

# Alexandre Morel

## PHYSIOLOGIE MOLÉCULAIRE DU DÉVELOPPEMENT DES EMBRYONS SOMATIQUES DE PIN MARITIME (*PINUS PINASTER* AIT.) : APPROCHES TRANSCRIPTOMIQUE ET PROTÉOMIQUE

*Molecular physiology of somatic embryo development of maritime pine (Pinus pinaster Ait.): proteomic and transcriptomic approaches*

**Thèse de doctorat en Biologie Végétale et Forestière sous la direction de Marie-Anne Lelu-Walter (INRA Centre Val de Loire, Orléans).**

Thèse soutenue le 20-03-2014 à Orléans. Ecole doctorale Santé, Sciences biologiques et Chimie du vivant (Orléans, Loiret). En partenariat avec l'Université d'Orléans et l'Unité Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières (AGPF) de l'INRA Centre Val de Loire (Orléans, équipe d'accueil).

### Résumé

Chez le pin maritime l'embryogenèse somatique, méthode de multiplication végétative performante, n'est pas optimisée, la limite étant le contrôle du développement des embryons somatiques (ES). Nos objectifs ont été 1) d'étudier les mécanismes physiologiques, cellulaires et moléculaires précoces contrôlant la différenciation des ES en réponse à une disponibilité en eau réduite et 2) d'évaluer pour l'ES cotylédonaire de 12 semaines son état de maturité, son protéome, afin de les comparer à l'embryon zygotique (EZ). 1) Pour le premier objectif, le rapprochement de données de transcriptomique et de protéomique a été entrepris. Nous avons observé une réponse physiologique et moléculaire ABA-dépendante entraînant une transition précoce de la prolifération vers la différenciation des ES (surexpression de protéines impliquées dans la division cellulaire, l'embryogenèse et la synthèse de l'amidon). Une protéine de type germin et une ubiquitine ligase apparaissent comme marqueurs potentiels de l'embryogenèse somatique précoce du pin maritime, alors que la protéine phosphatase 2C marque la réponse adaptative à l'environnement de culture. 2) La maturité de l'ES cotylédonaire a été étudiée aux niveaux physiologique (masse sèche, teneur en eau) et biochimique (teneur en protéines totales, en sucres solubles). Des ES de 10, 12 ou 14 semaines se révèlent semblables. Une méthode de classification hiérarchique ascendante basée sur 9 variables explicatives, montre que l'ES est si-

**Doctoral thesis in Plant and Forest Biology under the supervision of Marie-Anne Lelu-Walter (INRA Centre Val de Loire)**

Defended on 20-03-2014 in Orléans. Doctoral School Santé, Sciences biologiques et Chimie du vivant (Orléans, Loiret). Partnership between University of Orléans and the Research Unit in Forest Breeding, Genetics and Physiology (AGPF), INRA Centre Val de Loire, Orléans (hosting team).

### Abstract

*In maritime pine, somatic embryogenesis, a powerful method of vegetative propagation, is not optimized, the limitation being the control of the somatic embryo (SE) development. Our objectives were 1) To study the early physiological, cellular and molecular mechanisms controlling SE differentiation in response to a reduced water availability, and 2) to estimate for cotyledonary SE 12 weeks old, its maturity, its proteome, and compare them to the zygotic embryo (ZE). 1) For the first objective, transcriptomic and proteomic data were combined. We observed an ABA-dependent physiological and molecular answer, inducing an early transition from proliferation towards SE differentiation (over-expression of proteins involved in cellular division, embryogenesis and in starch synthesis). A protein of germin type and an ubiquitin ligase appear as potential markers of early somatic embryogenesis in maritime pine, while the phosphatase protein 2C stands out the adaptive answer to the environment of culture. 2) Cotyledonary SE maturity was studied at the physiological (dry weight, water content) and biochemical levels (total protein content, soluble sugars). SE 10, 12 or 14 weeks old appeared very similar. A hierarchical ascending cluster analysis based on 9 explanatory variables, shows that SE is similar to the fresh cotyledonary ZE; proteome profiling further confirmed high similarity (94.5%) between them. Protein profiling revealed common proteins belonging to 3 large*

miliaire à l'EZ cotylédonaire frais (protéomes présentant 94% d'homologie). Parmi les protéines communes, 3 familles ont été identifiées (protéines de réserve, protéines de réponse au stress HSP, protéines LEA) ainsi que l'aldose réductase et l'adénosine kinase. Nous les proposons comme marqueurs génériques du stade cotylédonaire de l'embryogenèse tardive du pin maritime. L'ensemble des résultats contribue à une meilleure compréhension de l'embryogenèse somatique du pin maritime.

*families (HSP, LEA and storage proteins) as well as aldose reductase and adenosine kinase. We propose them as generic markers of the cotyledonary stage of the late embryogenesis of the maritime pine.*



### Prix / Award

Premier prix de la compétition scientifique étudiante organisée par le groupe IUFRO 2.09.02 « Embryogenèse somatique et autres méthodes de multiplication végétative » dans le cadre de sa 3<sup>e</sup> conférence internationale (Vitoria-Gasteiz, Espagne, 10 septembre 2014).

First Place in the "First Biennial Student Scientific Competition" organized by the IUFRO 2.09.02 Unit "Somatic embryogenesis and other vegetative propagation technologies" during its third international conference (Vitoria-Gasteiz, Spain, Sept. 10, 2014).

### Publications / Publications

Canales, J., Bautista, R., Label, P., Gómez-Maldonado, J., Lesur, I., Fernández-Pozo, N., Rueda-Lopez, M., Guerrero-Fernandez, D., Castro-Rodríguez, V., Benzekri, H., Cañas, R.A., Guevara, M.-A., Rodrigues, A., Seoane, P., Teysier, C., Morel, A., Ehrenmann, F., Le Provost, G., Lalanne, C., Noiro, C., Klopp, C., Reymond, I., García-Gutiérrez, A., Trontin, J.-F., Lelu-Walter, M.-A., Miguel, C., Cervera, M.-T., Cantón, F.R., Plomion, C., Harvengt, L., Avila, C., Claros, M.G., and Cánovas, F.M. (2014). *De novo assembly of maritime pine transcriptome: implications for forest breeding and biotechnology*. *Plant Biotechnology Journal* 12 (3): 286-299 (doi: 10.1111/pbi.12136).

Morel, A., Trontin, J.-F., Corbineau, F., Lomenec, A.-M., Beaufour, M., Reymond, I., Le Metté, C., Ader, K., Harvengt, L., Cadène, M., Label, P., Teysier, C., and Lelu-Walter M.-A. (2014a). *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 (DOI: 10.1007/s00425-014-2125-z).

Morel, A., Teysier, C., Trontin, J.-F., Eliášová, K., Pešek, B., Beaufour, M., Morabito, D., Boizot, N., Le Metté, C., Belal-Bessai, L., Reymond, I., Harvengt, L., Cadène, M., Corbineau, F., Vagner, M., Label, P., and Lelu-Walter, M.-A. (2014b). *Early molecular events involved in Pinus pinaster Ait. somatic embryo development under reduced water availability: transcriptomic and proteomic analyses*. *Physiologia Plantarum* 152: 184-201 (DOI: 10.1111/ppl.12158).

Plomion, C., Bastien, C., Bogeat-Triboulet, M.-B., Bouffier, L., Déjardin, A., Duplessis, S., Fady, B., Heuert, M., Le Gac, A.-L., Le Provost, G., Legué, V., Lelu-Walter, M.-A., Lepié, J.-C., Maury, S., Morel, A., Oddou-Muratorio, S., Pilate, G., Sanchez, L., Scotti, I., Scotti-Saintagne, C., Segura, V., Trontin, J.-F., and Vacher, C. (2016). *Forest tree genomics: 10 achievements from the past 10 years and future prospects*. *Annals of Forest Science* 73: 77-103, DOI 10.1007/s13595-015-0488-3.

Trontin, J.-F., Teysier, C., Morel, A., Harvengt, L., and Lelu-Walter, M.-A. (2016). *Prospects for new variety deployment through somatic embryogenesis in maritime pine*. In: Park, Y.-S., Bonga, J.M., Moon, H.-K. (Eds), *Vegetative Propagation of Forest Trees*. Korea Forest Research Institute. Seoul, Korea, pp. 572-606. Published online 05/03/2016, <http://www.iufro20902.org/>. ISBN 978-89-8176-064-9.

Trontin, J.-F., Klimaszewska, K., Morel, A., Hargreaves, C., and Lelu-Walter, M.-A. (2016). *Molecular aspects of conifer zygotic and somatic embryo development: a review of genome-wide approaches and recent insights*. In: Germanà M.A., Lambardi M. (Eds), *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants, Methods in Molecular Biology*, vol. 1359, Chapter 8, DOI 10.1007/978-1-4939-3061-6\_8, © Springer Science+Business Media New York, pp. 167-207.

Trontin, J.-F., Canlet, F., Reymond, I., Debille, S., Durandau, K., Harvengt, L., Rousseau, J.-P., De Boisseson, J.-M., Fraysse, J.-Y., Alazard, P., Bailly, A., Teysier, C., Le Metté, C., Morel, A., Label P. and Lelu-Walter M.-A. (2013). *L'embryogenèse somatique : une méthode de multiplication végétative du pin maritime pour demain ?* FCBA info, septembre 2013, 9 pp. Publié en ligne le 05/09/13 (<http://www.fcba.info/>).

### Contact / Contact

**Plateforme XYLOFOREST** : Jean-François TRONTIN (XYLOBIOTECH) [jean-francois.trontin@fcba.fr](mailto:jean-francois.trontin@fcba.fr)  
Marie-Anne LELU-WALTER — [marie-anne.lelu-walter@inra.fr](mailto:marie-anne.lelu-walter@inra.fr)