analyses. *Planta* 240, 1075–1095.
- Morse M, Rafudeen M, Farrant J M** (2011) An overview of the current understanding of desiccation tolerance in the vegetative tissues of higher plants. *Adv. Bot. Res.* 57, 319–347.
- Müller K, Dobrev P I, Pěňčík A, Hošek P, Vondráková Z, Filepová R, Malínská K, Brunoni F, Helusová L, Moravec T, Retzer K, Harant K, Novák O, Hoyerová K, Petrášek J** (2021) DIOXYGENASE FOR AUXIN OXIDATION 1 catalyzes the oxidation of IAA amino acid conjugates. *Plant Physiol.* 187(1), 103-115.
- Munnik T, Testerink C** (2009) Plant phospholipid signaling: “in a nut-shell”. *J. Lipid Res.* 50(Supplement), 260–265.
- Munnik T, Vermeer J E M** (2010) Osmotic stress-induced phosphoinositide and inositolphosphate signalling in plants. *Plant Cell Environ.* 33, 655–669.
- Murphy D J** (1990) Storage lipid bodies in plants and other organisms. *Prog. Lipid Res.* 29, 299–324.
- Nasri N, Triki S** (2007) Les protéines de réserve du pin pignon (*Pinus pinea* L.). *Comptes Rendus Biologies* 330, 402–409.
- Navarro B V, Elbl P, De Souza A P, Jardim V, de Oliveira L F, Macedo A F, Dos Santos A L W, Buckeridge M S, Floh E I S** (2017) Carbohydrate-mediated responses during zygotic and early somatic embryogenesis in the endangered conifer, *Araucaria angustifolia*. *PLoS One.* 12(7), e0180051.
- Nielsen U B, Hansen C B, Hansen U, Johansen V K, Egertsdotter U** (2022) Accumulated effects of factors determining plant development from somatic embryos of *Abies nordmanniana* and *Abies bornmuelleriana*. *Front. Plant Sci.* 13, 989484.
- Niemenak N, Saare-Surminski K, Rohsius C, Omokolo Ndoumou D, Lieberei R** (2008) Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. *Plant Cell. Rep.* 27, 667–676.
- Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S** (2008) Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiol.* 147, 1251–1263.
- Nongdam P, Beleski D G, Tikendra L, Dey A, Varte V, EL Merzougui S, Pereira V M, Barros P R, Vendrame W A** (2023) Orchid micropropagation using conventional semi-solid and temporary immersion systems: A Review. *Plants* 12, 1136.

- Obendorf R L, Górecki R J** (2012). Soluble carbohydrates in legume seeds. *Seed Sci. Res.* 22, 219 - 242.
- Obendorf R L, Zimmerman A D, Zhang Q, Castillo A, Kosina S M, Bryant E G, Sensenig E M, Wu J, Schnebly S R** (2009) Accumulation of soluble carbohydrates during seed development and maturation of low-raffinose, low-stachyose soybean. *Crop Sci.* 49, 329–341.
- O'Brien T P, Feder N, McCully M E** (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59(2), 368-373.
- Oleksyn J** (1985) Scientific activity of Solomon Zakhariievich Kurdiani—one of the first investigators of heredity in trees. *Folia Dendrol.* 12, 349–368.
- Oliver A E, Leprince O, Wolkers W F, Hinch D K, Heyer A G, Crowe J H** (2001) Non-disaccharide-based mechanisms of protection during drying. *Cryobiol.* 43, 151–167.
- Oliver M J, Farrant J M, Hilhorst H W M, Mundree S, Williams B, Bewley J D** (2020) Desiccation tolerance: avoiding cellular damage during drying and rehydration. *Annu. Rev. Plant Biol.* 71, 435-460.
- Otsuka M** (2020) Near-infrared spectroscopy application to the pharmaceutical industry. In: Meyers RA (ed) *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Wiley, pp 1-15.
- Owens J N** (2008) The reproductive biology of western larch. Inland Empire Tree Improvement Cooperative, Victoria, B.C.
- Owens J N, Molder M** (1979) Sexual reproduction of *Larix occidentalis*. *Can. J. Bot.* 57, 2673–2690.
- Owens J N, Morris S J, Catalano G L** (1994) How the pollination mechanism and prezygotic and postzygotic events affect seed production in *Larix occidentalis*. *Can. J. For. Res.* 24, 917-927.
- Pancaningtyas S** (2013) Evaluation of quantity and hyperhydricity of cocoa somatic embryo obtained from solid culture, liquid culture, and sequence subculture. *Pelita Perkebunan* (a Coffee and Cocoa Research Journal), 29(1).
- Pâques L E** (1989) A critical review of larch hybridization and its incidence on breeding strategies. *Ann. For. Sci.* 46, 141–153.
- Pâques L E** (1992) Performance of vegetatively propagated *Larix decidua*, *L. kaempferi* and *L. laricina* hybrids. *Ann. For. Sci.* 49, 63–74.
- Pâques L E, Foffová E, Heinze B, Lelu-Walter M A, Liesebach M, Philippe G** (2013) Larches (*Larix* sp.) dans: Pâques L E (Ed.) *Forest Tree Breeding in Europe, Managing Forest Ecosystems*. Springer Netherlands, Dordrecht, 13–122.
- Park Y S** (2002) Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. *Ann. For. Sci.* 59, 651-656.
- Park Y S, Pond S E, Bonga J M** (1994) Somatic embryogenesis in white spruce (*Picea glauca*): genetic control in somatic embryos exposed to storage, maturation treatments, germination, and cryopreservation. *Theor. Appl. Genet.* 89, 742–750.
- Parwez R, Aftab T, Gill S S, Naeem M** (2022) Abscisic acid signaling and crosstalk with phytohormones in regulation of environmental stress responses. *Environ. Exp. Bot.* 104885.
- Pashkovskiy P P, Vankova R, Zlobin I E, Dobrev P, Kartashov A V, Ivanova A I, Ivanov V P, Marchenko S I, Nartov D I, Ivanov Y V, Kuznetsov V V** (2022) Hormonal responses to short-term and long-term water deficit in native Scots pine and Norway spruce trees. *Environ. Exp. Bot.* 195, 104789.

- Pérez S, Bertoft E** (2010) The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review. *Starch - Stärke* 62, 389–420.
- Pescador R, Kerbauy G B, dos Santos D Y A C, Dal Vesco L L, de Freitas Fraga H P, Guerra M P** (2012) Comparative study of reserve lipid accumulation during somatic and zygotic *Acca sellowiana* (O. Berg.) Burret embryogenesis. *Acta Physiol. Plant.* 34(2), 771-778.
- Phartyal S S, Thapliyal R C, Koedam N, Godefroid S** (2002) *Ex situ* conservation of rare and valuable forest tree species through seed-gene bank. *Curr. Sci.* 83(11), 1351-1357.
- Philippe G, Baldet P, Héois B, Ginisty C** (2006) Reproduction sexuée des conifères et production de semences en vergers à graines. Cemagref; Quæ, Paris, Versailles.
- Polivanova O B, Bedarev V A** (2022) Hyperhydricity in plant tissue culture. *Plants* 11, 3313.
- Poncet B N, Garat P, Manel S, Bru N, Sachet J M, Roques A, Depres L** (2009) The effect of climate on masting in the European larch and on its specific seed predators. *Oecologia* 159, 527–537.
- Pond S E, Von Aderkas P, Bonga J M** (2002) Improving tolerance of somatic embryos of *Picea glauca* to flash desiccation with a cold treatment (desiccation after cold acclimation). *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 38(4), 334-341.
- Prerostova S, Dobrev PI, Knirsch V, Jarosova J, Gaudinova A, Zupkova B, Prášil I T, Janda T, Brzobohatý B, Skalák J, Vankova R** (2021) Light Quality and Intensity Modulate Cold Acclimation in Arabidopsis. *Int. J. Mol. Sci.* 22(5), 2736.
- Prewein C, Vagner M, Wilhelm E** (2004) Changes in water status and proline and abscisic acid concentrations in developing somatic embryos of pedunculate oak (*Quercus robur*) during maturation and germination. *Tree Physiol.* 24(11), 1251-1257.
- Price J, Li T C, Kang S G, Na J K, Jang J C** (2003) Mechanisms of glucose signaling during germination of *Arabidopsis*. *Plant. Physiol.* 132(3), 1424-1438.
- Pucciariello C, Perata P** (2021) The oxidative paradox in low oxygen stress in plants. *Antioxidants* 10(2), 332.
- Pulkka S, Segura V, Harju A, Tapanila T, Tanner J, Pâques L E, Charpentier J P** (2016) Prediction of stilbene content from heartwood increment cores of scots pine using near infrared spectroscopy methodology. *J. Near Infrared Spectroscop.* 24(6), 517–528.
- Pulkka S, Segura V, Harju A, Tapanila T, Tanner J, Pâques L E, Charpentier J P**
- Pullman G S, Buchanan M** (2008) Identification and quantitative analysis of stage-specific carbohydrates in loblolly pine (*Pinus taeda*) zygotic embryo and female gametophyte tissues. *Tree Physiol.* 28(7), 985-996.
- Qi L W, Han Y F, Li L, Ewald D, Han S Y** (2000) The somatic embryogenesis and establishment of transformation experiment system in *Larix principis-Rupprechtii*. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao.* 33(4), 357-65.
- Qu J H, Liu D, Cheng J H, Sun D W, Ma J, Pu H, Zeng X A** (2015) Applications of near-infrared spectroscopy in food safety evaluation and control: a review of recent research advances. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 55(13), 1939-1954.
- Quartacci M F, Forli M, Dalla-Vecchia, F, Bochicchio A, Navari-Izzo F** (1997) Desiccation-tolerant *Sporobolus stapfianus*: lipid composition and cellular ultrastructure during dehydration and rehydration. *J. Exp. Bot.* 48, 1269–1279.
- Rahman A, Cho B K** (2016) Assessment of seed quality using non-destructive

- measurement techniques: a review. *Seed Sci. Res.* 26(4), 285-305.
- Rajani K, Ranjan R, Ranjan T, Kumar A** (2017) Global approaches for identification of markers of seed quality- a review. *Int. j. adv. agric. sci. technol.* 4(4), 29-43.
- Rajendra Prasad S** (2023) Testing seed for quality. In: Dadlani M, Yadava D K (eds) *Seed Science and Technology*. Springer Nature Singapore, Singapore, pp 299-334.
- Rajjou L, Duval M, Gallardo K, Catusse J, Bally J, Job C, Job D** (2012) Seed germination and vigor. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63(1), 507-533.
- Ramarosandratana A, Harvengt L, Bouvet A, Calvayrac R, Pâques M** (2001) Effects of carbohydrate source, polyethylene glycol and gellan gum concentration on embryonal-suspensor mass (ESM) proliferation and maturation of maritime pine somatic embryos. *In vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 37, 29-34.
- Ramos K M O, Matos J M M, Martins R C C, Martins I S** (2012) Electrical conductivity testing as applied to the assessment of freshly collected *Kielmeyera coriacea* Mart. seeds. *ISRN Agronomy* 2012, 378139.
- Reeves C, Tikkinen M, Aronen T, Krajnakova J** (2023) Application of cold storage and short *in vitro* germination for somatic embryos of *Pinus radiata* and *P. sylvestris*. *Plants (Basel)*. 12(11), 2095.
- Reinert J** (1959) Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventivembryonen an Gewebekulturen aus Karotten. *Planta* 53, 318–333.
- Riemann M, Dhakarey R, Hazman M, Miro B, Kohli A, Nick P** (2015) Exploring jasmonates in the hormonal network of drought and salinity responses. *Front. Plant Sci.* 6, 1077.
- Rinnan Å, Berg F V D, Engelsen S B** (2009) Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. *Trends Anal. Chem.* 28(10), 1201-1222.
- Roberts D R** (1991) Abscisic acid and mannitol promote early development, maturation and storage protein accumulation in somatic embryos of interior spruce. *Physiol. Plant.* 83, 247–254.
- Roberts D R, Sutton B C S, Flinn B S** (1990) Synchronous and high frequency germination of interior spruce somatic embryos following partial drying at high relative humidity. *Can. J. Bot.* 68, 1086–1090.
- Roberts J K, DeSimone N A, Lingle W L, Dure L** (1993) Cellular concentrations and uniformity of cell-type accumulation of two lea proteins in cotton embryos. *Plant Cell* 5, 769–780.
- Rodríguez-Gacio M C, Matilla-Vázquez M A, Matilla A J** (2009) Seed dormancy and ABA signaling: the breakthrough goes on. *Plant Signal. Behav.* 4(11), 1035-1049.
- Roger J M, Biancolillo A, Marini F** (2020) Sequential preprocessing through ORThogonalization (SPORT) and its application to near infrared spectroscopy. *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 199, 103975.
- Ruzin S E** (1999) *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford University Press, Inc., New York.
- Said C, Villar M, Zandonella P** (1991) Ovule receptivity and pollen viability in Japanese larch (*Larix leptolepis* Gord.). *Silvae Genet.* 40, 1–6.
- Sallandrouze A, Faurobert M, El Maataoui M, Espagnac H** (1999) Two-dimensional electrophoretic analysis of proteins associated with somatic embryogenesis development in *Cupressus sempervirens* L. *Electrophoresis.* 20(4-5), 1109-1119.

- Salvi P, Varshney V, Majee M** (2022) Raffinose family oligosaccharides (RFOs): role in seed vigor and longevity. *Biosci. Rep.* 42(10), BSR20220198.
- Saly S, Joseph C, Corbineau F, Lelu M A, Côme D** (2002) Induction of secondary somatic embryogenesis in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*) as related to ethylene. *Plant Growth Regul.* 37, 287–294.
- Sano N, Malabarba J, Chen Z, Gaillard S, Windels D, Verdier J** (2022) Chromatin dynamics associated with seed desiccation tolerance/sensitivity at early germination in *Medicago truncatula*. *Front. Plant Sci.* 13, 1059493.
- Sanyal R, Kumar S, Pattanayak A, Kar A, Bishi S K** (2023) Optimizing raffinose family oligosaccharides content in plants: A tightrope walk. *Front Plant Sci.* 14, 1134754.
- Savane P, Belmokhtar N, Delile A, Boizot N, Ridel C, Lelu-Walter M A, Teyssier C** (2023) Characterisation of hybrid larch somatic embryo maturation by biochemical analyses and by a novel, fast mid-infrared method. *Physiol. Plant.* 175(4), e13966.
- Sengupta S, Mukherjee S, Basak P, Majumder A L** (2015) Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants. *Front Plant Sci.* 6, 656.
- Sghaier-Hammami B, Hammami B M S, Baazaoui N, Gómez-Díaz C, Jorrín-Novo J V** (2020) Dissecting the seed maturation and germination processes in the non-orthodox *Quercus ilex* species based on protein signatures as revealed by 2-DE coupled to MALDI-TOF/TOF proteomics strategy. *Int. J. Mol. Sci.* 21(14), 4870.
- Shearer R C** (1989) Seed and pollen cone production in *Larix occidentalis*. In *Proc. Int. Workshop on Tropical Tree Seed Research*, Gympie, Qld, Australia, Aug. 21-24, 1989, J.W. Turnbull (ed), 14-17.
- Shi J, Zhen Y, Zheng R H** (2010) Proteome profiling of early seed development in *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook. *J. Exp. Bot.* 61, 2367–2381.
- Shmakov V N, Konstantinov Y M** (2020) Somatic embryogenesis in *Larix*: the state of art and perspectives. *Vavilovskii Zhurnal. Genet. Selektcii* 24, 575–588.
- Shoib A, Akhtar N, Nafisa, Aftab A** (2013) Fourier transform-infrared spectroscopy to monitor modifications in canola biochemistry caused by *Alternaria destruens*. *Pak. J. Phytopathol.* 25(2), 105-109.
- Shoemaker R C, Christofferson S E, Galbraith D W** (1987) Storage protein accumulation patterns in somatic embryos of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Rep.* 6, 12-15.
- Silveira V, Balbuena T S, Santa-Catarina C, Floh E I S, Guerra M P, Handro W** (2004) Biochemical changes during seed development in *Pinus taeda* L. *Plant Growth Regul.* 44, 147-156.
- Silveira V, Santa-Catarina C, Balbuena T S, Moraes F M S, Ricart C A O, Sousa M V, Guerra M P, Handro W, Floh E I S** (2008). Endogenous abscisic acid and protein contents during seed development of *Araucaria angustifolia*. *Biol. Plant.* 52, 101–104.
- Singh H** (1978) Embryology of gymnosperms. Gebrüder Borntraeger, Berlin, 1–302.
- Sipeniece E, Mišina I, Grygier A, Qian Y, Rudzińska M, Kaufmane E, Seglina D, Siger A, Górnaś P** (2021) Impact of the harvest year of three cultivars of Japanese quince (*Chaenomeles japonica*) on the oil content and its composition. *Sci. Horticult.* 275, 109683.
- Škvareninová J, Mrekaj I** (2022) Impact of climate change on norway spruce flowering in the southern part of the western carpathians. *Front. Ecol. Evol.* 10, 865471.
- Slobodník B, Guttenberger H** (2005) Zygotic embryogenesis and empty seed

- formation in European larch (*Larix decidua* Mill.). Ann. For. Sci. 62, 129–134.
- Smolikova G, Leonova T, Vashurina N, Frolov A, Medvedev S** (2020) Desiccation tolerance as the basis of long-term seed viability. Int. J. Mol. Sci. 22, 101.
- Snyman S J, Nkwanyana P D, Watt M P** (2011) Alleviation of hyperhydricity of sugarcane plantlets produced in RITA® vessels and genotypic and phenotypic characterization of acclimated plants. S. Afr. J. Bot. 77(3), 685-692.
- Song Y, Zhen C, Zhang H G, Li S J** (2016) Embryogenic callus induction and somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Larix olgensis*. Sci. Silvae Sin. 52(10), 45-54.
- Stasolla C, Kong L, Yeung E C, Thorpe T A** (2002) Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology. In Vitro Cell. Dev. Biol. 38, 93–105.
- Strug I, Utzat C, Cappione A, Gutierrez S, Amara R, Lento J, Capito F, Skudas R, Chernokalskaya E, Nadler T** (2014) Development of a univariate membrane-based mid-infrared method for protein quantitation and total lipid content analysis of biological samples. J. Anal. Methods Chem. 2014, 657079.
- Swamy P M, Smith B N** (1999) Role of abscisic acid in plant stress tolerance. Current Sci. 76(9), 1220-1227.
- Szczygieł K, Hazubska-Przybył T, Bojarczuk K** (2007) Somatic embryogenesis of selected coniferous tree species of the genera *Picea*, *Abies* and *Larix*. Acta Soc. Bot. Pol. 7(1), 7-15.
- Szulc J, Gozdecka G, Poćwiardowski W** (2020) The application of NIR spectroscopy in moisture determining of vegetable seeds. Czech J. Food Sci. 38(2), 131-136.
- Tahir M, Vandenberg A, Chibbar R N** (2011) Influence of environment on seed soluble carbohydrates in selected lentil cultivars. J. Food Compos. Anal. 24, 596–602.
- Tereso S, Zoglauer K, Milhinhos A, Miguel C, Oliveira M M** (2007) Zygotic and somatic embryo morphogenesis in *Pinus pinaster*: comparative histological and histochemical study. Tree Physiol. 27(5), 661-669.
- Terskikh V V, Feurtado J A, Borchardt S, Giblin M, Abrams S R, Kermod A R** (2005) *In vivo* <sup>13</sup>C NMR metabolite profiling: potential for understanding and assessing conifer seed quality. J. Exp. Bot. 56(418), 2253-2265.
- Tetlow I J** (2011) Starch biosynthesis in developing seeds. Seed Sci. Res. 21, 5-32.
- Tetteroo A A F, Hoekstra F A, Karssen C M** (1995) Induction of complete desiccation tolerance in carrot (*Daucus carota*) embryoids. J. Plant Physiol. 145(3), 349-356.
- Teyssier C, Grondin C, Bonhomme L, Lomenech A M, Vallance M, Morabito D, Label P, Lelu-Walter M A** (2011) Increased gelling agent concentration promotes somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix x eurolepis*): a 2-DE proteomic analysis. Physiol. Plant. 141(2), 152-165.
- Teyssier C, Maury S, Beaufour M, Grondin C, Delaunay A, Le Metté C, Ader K, Cadene M, Label P, Lelu-Walter M A** (2014) In search of markers for somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix x eurolepis*): global DNA methylation and proteomic analyses. Physiol. Plant. 150, 271–291.
- Thompson R G, von Aderkas P** (1992) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of western larch. Plant Cell. Rep. 11(8), 379-85.
- Tigabu M** (2003) Characterization of forest tree seed quality with near infrared spectroscopy and multivariate analysis. Thesis. Umeå, ISBN 91-576-6508-7.
- Tigabu M, Odén P C, Lindgren D** (2005) Identification of seed sources and parents

- of *Pinus sylvestris* L. using visible-near infrared reflectance spectra and multivariate analysis. *Trees* 19, 468-476.
- Tigabu M, Odén P C, Shen T Y** (2004) Application of near-infrared spectroscopy for the detection of internal insect infestation in *Picea abies* seed lots. *Can. J. For. Res.* 34(1), 76-84.
- Tikkinen M, Varis S, Peltola H, Aronen T** (2018) Improved germination conditions for Norway spruce somatic cotyledonary embryos increased survival and height growth of emblings. *Trees* 32, 1489–1504.
- Tillman-Sutela E, Kauppi A** (2000) **Structures contributing to the completion of conifer seed germination.** *Trees* 14, 191-197.
- Tisserat B, Esan E B, Murashige T** (1979) Somatic embryogenesis in angiosperms dans: *Horticultural Reviews*, 1–78.
- Torres-Franklin M L, Gigon A, de Melo D F, Zuily-Fodil Y, Pham-Thi A T** (2007) Drought stress and rehydration affect the balance between MGDG and DGDG synthesis in cowpea leaves. *Physiol. Plant.* 131, 201–210.
- Tret'yakova I N, Barsukova A V** (2012) Somatic embryogenesis in in vitro culture of three larch species. *Russ. J. Dev. Biol.* 43, 353–361.
- Trontin J F, Canlet F, Reymond I, Debille S, Durandeau K, Harvengt L, Rousseau J, de Boisseson J, Fraysse J, Alazard P, Bailly A, Teyssier C, Le Metté C, Morel A, Label P, Lelu-Walter M** (2013). L'embryogenèse somatique : une méthode de multiplication végétative du pin maritime pour demain ? FCBA - INFO - Août 2013.
- Trontin J F, Klimaszewska K, Morel A, Hargreaves C L, Lelu-Walter M A** (2016) Molecular aspects of conifer zygotic and somatic embryo development: a review of genome-wide approaches and recent insights. In: Germana, M. & Lambardi, M. (Eds.) *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants. Methods in Molecular Biology.* New York: Springer Science Business Media, pp. 167–207.
- Tsuchikawa S, Kobori H** (2015) A review of recent application of near infrared spectroscopy to wood science and technology. *J. Wood Sci.* 61, 213-220.
- Tsuchikawa S, Ma T, Inagaki T** (2022) Application of near-infrared spectroscopy to agriculture and forestry. *Anal. Sci.* 38, 635-642.
- Tulukcu E, Yalcin H, Ozturk I, Sagdic O** (2012) Changes in the fatty acid compositions and bioactivities of clary sage seeds depending on harvest year. *Int. J. Crops Prod.* 39, 69-73.
- Türker-Kaya S, Huck C W** (2017) A review of mid-infrared and near-infrared imaging: principles, concepts and applications in plant tissue analysis. *Molecules* 22(1), 168.
- Tuteja N** (2007) Abscisic acid and abiotic stress signaling. *Plant Signal. Behav.* 2(3), 135-138.
- Vaghela B, Vashi R, Rajput K, Joshi R** (2022) Plant chitinases and their role in plant defense: A comprehensive review. *Enzyme Microb.* 159, 110055.
- Välimäki S, Teyssier C, Tikkinen M, Delile A, Boizot N, Varis S, Lelu-Walter M A, Aronen T** (2022) Norway spruce somatic embryogenesis benefits from proliferation of embryogenic tissues on filter discs and cold storage of cotyledonary embryos. *Front. Plant Sci.* 13, 1031686.
- van der Schoot C, Rinne P L H** (2011) Dormancy cycling at the shoot apical meristem: Transitioning between self-organization and self-arrest. *Plant Sci.* 180(1), 120-131.
- van Zanten M, Carles A, Li Y, Soppe W J** (2012) Control and consequences of chromatin compaction during seed maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant*

- Signal Behav. 7(3), 338-341.
- Varghese B, Naithani S C** (2002) Desiccation-induced changes in lipid peroxidation, superoxide level and antioxidant enzymes activity in neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seeds. *Acta Physiol. Plant.* 24, 79–87.
- Varis S, Ahola S, Jaakola L, Aronen T** (2017) Reliable and practical methods for cryopreservation of embryogenic cultures and cold storage of somatic embryos of Norway spruce. *Cryobiology* 76, 8-17.
- Verger M, Pâques L E** (1993) Multiplication végétative du mélèze hybride (*Larix x eurolepis* Henry) par bouturage en vrac. *Ann. For. Sci.* 50, 205–215.
- Vertucci C W, Farrant J M** (1995) Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: Seed development and germination. Marcel Dekker, New York, pp 237–271.
- Vicré M, Farrant J M, Driouich A** (2004) Insights into the cellular mechanisms of desiccation tolerance among angiosperm resurrection plant species. *Plant Cell Env.* 27, 1329-1340.
- Vishwakarma K, Upadhyay N, Kumar N, Yadav G, Singh J, Mishra R K, Kumar V, Verma R, Upadhyay R G, Pandey M, Sharma S** (2017) Abscisic Acid Signaling and Abiotic Stress Tolerance in Plants: A Review on Current Knowledge and Future Prospects. *Front. Plant Sci.* 8, 161.
- Vizcaíno J A, Csordas A, del-Toro N, Dienes J A, Griss J, Lavidas I, Mayer G, Perez-Riverol Y, Reisinger F, Ternent T, Xu Q W, Wang R, Hermjakob H** (2016) 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Res.* 44(D1), D447-D456.
- Voelker T, Kinney A J** (2001) Variations in the biosynthesis of seed-storage lipids. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 52, 335–361.
- von Aderkas P** (2002a) *In Vitro* phenotypic variation in larch cotyledon number. *Int. J. Plant Sci.* 163, 301–307.
- von Aderkas P, Bonga J, Klimaszewska K, Owens J** (1991) Comparison of larch embryogeny *in vivo* and *in vitro* dans: Ahuja M R (Ed.) *Woody Plant Biotechnology*. Springer US, New York, 139–155.
- von Aderkas P, Rohr R, Sundberg B, Gutmann M, Dumont-BéBoux N, Lelu M A** (2002b) Abscisic acid and its influence on development of the embryonal root cap, storage product and secondary metabolite accumulation in hybrid larch somatic embryos. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 69, 111-120.
- von Aderkas P, Teyssier C, Charpentier J P, Gutmann M, Pâques L, Le Metté C, Ader K, Label P, Kong L, Lelu-Walter M A** (2015) Effect of light conditions on anatomical and biochemical aspects of somatic and zygotic embryos of hybrid larch (*Larix x marschlinii*). *Ann. Bot.* 115(4), 605-115.
- von Aderkas P, Klimaszewska K, Bonga J M** (1990) Haploid and diploid embryogenesis in *Larix leptolepis*, *L. decidua*, and their reciprocal hybrids. *Can. J.For. Res.* 20(1), 9-14.
- Von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J, Filonova L** (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 69(3), 233-249.
- Vondrakova Z, Dobrev P I, Pesek B, Fischerova L, Vagner M, Motyka V** (2018) Profiles of endogenous phytohormones over the course of norway spruce somatic embryogenesis. *Front. Plant Sci.* 9, 1283.
- Vondráková Z, Pešek B, Malbeck J, Bezděčková L, Vondrák T, Fischerová L, Eliášová K** (2020) Dormancy breaking in *Fagus sylvatica* seeds is linked to formation of abscisic acid-glucosyl ester. *New Forests* 51, 671-688.
- Wahid N, Bounoua L** (2013) The relationship between seed weight, germination and biochemical reserves of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) in Morocco. *New*



- For. 44, 385–397.
- Walters C, Koster K L** (2007) Structural dynamics and desiccation damage in plant reproductive organs. In: Jenks M.A., Wood A.J., editors. *Plant Desiccation Tolerance*. Blackwell; Ames, IA, USA, 251–280.
- Wang W Q, Liu S J, Song S Q, Møller I M** (2015) Proteomics of seed development, desiccation tolerance, germination and vigor. *Plant Physiol. Biochem.* 86, 1-15.
- Wang W Q, Ye J Q, Rogowska-Wrzesinska A, Wojdyla K I, Jensen O N, Møller I M, Song S Q** (2014) Proteomic comparison between maturation drying and prematurely imposed drying of *Zea mays* seeds reveals a potential role of maturation drying in preparing proteins for seed germination, seedling vigor, and pathogen resistance. *J. Proteome Res.* 13(2), 606-626.
- Wang Y, Mostafa S, Zeng W, Jin B** (2021) Function and mechanism of jasmonic acid in plant responses to abiotic and biotic stresses. *Int. J. Mol. Sci.* 22(16), 8568.
- Wang Y, Xiang J, Tang Y, Chen W, Xu Y** (2021) A review of the application of near-infrared spectroscopy (NIRS) in forestry. *Appl. Spectrosc. Rev.* 57(4), 300-317.
- Weber H, Borisjuk L, Heim U, Sauer N, Wobus U** (1997) A role for sugar transporters during seed development: Molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in fava bean seeds. *Plant Cell* 9(6), 895-908.
- Weber H, Buchner P, Borisjuk L, Wobus U** (1996) Sucrose metabolism during cotyledon development of *Vicia faba* L. is controlled by the concerted action of both sucrose-phosphate synthase and sucrose synthase: expression patterns, metabolic regulation and implications for seed development. *Plant J.* 9(6), 841-850.
- Webster F B, Roberts D R, Mcinnis S M, Sutton B C S** (1990) Propagation of interior spruce by somatic embryogenesis. *Can. J. For. Res.* 20, 1759–1765.
- Wehmeyer N, Hernandez L D, Finkelstein R R, Vierling E** (1996) Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. *Plant Physiol.* 112, 747–757.
- Wehmeyer N, Vierling E** (2000) The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. *Plant Physiol.* 122, 1099–1108.
- Welti R, Li W Q, Li M Y, Sang Y M, Biesiad H, Zhou H E, Rajashekar C B, Williams T D, Wang X M** (2002) Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase D alpha in freezing-induced lipid changes in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 277, 31994–32002.
- Williams P, Norris K H** (2021) *Near-infrared technology in the agricultural and food industries*. Paul, Minn., USA: American Association of Cereal Chemists, St.
- Wobus U, Weber H** (1999) Sugars as signal molecules in plant seed development. *Biol. Chem.* 380(7-8), 937-944.
- Wold S, Esbensen K, Geladi P** (1987) Principal component analysis. *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 2(1), 37-52.
- Wolff R L, Lavalie O, Pédrone F, Pasquier E, Deluc L G, Marpeau A M, Aitzetmüller K** (2001) Fatty acid composition of pinaceae as taxonomic markers. *Lipids* 36, 439–451.
- Workman J J, Weyer L** (2007) *Practical guide to interpretive near-infrared spectroscopy* (1st ed.). In: Press. C (ed).
- Wright J W** (1976) *Population genetics—selection dans: Introduction to Forest Genetics*. Elsevier, 47–63.
- Xu C, Shanklin J** (2016) Triacylglycerol metabolism, function, and accumulation in plant vegetative tissues. *Annu. Rev. Plant Biol.* 67, 179–206.

- Xu R, Hu W, Zhou Y, Zhang X, Xu S, Guo Q, Qi P, Chen L, Yang X, Zhang F, Liu L, Qiu L, Wang J** (2020) Use of near-infrared spectroscopy for the rapid evaluation of soybean [*Glycine max* (L.) Merri.] water soluble protein content. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 224, 117400.
- Yang J, Duan G, Li C, Liu L, Han G, Zhang Y, Wang C** (2019) The crosstalks between jasmonic acid and other plant hormone signaling highlight the involvement of jasmonic acid as a core component in plant response to biotic and abiotic stresses. *Front. Plant Sci.* 10, 1349.
- Yang X, Zhang X** (2010) Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 29(1), 36-57,
- Yeung E C, Stasolla C, Kong L** (1998) Apical meristem formation during zygotic embryo development of white spruce. *Can. J. Bot.* 76(5), 751-761.
- Yu K, Song Y, Lin J, Dixon R A** (2023) The complexities of proanthocyanidin biosynthesis and its regulation in plants. *Plant Communications* 4(2), 100498.
- Yulianti, Putri K P, Yuniarti N, Aminah A, E Suita, Danu, Sudrajat D J, Nurhasybi, Syamsuwida D** (2020) Seed handling of specific forest tree species: Recalcitrant and intermediate seed. *OP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 522, 012015.
- Zhang H, Han W, De Smet I, Talboys P, Loya R, Hassan A, Rong H, Jürgens G, Paul Knox J, Wang M H** (2010) ABA promotes quiescence of the quiescent centre and suppresses stem cell differentiation in the Arabidopsis primary root meristem. *Plant J.* 64(5), 764-774.
- Zhang H, Wang W Q, Liu S J, Møller I M, Song S Q** (2015) Proteome analysis of poplar seed vigor. *PLoS one* 10(7), e0132509.
- Zhang Y, Zhang L, Wang J, Tang X, Wu H, Wang M, Zeng W, Mo Q, Li Y, Li J, Huang Y, Xu B, Zhang M** (2018) Rapid Determination of the Oil and Moisture Contents in *Camellia gauchowensis* Chang and *Camellia semiserrata* Chi Seeds Kernels by Near-infrared Reflectance Spectroscopy. *Molecules* 23(9), 2332.
- Zhang Y, Zhang S, Han S, Li X, Qi L** (2012) Transcriptome profiling and *in silico* analysis of somatic embryos in Japanese larch (*Larix leptolepis*). *Plant Cell Rep.* 31, 1637–1657.
- Zhao J, Li H, Fu S, Chen B, Sun W, Zhang J, Zhang J** (2015) An iTRAQ-based proteomics approach to clarify the molecular physiology of somatic embryo development in Prince Rupprecht's larch (*Larix principis-rupprechtii* Mayr). *PLOS ONE* 10(3), e0119987.
- Zhen Y, Ji S S, Zhao Z Z, Xu S P, Wang Z J, Zheng R H** (2010) Proteomic analysis of seed development in chinese Fir (*Cunninghamia lanceolata*). *Russ. J. Plant Physiol.* 57, 560–567.
- Zhong Y, Zhang Z, Chen J, Niu J, Shi Y, Wang Y, Chen T, Sun Z, Chen J, Luan M** (2021) Physicochemical properties, content, composition and partial least squares models of *A. trifoliata* seeds oil. *Food Chemi.: X* 12, 100131.
- Zhu C, Fu X, Zhang J, Qin K, Wu C** (2022) Review of portable near infrared spectrometers: Current status and new techniques *J. Near Infrared Spectrosc.* 30(2), 51-66.
- Zhu L J, Deng X G, Zou L J, Zhang D W, Lin H H** (2017) Enhancement of stress tolerance in cucumber seedlings by proanthocyanidins. *Biol. Plant.* 61, 323-332.
- Zhu T, Wang J, Hu J, Ling J** (2022) Mini review: application of the somatic embryogenesis technique in conifer species. *For. Res.* 2, 18.
- Ziv M** (1991) Quality of micropropagated plants—vitrification. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—*

Plant 2, 64–69.

**Zwack P J, Rashotte A M** (2015) Interactions between cytokinin signalling and abiotic stress responses. *J. Exp. Bot.* 66, 4863-4871.

# Annexes

## Annexe 1. Milieux de culture en embryogenèse somatique du mélèze hybride (Lelu-Walter et Pâques 2009)

Composants (mg L <sup>-1</sup> )	Induction*	Prolifération**	Maturation**	Germination/ Plante**
<u>Macroéléments</u>				
KNO <sub>3</sub>	950	100	100	100
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825	-	-	-
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	925	370	370	370
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	110	440	440	440
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170	170	170
KCl	-	740	740	740
Fer EDTA	40	40	40	40
<u>Microéléments</u>				
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	31	6.2	6.2	6.2
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	21	16.9	16.9	16.9
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	43	8.6	8.6	8.6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.25	0.25	0.25	0.25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.5	0.025	0.025	0.025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.13	0.025	0.025	0.025
KI	4.15	0.83	0.83	0.83
<u>Vitamines</u>				
Myo-inositol	100	100	100	100
Acide Nicotinique	0.5	0.5	0.5	0.5
Pyridoxine HCl	0.5	0.5	0.5	0.5
Thiamine HCl	0.1	0.1	0.1	0.1
Hydrolysate caséine	1000			
L-Glutamine	500	1460	1460	1460
Saccharose	20 000	20 000	68 400	30 000
2,4-D	0.5	2		
BA	0.5	0.5		
ABA			15.8 (60µM)	
AIB			0.2 (1µM)	
Phytigel	4000	4000	8000	4000

\* milieu de base noté ½ LM (Litvay et al 1981)

\*\* milieu de base noté MSG (Becwar et al 1990)

Becwar M.R., Nagmani R., et Wann S.R., 1990. Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). Can. J. For. Res. 20: 810–817.

Litvay J.D., Verma D.C., et Johnson M.A., 1985. Influence of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.). Plant Cell Rep. 4: 325–328



## Annexe 2. Poster: Graines et réserves, pour le meilleur et pour le SPIR. Présentation à Biotechnocentre (2021)



# Graines et réserves, pour le meilleur et pour le SPIR

Parisa Savane<sup>1</sup>, Armelle Delile<sup>1</sup>, Nathalie Boizot<sup>1,2</sup>, Nassim Belmokhtar<sup>1,2</sup>, Céline Ridet<sup>1</sup>, Marie-Anne Lelu-Walter<sup>1</sup>, Caroline Teyssier<sup>1</sup>

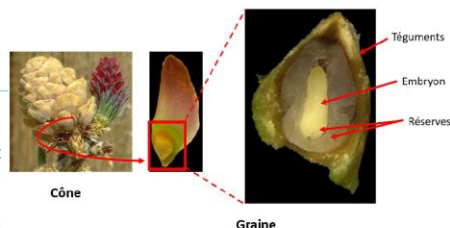


1 : UMR0588 BioForA, INRAE, ONF, Orléans, France

2 : Plateforme régionale Phénobois, INRAE, Orléans, France

## Introduction :

La qualité des graines est déterminante pour l'obtention de plants vigoureux. Cette qualité est actuellement évaluée par des méthodes de mesure fastidieuses et chronophages (poids des 1000 graines, germination, dosages des composés de réserves) et qui nécessitent parfois un nombre important de graines. Des premiers résultats ont montré que la qualité des graines n'est pas équivalente selon les années et il serait intéressant de pouvoir caractériser les réserves des graines avant de déclencher leur récolte. La spectrométrie infra-rouge (SPIR) permet facilement et rapidement la détection de composés biochimiques marqués par une signature spectrale spécifique. La SPIR associée à la chimométrie peut ainsi servir à déterminer qualitativement et quantitativement les réserves des graines pour donner une estimation de leur qualité. Cette technique analytique est une innovation dans le domaine forestier.



## Matériel et méthodes :

Matériel végétal :

Graines entières de mélèze



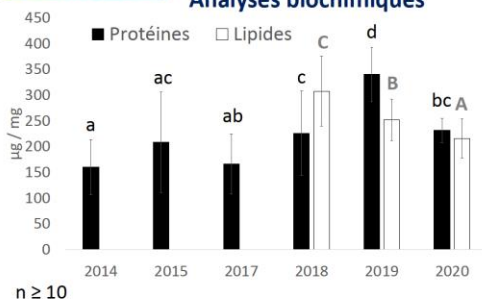
Récoltées de 2014 à 2020 selon 3 dates :

Récolte 1	Récolte 2	Récolte 3
RC - 6 semaines	RC - 3 semaines	Récolte commerciale (RC)

Acquisition des spectres : Spectromètre Frontier FT-IR MIR-NIR (PerkinElmer)

## Résultats :

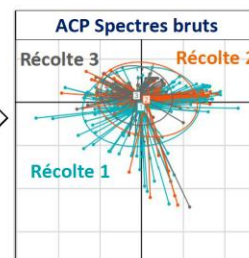
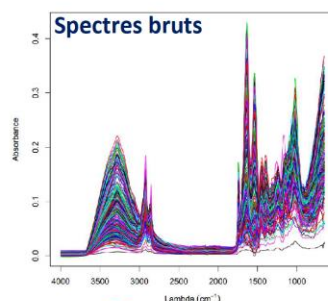
Analyses biochimiques



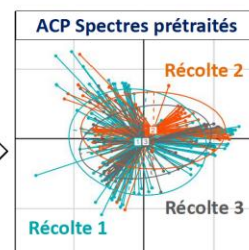
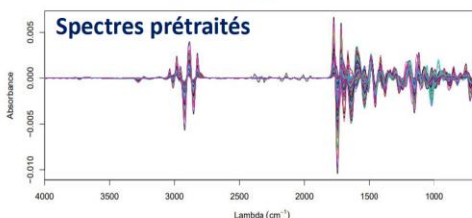
n ≥ 10

Un fort effet année est observé sur la teneur des différentes réserves des graines récoltées à la date de récolte commerciale.

Les prétraitements appliqués aux spectres bruts permettent la correction des déformations spectrales indésirables et une meilleure séparation des différentes récoltes des graines sur les ACP.



Application des prétraitements



## Conclusion :

Grâce aux données spectrales et biochimiques recueillies, des modèles de calibration seront développés pour évaluer les caractéristiques biochimiques des réserves énergétiques (protéines, lipides, glucides) des graines forestières. Les spectres moyens obtenus en SPIR seront associés aux valeurs moyennes des mesures biochimiques pour le développement des modèles de calibration.



**Caractérisations biologique, physiologique et moléculaire de la déshydratation des embryons somatiques et zygotiques de mélèze. Analyse des conséquences en termes de la qualité des graines.**

Les variations de l'environnement impactent négativement la production de graines de mélèze, ce qui limite l'obtention de plants. Pour y faire face, deux options sont envisagées (1) la multiplication végétative in vitro par embryogenèse somatiques, (2) l'optimisation de la récolte des graines en respectant leur état de maturité. Pour mettre en œuvre ces possibilités, il est indispensable de s'intéresser à l'étape finale de la maturation, la déshydratation. Celle-ci joue un rôle clé sur la qualité finale et la germination des embryons somatiques (ES) et des graines. Au cours de ma thèse, j'ai étudié la déshydratation chez le mélèze hybride (1) en évaluant la réponse des ES et en les comparant aux embryons zygotiques (EZ), (2) en caractérisant les graines récoltées entre 2014 et 2021, à différentes dates, avant ou après séchage. Concernant les ES, une approche analytique multi-échelles (biologie, biochimie, histologie, et protéomique) a été réalisée pour avoir un inventaire quantitatif et qualitatif des modifications survenant lors ce processus. Une déshydratation des ES sous humidité relative (HR) élevée (98%) a entraîné l'amélioration de la germination, la réduction de la teneur en acide abscissique et des modifications histologiques confirmant les résultats des analyses d'amidon. Mais, ce traitement n'a pas permis de réduire la teneur en eau à un niveau équivalent à celui des EZ, contrairement à une déshydratation sous faible HR (59%). Toutefois, cette dernière impacte négativement la structure cellulaire et la germination des ES. Néanmoins, un traitement combinant successivement les deux déshydratations a permis de minimiser les effets négatifs de la déshydratation sous faible HR tout en réduisant la teneur en eau des ES. Les analyses protéomiques suggèrent que la déshydratation, quel que soit l'HR, induit une modification du profil protéique marquée par l'augmentation de l'abondance des protéines de réponses au stress et la diminution de celles impliquées dans le développement des ES. Pour les graines, la période de maturation était principalement marquée par leur déshydratation partielle et une faible évolution de leur composition en réserves. Cette dernière est surtout impactée par l'année de récolte, et moins par le génotype et la date de récolte. Cela ouvre ainsi la possibilité d'une récolte anticipée des graines sans incidence sur leur qualité. Les marqueurs identifiés et associés à leur maturité étaient l'activité de l'eau et le profil des glucides. Néanmoins, la déshydratation partielle des graines entraînait dans les protéomes l'activation du métabolisme primaire des protéines et des glucides, l'induction des réponses à un stimulus et l'activation de processus impliqués dans l'organisation des organites cellulaires. Le séchage des graines impliquait dans les protéomes une modification de processus métaboliques et l'activation de processus liés à la réorganisation des composants cellulaires. Afin de disposer d'outils facilitant la caractérisation des ES et des graines, des modèles de calibration en spectrométrie infrarouge ont été développés avec succès et pour la première fois. Ces modèles de calibration permettent la prédiction quantitative de la composition biochimique et la discrimination selon le temps de maturation. L'ensemble des résultats contribue à une meilleure compréhension de la déshydratation des ES et des graines de mélèze.

**Mots clés :** *Larix eurolepis*, Maturation, Acide abscissique, Réserves, Teneur en eau, spectrométrie infrarouge

**Biological, physiological and molecular characterizations of desiccation of somatic and zygotic larch embryos. Analysis of the consequences in terms of seed quality.**

Environmental variations have a negative impact on larch seed production, limiting the number of seedlings available. To counter this, two options are being considered (1) in vitro vegetative propagation by somatic embryogenesis, (2) optimizing seed harvesting while respecting their level of maturity. To implement these options, it is essential to focus on the final stage of maturation i.e. desiccation. This latter plays a key role in the final quality and germination of somatic embryos (SE) and seeds. During my thesis, I studied desiccation in hybrid larch (1) by assessing the response of SE and comparing them with zygotic embryos (ZE), (2) by characterizing seeds harvested between 2014 and 2021, at different dates, before or after drying. For ES, a multi-scale analytical approach (biology, biochemistry, histology and proteomics) was carried out to obtain a quantitative and qualitative inventory of the changes occurring during this process. Desiccation of SE under high relative humidity (RH) (98%) resulted in improved germination, reduction of abscisic acid content and histological changes, confirming the results of starch analyses. However, this treatment did not reduce water content to a level equivalent to that of EZ, unlike dehydration under reduced RH (59%). Moreover, the latter had a negative impact on the cell structure and germination of ES. Nevertheless, a treatment combining the two desiccations successively minimized the negative effects of desiccation under reduced RH, while decreasing the water content of SE. Proteomic analyses suggest that desiccation, whatever the RH, induces a modification of the protein profile marked by an increase in the abundance of stress response proteins and a decrease in those involved in SE development. For seeds, the maturation period was mainly marked by partial desiccation and little change in their storage composition. The latter is mainly impacted by the year of harvest, and less by the genotype and harvest date. This opens up the possibility of early harvesting of the seeds without affecting their quality. The markers identified and associated with maturity were water activity and carbohydrate profile. However, in the proteomes, partial desiccation of the seeds led to the activation of primary protein and carbohydrate metabolism, the induction of stimulus responses and the activation of processes involved in the organization of cellular organelles. In the proteomes, seed drying involved modification of metabolic processes and activation of processes linked to the reorganization of cellular components. To provide tools facilitating characterizing of SE and seeds, calibration models based on infrared spectrometry were successfully developed for the first time. These calibration models enable quantitative prediction of biochemical composition and discrimination according to ripening time. All these results contribute to a better understanding of the desiccation of larch SE and seeds.

**Keywords :** *Larix eurolepis*, Maturation, Abscisic acid, Storage, Water content, Infrared spectroscopy



Laboratoire INRAE Centre Val de Loire  
 Unité Biologie intégrée pour la valorisation de la diversité des arbres et de la forêt  
 2163, avenue de la pomme de pin CS 40001 Ardon

