

Floraison précoce et production de graines par des clones somatiques d'épinette noire (*Picea mariana*) : intégration potentielle dans le programme d'amélioration génétique et l'aménagement des vergers à graines

Fabienne Colas et Mohammed S. Lamhamedi

Résumé : Afin d'évaluer la possibilité d'intégrer des clones somatiques d'épinette noire (*Picea mariana* (Mill.) Britton, Sterns & Poggenb.) dans le programme d'amélioration génétique de cette espèce, nous avons vérifié la qualité de leur floraison précoce et leur capacité à produire des cônes et des graines de qualité. Des clones d'épinette noire produits par embryogénèse somatique ont fleuri dès l'âge de 4 ans. Sur les arbres âgés de 6 ans, des pollinisations supplémentaires ont été réalisées avec du pollen provenant d'un verger à graines de première génération. Les graines obtenues ont ensuite été caractérisées (dimensions, masse, germination en milieu artificiel), et des plants ont été produits en pépinière. Les résultats montrent que les clones somatiques d'épinette noire produisent des fleurs femelles normales, dont la durée de réceptivité et la position dans la cime sont comparables à celles des fleurs produites par des semenciers issus de semis cultivés dans des vergers à graines. Il en est de même pour les graines, qui présentent des caractéristiques tout à fait comparables à celles des graines produites dans des vergers à graines, ainsi que pour les plants issus de ces graines. Nos résultats montrent clairement qu'il est avantageux, aussi bien en terme de précocité de la floraison que de gains génétiques accrus, d'intégrer des clones somatiques d'élite dans un programme d'amélioration génétique et de les utiliser comme semenciers dans des vergers à graines et pour des croisements dirigés.

Abstract: Early flowering of somatic clones from black spruce (*Picea mariana* (Mill.) Britton, Sterns & Poggenb.) and their capacity to produce good-quality cones and seeds were evaluated to assess the potential for integrating these somatic clones into a genetic-improvement program for this species. Black spruce clones produced by somatic embryogenesis exhibited premature flowering at 4 years of age. Six-year-old trees received a supplemental pollination treatment using pollen produced in a first-generation seed orchard. The resulting seeds were characterized (size, mass, germination under artificial conditions), and seedlings were produced in a nursery. Results showed that flowers produced by these somatic clones exhibited a normal period of receptivity. Their position in the crown was comparable to that observed on seedlings in seed orchards. A similar pattern was observed for seed characteristics, which were comparable to those of seeds originating from seed orchard trees, and for the development of the resulting seedlings. Our results clearly show that it is worthwhile, in terms of early flower production as well as for increased genetic gains, to integrate elite somatic clones into a genetic-improvement program, and to use them as seed trees in seed orchards and for controlled crosses.

Introduction

Grâce à son aire de distribution très étendue, l'épinette noire (*Picea mariana* (Mill.) Britton, Sterns & Poggenb.) figure parmi les principales essences forestières de la forêt boréale en Amérique du Nord (Morgenstern 1969; Viereck et Johnston 1990). Elle est très recherchée par l'industrie forestière en raison de la qualité de son bois, doté de fibres longues et d'une densité élevée, et de sa résistance aux insectes, aux maladies, ainsi qu'aux différents stress environnemen-

taux (Lamhamedi et Bernier 1994; Morgenstern 1996). L'épinette noire (EPN) est la principale essence utilisée dans le programme de reboisement du Québec. En moyenne, entre 2001 et 2008, cette essence a représenté 54 % des plants mis en terre au Québec, soit de 60 à 95 millions de plants par année (Parent 2008).

Au Québec, le programme d'amélioration génétique de l'EPN a débuté en 1969. Dès 1980, les résultats obtenus ont permis la constitution d'un important réseau de vergers à graines de semis de première génération et de tests de descendance (Lamontagne 1992). Également, des zones d'amélioration ont été définies (Beaulieu et al. 1989) et les meilleures familles ont été recommandées pour la réalisation de croisements dirigés destinés à la production de plants par bouturage de masse (Tousignant et al. 1996), ou pour la production de tests de clones somatiques. Actuellement, la superficie totale des vergers à graines d'EPN est de 658 ha (Parent 2008), dont 84 ha sont actuellement consacrés aux vergers de deuxième génération (Savary et al. 2008) initiés

Reçu le 19 juin 2009. Accepté le 10 mars 2010. Publié sur le site Web des Presses scientifiques du CNRC, au rcrf.cnrc.ca, le 15 juin 2010.

F. Colas¹ et M.S. Lamhamedi. Direction de la recherche forestière, ministère des Ressources naturelles et de la Faune du Québec, 2700, rue Einstein, Québec, QC G1P 3W8, Canada.

1. Auteur correspondant (courriel : fabienne.colas@mrnf.gouv.qc.ca).

en 1999. Les arbres sélectionnés pour la deuxième génération ont été produits par bouturage (Villeneuve 1999) en comptant sur la propriété qu'a l'EPN de conserver l'aptitude à l'enracinement de boutures âgées jusqu'à 9 ans. Cependant, on observe un fort effet clone (Tousignant et al. 1995), si bien que certains clones très performants ne peuvent être reproduits par bouturage.

Le ministère des Ressources naturelles et de la Faune (MRNF) du Québec a débuté, en 2004, l'intégration opérationnelle de l'embryogénèse somatique dans la filière de reboisement, de l'amélioration génétique aux plantations pour les principales essences commerciales (Lamhamedi et al. 2006a; Tremblay et Lamhamedi 2006). L'objectif est de maximiser la production de matériel de très haute qualité génétique et, ainsi, d'augmenter la productivité forestière de façon significative.

L'embryogénèse somatique (ES) est une méthode de multiplication végétative *in vitro*, en plusieurs étapes, qui permet d'obtenir, à partir d'une seule graine (= clone), une multitude d'embryons somatiques, lesquels deviendront des plants somatiques dont le génotype sera identique à la graine de départ (Jain et Gupta 2005). Un des principaux avantages qu'offre l'ES est la possibilité de conserver le tissu embryogène des clones en cryogénie. Une fois l'évaluation des plants en tests de clones complétée, il est alors possible de reproduire les meilleurs clones à partir des tissus cryoconservés, et ce, de façon presque infinie (Jain et Gupta 2005). Les premiers travaux de recherche sur l'ES de l'EPN ont mis l'accent sur l'optimisation de deux étapes importantes : la cryogénie (Cheliak et Klimaszewska 1991; Bomal et Tremblay 2000; Tremblay et al. 2005) et l'acclimatation *ex vitro* des plants sans recourir à la brumisation pour maintenir une atmosphère saturée en eau (Lamhamedi et al. 2003a). Par la suite, d'autres travaux ont démontré que les clones de différentes essences forestières d'Amérique du Nord produits par ES étaient très performants aussi bien en conditions contrôlées, en pépinière (Lamhamedi et al. 2000; Park 2002), qu'en forêt (Grossnickle et Folk 2007; Dean 2008). De récents résultats montrent aussi que les clones somatiques (CS) d'épinette de Norvège (*Picea abies* (L.) Karst) peuvent servir de pieds-mères pour générer des plants de haute qualité morphophysiologique à partir de boutures (Lamhamedi et Tousignant 2008).

Par ailleurs, pour exploiter le plein potentiel de l'ES, il s'avère nécessaire de s'assurer que les CS peuvent produire des fleurs mâles et femelles, ainsi que des cônes contenant des graines de haute qualité capables de générer des plants. Ainsi, ces clones pourraient être intégrés dans des vergers à graines ou utilisés pour des croisements dirigés.

L'EPN présente une floraison assez précoce par rapport à différentes essences forestières d'Amérique du Nord. En effet, en milieu naturel, la floraison de l'EPN apparaît autour de 10 ans (Youngblood et Safford 2008), mais il faut attendre l'âge de 15 ans pour effectuer des récoltes opérationnelles de cônes (Smith et Greenwood 1995). On est en droit de se demander si les CS de cette espèce se comportent de la même façon que des semis. À notre connaissance, aucune étude n'a encore évalué la capacité des CS à fleurir, à former des cônes et à produire des semences pour la production de plants dont la qualité morphophysiologique sera optimale tant en pépinière qu'en site de reboisement. De plus, nos connaissances sont très limitées quant à l'effet potentiel des

techniques d'ES sur la reproduction des essences forestières, notamment l'apparition et la formation, précoce ou retardée, des fleurs mâles et femelles, la durée de réceptivité des fleurs femelles, la formation de cônes et la capacité des fleurs mâles et femelles à produire du pollen et des graines viables de haute qualité.

Afin de pouvoir intégrer les meilleurs CS sélectionnés pour la production de graines de haute qualité génétique, nous devons acquérir des connaissances sur la floraison, la réceptivité des fleurs, la qualité des semences et des plants issus des CS. Ainsi, nos objectifs sont : (i) évaluer la précocité et l'abondance des floraisons mâle et femelle, la réceptivité des fleurs femelles et la qualité des semences produites par différents clones d'EPN issus d'ES; (ii) déterminer, à l'intérieur de la famille, l'effet de la variabilité clonale à la fois sur les caractéristiques physiques et physiologiques des semences et des plants par rapport à celles des familles (croisements dirigés d'origine, CDO) et des vergers à graines; (iii) comparer les variables morphophysiologiques moyennes des semences et des plants issus des CS par rapport à celles des familles et des vergers à graines et (iv) évaluer la performance (survie et croissance) des plants produits à partir de graines issues de CS en site de reboisement.

Matériel et méthodes

Site de l'essai et matériel végétal

Le test de clones d'EPN a été mis en terre au mois d'août 1997 sur un terrain du Centre d'expérimentation et de greffage de Duchesnay (longitude, 71° 38' 37"W; latitude, 46° 51' 05"N) situé à 25 km au nord-ouest de la ville de Québec (Québec, Canada). Ce test a été implanté en tant que test précoce en pépinière. Il comprend 16 CS qui ont été produits par ES dans le laboratoire de Madame Francine M. Tremblay, Ph.D., selon les techniques décrites par Tremblay et al. (2005). Ces CS ont été produits à partir de graines mûres issues de six familles de pleins frères non apparentées, sélectionnées dans le cadre du programme d'amélioration génétique de l'EPN (Villeneuve 1999). Pour tous les CS, les plants ont été produits à partir de tissu embryogène nouvellement initié sans passage en cryoconservation. Les graines des témoins zygotiques provenaient d'un lot issu d'un verger à graines. Elles ont été mises à germer au moment de la phase de germination des CS et dans les mêmes conditions environnementales. Tous les plants ont été produits en même temps, en serre, suite à une culture intensive pendant 1 an. Tant les témoins zygotiques que les CS avaient donc près de 1 an lors de la plantation, soit une seule saison de croissance.

Le test clonal est composé de 20 blocs aléatoires comprenant chacun 32 arbres. Dans chaque bloc, on retrouve une copie de chaque CS jusqu'à épuisement des copies. Les CS dont le nombre de copies était inférieur à 20 ont été remplacés par d'autres CS. Les clones ont été distribués aléatoirement à l'intérieur de chaque bloc. Pour notre étude, nous avons travaillé avec les 10 CS ayant fleuri en 2003 et dont le nombre de copies variait de 7 à 20. Les blocs renfermaient aussi des plants zygotiques au titre de témoins. Pour éviter les effets de bordure, une rangée d'arbres a été mise en terre tout autour du dispositif.

Avant la mise en terre des plants, le terrain a été travaillé avec un rotoculteur. Le sol est une ancienne terre agricole de composition très homogène, dont la classe texturale correspond à un loam sableux composé à 78 % de sable, 12 % de limon et 10 % d'argile. L'espacement entre les arbres est de 1 m × 1 m. Du trèfle blanc a été semé après la plantation. L'année de la plantation, les plants ont été fertilisés à deux reprises (2 et 6 semaines après la mise en terre) à l'aide d'une solution liquide de 8:20:30 (N:P:K). Chaque plant a ainsi reçu un total de 100 mg d'azote, 109 mg de phosphore et 311 mg de potassium. Les plants n'ont reçu aucune autre fertilisation par la suite.

Les arbres ont été mesurés (hauteur et diamètre) à trois reprises : 1999, 2001 et 2006.

Floraison et production des graines

Au printemps 2003, le dénombrement des fleurs femelles a été réalisé dès que celles-ci étaient facilement identifiables (début du débournement du bourgeon) en se basant sur l'approche d'identification décrite par Ho (1991). Pour être retenu pour la pollinisation, un arbre devait posséder au moins 40 fleurs femelles dans la cime; 10 CS répondaient à ce critère. Les fleurs n'étaient pas ensachées dans des sacs de pollinisation, et du pollen provenant du verger à graines voisin pouvait féconder les fleurs des CS. Cependant, afin de s'assurer que les fleurs recevaient suffisamment de pollen pour produire des graines, des pollinisations supplémentaires (Bridgwater et Trew 1981) ont été réalisées à l'aide d'un pistolet électrostatique portatif (modèle Gema Voltstatic 11024, ITW Gema, Indianapolis, Indiana) adapté du modèle développé par Philippe et Baldet (1997). Le pollen a été appliqué à deux reprises, les 29 mai et 4 juin 2003, lors de la pleine réceptivité des fleurs, c'est-à-dire lorsque les écailles ovulifères étaient perpendiculaires à l'axe de la fleur (Ho 1991). Pour les 10 CS retenus, nous avons pollinisé de deux à cinq ramets par CS.

Le pollen était identique pour toutes les pollinisations réalisées. Il consistait en un mélange de plusieurs lots récoltés dans deux vergers à graines de première génération d'EPN et conservés de 1 à 5 ans dans la banque de pollen de la Direction de la recherche forestière (Colas et Mercier 2000). La viabilité du mélange de ces lots était de 84 %; elle a été vérifiée par un test de germination *in vitro* selon les procédures décrites par Colas et Mercier (2000).

Afin de comparer les caractéristiques des semences et des plants issus des 10 CS par rapport à leurs familles d'origine, nous avons reproduit les CDO. Cependant, les disponibilités en pollen et en fleurs femelles nous ont permis de ne reproduire que trois des quatre CDO des 10 CS ayant fleuri au cours de notre étude. La méthode de pollinisation était celle décrite par Bramlett et O'Gwynn (1981). Le pollen a été récolté, extrait et appliqué la même année.

De plus, afin d'avoir un témoin correspondant aux graines employées dans le programme de reboisement du Québec, nous avons constitué un mélange, en volume équivalent, de graines provenant de cinq vergers à graines de première génération (verger à graines conventionnel, VGC) les plus utilisés correspondant à la zone écologique où est située la pépinière forestière qui a produit les plants.

Afin de protéger les cônes des arbres pollinisés contre deux insectes des cônes (le chalcis granivore de l'épinette

(*Megastigmus atedius* Walker) et la cécidomyie des cônes de l'épinette (*Kaltenbachiola rachiphaga* Tripp) (Turgeon et De Groot 1993)), nous avons appliqué à chaque arbre une quantité de 7,2 g de CYGON en solution dans 100 mL d'eau par injection dans le sol (deux injections de 50 mL chaque à deux positions diamétralement opposées) après la fermeture des fleurs femelles à la mi-juin.

À la mi-juillet, soit après la fin de l'élongation des pousses, des sacs tergal sont placés sur les fleurs pollinisées (Ho 1991) afin de protéger les cônes contre la prédation par les écureuils.

Les cônes ont été récoltés le 3 septembre 2003. Ils ont été maintenus séparés par numéro de CS ou CDO et entreposés à l'abri des intempéries dans un local frais et bien aéré jusqu'à leur extraction selon les techniques décrites par MER (1990).

Extraction et qualification des graines

L'extraction des graines a été effectuée au mois de janvier 2004 selon la procédure en vigueur au Centre de semences forestières de Berthier (Brault et al. 1996). Les cônes d'EPN ont tout d'abord été chauffés durant 16 h à 65 °C dans un tarare, les graines extraites ont été désaillées, puis triées par un séparateur par gravité (Seed blower HMC 67, Seedburo, Chicago, Illinois) pour éliminer les impuretés et les graines vides.

Le nombre de graines par lot de cônes par CS ou CDO a été déterminé à l'aide d'un compteur électronique (Count-A-Pak, Seedburo) ou manuellement pour les lots dont le nombre de graines était inférieur à 1000.

La masse des graines a été déterminée selon les protocoles en vigueur de l'ISTA (2009) pour le lot VGC et les lots de CS et CDO dont le nombre de graines était suffisant (supérieur à 800). Les dimensions de toutes les graines (longueur maximale rectiligne, largeur rectiligne maximale et surface projetée) produites par les CS, CDO et VGC ont été déterminées à l'aide du logiciel Winseedle (Régent Instruments, Québec, Canada) en optant pour la forme ellipsoïdale des semences.

L'évaluation de la germination des graines des CS, CDO et VGC a été effectuée dans un germoir (modèle G30, Conviron, Winnipeg, Manitoba) selon les normes de l'ISTA (2009) en vigueur pour l'EPN (21 jours de test, alternance de température (jour 30 °C : nuit 20 °C), 16 h de lumière, humidité relative 85 %). Les graines étaient déposées sur un substrat de cellulose (Kimpak, Seedburo) humidifié avec 250 mL d'eau désionisée, puis placé dans un plat de germination transparent (Spencer Lemaire, Edmonton, Alberta) selon les procédures décrites par (Wang et Ackerman 1983). Les plats, qui contenaient chacun quatre répétitions de 100 graines (sauf deux lots pour lesquels on ne disposait que de quatre répétitions de 50 graines), étaient ensuite installés dans le germoir. L'agencement des lots de graines dans les plats et les plats dans le germoir était aléatoire. Une graine était considérée comme germée lorsque les cotylédons du semis étaient visibles (stade deux décrit par Wang (1973)). Après chaque dénombrement, les semis étaient retirés du plat pour faciliter les dénombrements subséquents et éviter les erreurs de comptage. Le pourcentage de germination obtenu a été validé avec la table des écarts acceptables entre les répétitions de l'ISTA (2009). La valeur germinative

(index combinant la vitesse et l'importance de la germination) a été calculée pour chaque lot de graines selon la procédure de Czabator (1962).

Production des plants et performance en plantation

Les plants ont été produits à la Pépinière forestière de Saint-Modeste (longitude, 69° 23' 10"W; latitude, 47° 50' 10"N, Québec, Canada). Les graines des CS, CDO et VGC ont été ensemencées manuellement, sans traitement préalable, le 16 mai 2005 dans des récipients à parois ajourées (IPL 25-350A, 25 cavités, 350 cm³/cavité; IPL, Saint-Damien-de-Buckland, Québec) dont les cavités étaient remplies d'un mélange de tourbe et de vermiculite (v/v, 3/1) préalablement humecté et ajusté à une densité de 0,08 g/cm³ (Lamhamedi et al. 2006b). Pour chaque lot de semences, trois récipients ont été ensemencés manuellement avec trois graines par cavité. Les récipients ont été distribués aléatoirement dans l'aire de culture. Les récipients ensemencés avec les graines de notre essai n'étaient pas installés en bordure afin d'éviter les effets associés au rayonnement direct (p. ex., augmentation des températures) et les baisses significatives de teneur en eau du substrat (Lamhamedi et al. 2006b).

Une fois la germination complétée, soit environ 6 semaines après l'ensemencement, les cavités des récipients ont été éclaircies de façon à ne conserver qu'un seul semis par cavité. Aucun repiquage n'a été effectué afin d'éviter les effets associés à cette opération sur la forme et la croissance des racines. En définitive, chaque lot de graines était représenté par 75 semis.

La première saison, les plants d'EPN (1+0) ont été cultivés dans un tunnel non chauffé. Le tunnel a été ouvert pour l'hiver puis, au printemps suivant, les récipients ont été déplacés dans une aire de culture extérieure pour la deuxième année de croissance. Les régies de fertilisation et d'irrigation étaient celles d'une production opérationnelle standard d'EPN (Lamhamedi et al. 2003b). Durant les 2 années de croissance, les apports en éléments minéraux (N, P, K, Ca et Mg), éléments secondaires et micro-éléments étaient ajustés selon les besoins des plants en utilisant le logiciel PLANTEC dédié à la gestion de la fertilisation en pépinière forestière (Langlois et Gagnon 1993; Girard et al. 2001). Ainsi, durant la deuxième saison de croissance, les quantités d'azote (ammonium, nitrate), de P et Mg appliquées étaient respectivement de 489, 530, 475 et 793 mg/plant.

La croissance des plants lors de la première saison de culture a été déterminée sur un échantillon aléatoire de trois plants par récipient, soit un total de neuf plants par lot de graines, prélevé le 12 mai 2006 avant le débourrement et la reprise de croissance des plants. Après avoir mesuré la hauteur et le diamètre au collet de chacun des neuf plants, les masses des parties aériennes et des racines ont été déterminées après un séchage de 48 h dans une étuve à 60 °C. Les concentrations des éléments minéraux (N, P, K, Ca et Mg) des parties aériennes et des racines, ainsi que la conductivité électrique et la concentration des éléments minéraux contenus dans le substrat, ont été déterminées à partir de trois échantillons composites par lot à raison de trois plants par échantillon composite. Ces mesures et analyses ont été répétées selon les mêmes protocoles en fin de seconde année de croissance (octobre 2006).

Les analyses minérales des plants et du substrat ont été réalisées par le Laboratoire de chimie organique et inorganique (ISO/CEI 17025) du Service du soutien scientifique de la Direction de la recherche forestière (ministère des Ressources naturelles et de la Faune du Québec). Les procédures d'analyse sont décrites par Lamhamedi et al. (2003b).

Au printemps 2007, les plants produits à partir des graines des CS, CDO et VGC ont été mis en terre sur un terrain du Centre d'expérimentation et de greffage de Duchesnay.

La plantation était composée de six blocs aléatoires complets de 104 arbres chacun, chaque bloc renfermant quatre copies de chacun des lots de plants plantés consécutivement. Les lots de plants ont été distribués aléatoirement à l'intérieur de chaque bloc. À l'automne 2007 et 2008, un inventaire de survie et un mesurage (hauteur, diamètre au collet) ont été effectués.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées sur les données de dimensions des graines et de germination. Le modèle général utilisé pour l'analyse de la variance était

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

où y_{ij} est la variable réponse pour la j^{e} observation de la i^{e} source (clone); μ , la moyenne générale du modèle; α_i , l'effet fixe de la source i (valeurs moyennes); et ε_{ij} , l'erreur résiduelle associée à la source i et à l'observation j .

Ce modèle ne considère pas l'effet bloc, car les résultats de nos analyses statistiques préliminaires pour plusieurs variables à différents âges de plusieurs clones n'ont pas révélé un effet bloc aléatoire significatif, probablement à cause de la superficie restreinte du dispositif et de l'homogénéité du sol travaillé mécaniquement.

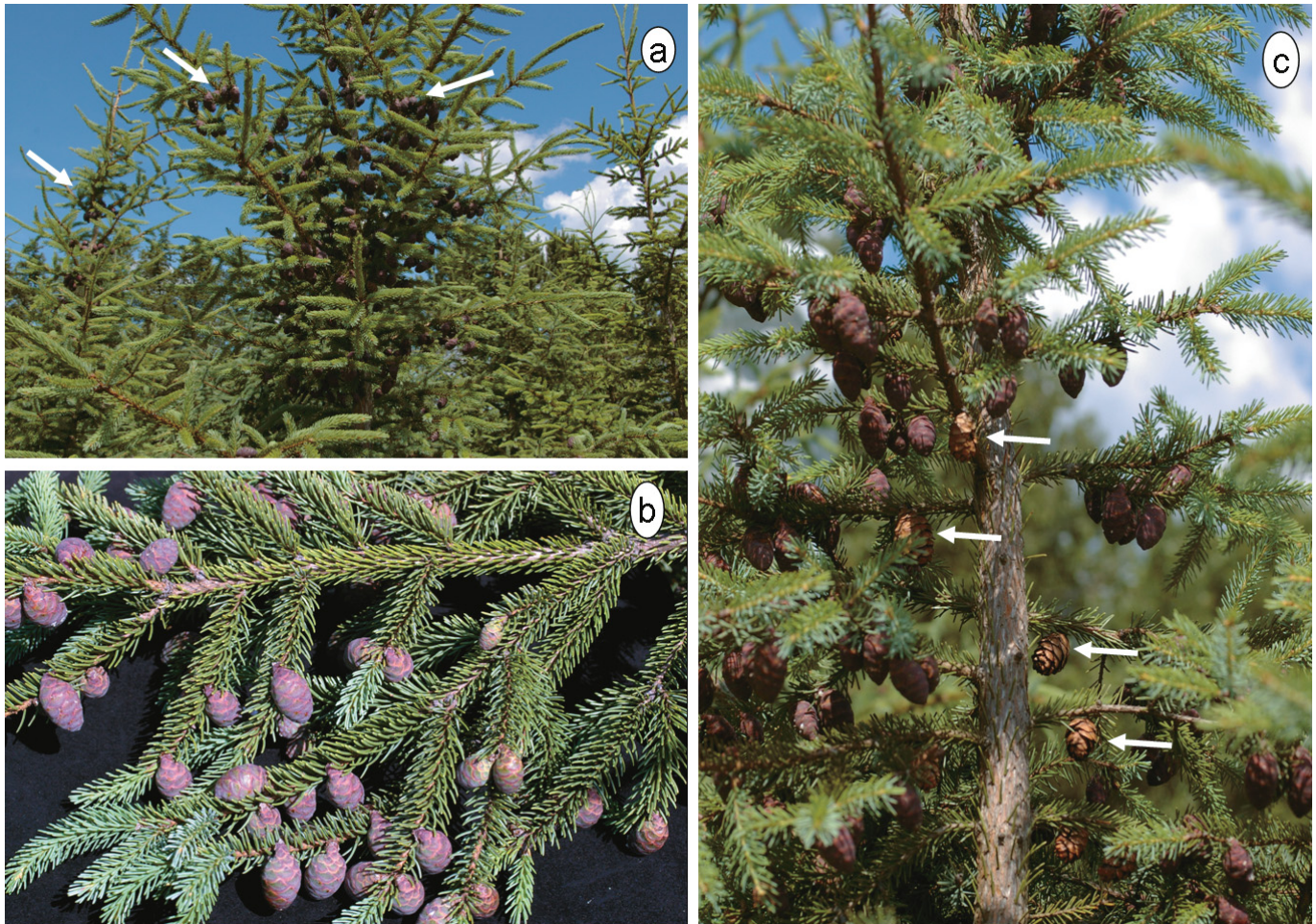
Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant la procédure GLIMMIX de SAS 9,1 (SAS Institute Inc., Cary, Caroline du Nord). Les hypothèses de normalité et d'homogénéité des variances ont été vérifiées. À l'intérieur de chaque CDO, les comparaisons des moyennes entre les clones, les CDO et les vergers ont été effectuées à l'aide d'une méthode de simulation ajustée de SAS (ADJUST = SIMULATE) vis-à-vis des seuils (Hsu 1996; Westfall et al. 1999). Des contrastes orthogonaux ont été également effectués pour comparer les moyennes des CS aussi bien avec les CDO qu'avec les vergers à graines. Le seuil de signification des tests a été fixé à 5 %.

Résultats

Floraison

À partir du printemps 2001, soit 4 ans seulement après la mise en terre des plants, 4 des 16 CS du test ont produit une quantité importante de fleurs femelles. Pour chacun des 4 CS, la floraison était inégale selon les ramets (données non publiées). Deux ans plus tard, 6 nouveaux CS étaient entrés en production, soit 62 % des clones présents dans le test. À partir de 2006, tous les CS présents dans le test ont débuté la production de fleurs femelles, de plus les observations montraient que toutes les copies de chaque clone fleurissant portaient des quantités équivalentes de fleurs (données non publiées). Pour ces mêmes années, les témoins zygotiques

Fig. 1. Floraison de clones somatiques d'épinette noire installés dans le test de clones : (a) floraison femelle observée dans le tiers supérieur de deux clones somatiques sur les clones somatiques (flèches) d'épinette noire; (b) branche du clone somatique M237 portant une grande quantité de cônes femelles, les dimensions moyennes des cônes sont 27 mm × 14 mm (longueur × largeur, données non publiées); (c) section du clone M237 portant des fleurs femelles et des cônes de l'année précédente (identifiés par des flèches) (photos F. Colas et M.S. Lamhamedi, ministère des Ressources naturelles et de la Faune du Québec).



mis en terre dans le test clonal n'ont produit ni fleurs mâles ni fleurs femelles.

Les fleurs femelles produites par tous les CS étaient morphologiquement identiques à celles produites par des arbres jeunes ou matures d'EPN, qu'ils soient en vergers à graines, en plantation ou en forêt naturelle. Les fleurs femelles étaient situées dans le tiers supérieur de la cime sur des branches âgées de 2 ans (fig. 1a), elles ont été réceptives durant 5 jours environ, ce qui était comparable à ce qui a été observé la même année (2003) dans un verger d'EPN situé au voisinage du test de clones. Les fleurs se sont développées en cônes d'apparence normale (fig. 1b), qui sont arrivés à maturité au début du mois de septembre. Les cônes produits par les CS avaient la même taille que ceux portés par les arbres du verger à graines voisin. Le nombre total de cônes récoltés pour chaque CS ou CDO variait entre 216 et 907.

À partir de 2004, soit 7 ans après la mise en terre, nous avons observé la formation de cônes mâles sur deux CS : M245 et M227. Le pollen qui en a été extrait avait une viabilité, respectivement, de 79 et 85 %. Les tubes polliniques

produits étaient normaux. En 2006, 5 CS supplémentaires ont produit des fleurs mâles. La viabilité des lots de pollen variait alors de 66 à 90 %. Quelle que soit l'année, la période de dissémination du pollen produit par les CS était la même que celle observée dans le verger à graines d'EPN voisin.

Nos observations annuelles conduites jusqu'au printemps 2008 montrent que lorsqu'un CS a débuté la floraison, qu'elle soit femelle ou mâle, celle-ci se maintient au fil des années (fig. 1c), et son intensité est variable selon les clones et les années semencières. Par exemple, en 2006, année de floraison importante, on a pu observer que 14 CS sur les 16 du test clonal avaient produit des fleurs mâles ou femelles ou les deux, et les témoins zygotiques n'en avaient produit aucune.

Caractérisation des graines

En 2003, la quantité de graines produites par les différents CS était variable (tableau 1). En effet, le nombre de graines pleines par cône variait de 2,9 pour le clone M233 à 15,4 pour le clone M226. Au sein d'une même famille, les don-

Tableau 1. Nombre de graines par cône et masse de 1000 graines des graines produites par les clones somatiques et les croisements dirigés d'origine (CDO), ainsi que les témoins issus des vergers à graines conventionnels (VGC).

Source	Nombre de graines/cône*	Masse des graines		
		Masse 1000 graines (g)	Différence vs. CDO [†] (%)	Différence vs. VGC [‡] (%)
M226	15,4	1,684	+14,2	+17,6
M227	13,5	1,646	+11,6	+14,9
M229	3,5	1,390	-5,8	-2,9
CDO 1	12,6	1,475	—	+3,0
M233	2,9	1,886	+32,7	+31,7
M237	7,1	1,351	-4,9	-5,7
M241	6,3	1,687	+18,7	+17,8
CDO 2	3,7	1,421	—	-0,8
M245	13,6	1,540	+40,4	+7,5
CDO 3	18,3	1,097	—	-23,4
M225 [§]	7,2	1,290	—	-9,9
M228 [§]	5,8	1,296	—	-9,5
M240 [§]	4,0	1,453	—	+1,5
VGC	—	1,432	—	—

*Nombre de graines / cône = $\frac{\text{nombre de graines pleines}}{\text{nombre de cônes récoltés}}$

[†]D_{CDO}(%) = $\frac{(\text{masse 1000 graines CS} - \text{masse 1000 graines CDO})}{(\text{masse 1000 graines CDO})} \times 100$

[‡]D_{VGC}(%) = $\frac{(\text{masse 1000 graines CS} - \text{masse 1000 graines VGC})}{(\text{masse 1000 graines VGC})} \times 100$

[§]Pour les clones M225, M228 et M240, nous n'avons pu reproduire le CDO, donc seule la comparaison avec le VGC est possible.

nées étaient assez similaires à l'exception de la famille 1 où le nombre de graines pleines par cône du clone M229 était près de quatre fois inférieur à celui de son CDO et des autres CS.

La masse de 1000 graines varie selon le CS et le CDO (tableau 1). Les graines produites par les CS appartenant à la même famille étaient plus lourdes que celles du CDO correspondant dans cinq cas sur sept.

La comparaison des masses des graines produites par les CS et les VGC fait apparaître des différences plus importantes. Si l'on excepte les CS M229 et M237, les lots de CS avaient une masse de 1000 graines en moyenne supérieure à celle du lot de VGC.

Les données sur les dimensions des graines sont regroupées dans le tableau 2; l'effet source des semences était significatif ($p < 0,0001$) pour toutes ces variables. Les différences observées sont faibles et certainement dues à l'analyse de la totalité des graines obtenues pour chacun des lots. Au sein de chacune des familles, on observe des différences significatives pour la surface projetée, la longueur et la largeur rectiligne des graines. En moyenne, les graines de CS sont plus grosses que les graines de CDO (à une exception M229), elles ont sensiblement les mêmes dimensions que les graines de VGC.

La comparaison des moyennes des caractéristiques des graines à l'aide des contrastes orthogonaux a révélé des différences significatives ($p < 0,0001$) pour toutes les valeurs.

Les données relatives à la germination des graines en milieu artificiel sont regroupées dans le tableau 2. L'effet source des semences était significatif ($p < 0,0001$) pour toutes ces variables. Les semis de CS ont un développement similaire à celui des CDO et des VGC, et les différentes parties des semis ne présentent aucune anomalie de développe-

ment (fig. 2). En moyenne, les lots de graines ont une germination très élevée ne présentant pas de variation intra-familiale, à l'exception du clone M233 dont la germination est significativement plus faible (84 %) que les CS et le CDO (supérieure à 96 %). Le même type d'observation est fait avec la valeur germinative qui est en moyenne très élevée (supérieure à 31, sauf pour le clone M233 où elle est de 22,6 seulement). La comparaison des données de germination à l'aide des contrastes orthogonaux n'a pu mettre en évidence qu'une différence significative ($p < 0,0001$) pour la valeur germinative (tableau 2).

Croissance, statut nutritionnel et performance des plants en pépinière et en plantation

L'analyse statistique des données de croissance (hauteur, diamètre au collet, masse des parties aériennes et des racines) et du statut nutritionnel des plants (contenu en N, P, K, Ca et Mg, efficacité d'utilisation des éléments minéraux) n'a pas permis de mettre en évidence des différences significatives entre les clones, les CDO et les VGC, que ce soit à la fin de la première ou de la deuxième saison de croissance des plants en conditions de pépinière forestière. Également, on n'observait pas non plus de variabilité intra-familiale. Ainsi, après 2 années de croissance en pépinière, les valeurs moyennes de la hauteur ($39,8 \pm 0,35$ cm), du diamètre ($4,95 \pm 0,06$ mm), de la masse des racines ($2,4 \pm 0,7$ g) et des parties aériennes ($5,6 \pm 0,07$ g) étaient similaires aux valeurs des productions de plants (2+0) de l'EPN issus des vergers à graines (fig. 3). Pour la nutrition minérale, les moyennes des concentrations foliaires en azote, phosphore et potassium à la fin de la deuxième saison de croissance avaient atteint respectivement $1,49 \pm 0,02$, $0,22 \pm 0,00$ et $0,68 \pm 0,01$ %.

Tableau 2. Probabilités et degrés de liberté (numérateur et dénominateur) observés pour l'effet source associés à l'analyse de variance, ainsi que la comparaison des moyennes ajustées de la germination (pourcentage de germination et valeur germinative) et des dimensions (surface projetée, longueur et largeur rectiligne) des différents lots de graines produits par les clones somatiques (CS), les croisements dirigés d'origine (CDO) et les vergers à graines conventionnels (VGC).

	Germination		Dimensions des graines			n*
	%	Valeur germinative	Surface projetée (mm ²)	Longueur rectiligne (mm)	Largeur rectiligne (mm)	
dln†	13	13	13	13	13	
dld‡	46	46	33714	33714	33714	
Effet source	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	
Source§						
M226	96,5±1,0a	38,9±1,1b	2,36±0,005c	2,46±0,004d	1,32±0,002e	2336
M227	96,0±1,0a	38,2±1,1ab	2,39±0,005d	2,51±0,004e	1,30±0,002d	2069
M229	97,8±1,0a	35,3±1,1ab	2,07±0,006a	2,34±0,004a	1,24±0,003c	1806
CDO 1	97,3±1,0a	34,9±1,1ab	2,12±0,005b	2,40±0,004b	1,22±0,002b	2168
VGC	96,3±0,7a	33,6±0,8a	2,36±0,004c	2,43±0,003c	1,36±0,002a	4778
M233	84,5±1,0a	22,6±1,1a	2,64±0,008e	2,68±0,006e	1,35±0,004c	872
M237	93,3±1,1b	40,1±1,2c	2,13±0,003b	2,52±0,002c	1,17±0,002a	5060
M241	98,3±1,0b	38,6±1,1c	2,56±0,005d	2,58±0,004d	1,38±0,002d	2080
CDO 2	98,3±1,0b	37,2±1,1bc	2,11±0,007a	2,32±0,005a	1,24±0,003b	1418
VGC	96,3±0,7b	33,6±0,8b	2,36±0,004c	2,43±0,003b	1,36±0,002c	4778
M245	96,5±1,0a	40,2±1,1b	2,44±0,005c	2,64±0,004c	1,32±0,002b	2337
CDO 3	95,3±1,0a	30,0±1,1a	1,91±0,005a	2,31±0,004a	1,19±0,002a	2246
VGC	96,3±0,7a	33,6±0,8a	2,36±0,004b	2,43±0,003b	1,36±0,002c	4778
M225	99,8±1,0a	40,2±1,1b	2,10±0,005a	2,43±0,004a	1,22±0,002a	2153
M228	99,3±1,0a	37,3±1,1ab	2,12±0,004a	2,47±0,003b	1,22±0,002a	4464
M240	96,0±1,0a	33,2±1,1a	2,22±0,008b	2,49±0,005b	1,24±0,003b	1018
VGC	96,3±0,7a	33,6±0,8a	2,36±0,004c	2,43±0,003a	1,36±0,002c	4778
Contrastes orthogonaux						
CS vs. VGC	0,5149	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	
CS vs. CDO	0,0975	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	

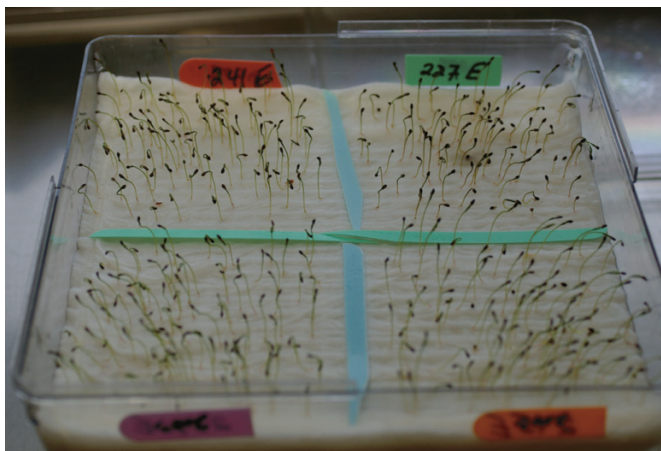
*Nombre de graines utilisé pour déterminer les dimensions des graines.

†Degrés de liberté au numérateur.

‡Degrés de liberté au dénominateur.

§Les moyennes suivies de lettres distinctes présentent des différences significatives au seuil de 5 % (ADJUST = SIMULATE), la lettre a est attirée à la valeur minimale.

Fig. 2. Test de germination, en milieu artificiel, des graines produites par les clones M227 et M241 après 11 jours de culture (photos F. Colas et M.S. Lamhamedi, ministère des Ressources naturelles et de la Faune du Québec).

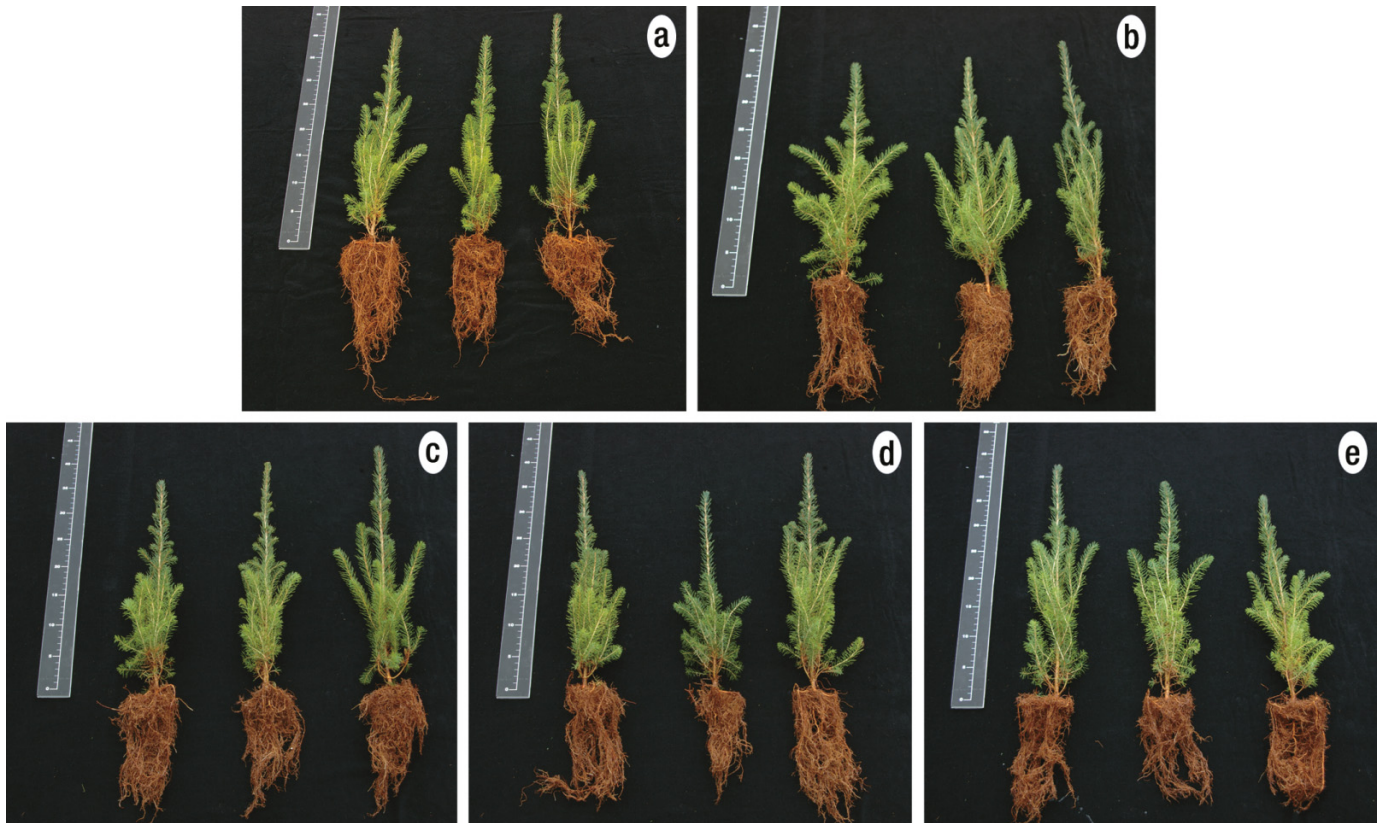


En ce qui concerne la performance en plantation, le taux de survie était de 98,7 % et 97,5 % après, respectivement, 1 et 2 ans sur le terrain (fig. 4). Le développement de tous les CS, ainsi que la croissance en hauteur et en diamètre étaient similaires à ceux observés pour les plants issus de VGC ou CDO.

Discussion

La phase reproductive d'un arbre d'EPN issu de semis débute autour de 10 ans (Youngblood et Safford 2008). Cependant, l'EPN présente une tendance à la floraison précoce, elle a été observée à l'âge de 6 ans pour des arbres cultivés en vergers à graines (Morgenstern et Fowler 1969; Caron 1995). Cette tendance est accentuée lorsque les arbres sont placés dans des conditions optimales de culture et d'accès à la lumière, ce qui est le cas en verger à graines où les sites sont soigneusement sélectionnés, l'espacement entre les arbres est optimisé et une fertilisation régulière est appliquée (Sweet 1975; Caron 1995).

Fig. 3. Plants produits en récipient IPL 25 × 350A après deux saisons de culture en pépinière à partir de graines de : (a) croisement dirigé d'origine 1; (b) verger à graines conventionnel; (c) clone M226; (d) clone M227; (e) clone M229 (photos F. Colas, M.S. Lamhamedi et M. Renaud, ministère des Ressources naturelles et de la Faune du Québec).



La floraison précoce, telle que définie par Zimmerman (1972), est un caractère très recherché par les aménagistes de vergers à graines, car il permet d'accélérer la diffusion des gains génétiques escomptés pour la production de plants. Afin d'accélérer la production des cônes dans les vergers à graines, plusieurs méthodes d'induction florale ont été développées, citons la fertilisation (Sweet 1975; Edwards 1986), l'injection de gibbérellines GA4/7 dans le tronc (Bonnet-Masimbert et Zaerr 1987; Smith et Greenwood 1995), le cernage racinaire et l'annélation du tronc (Valadon et Philippe 1991). Tous ces traitements peuvent également être combinés et (ou) alternés (Parkinson 1989; Smith et Adam 2003; Cherry et al. 2007). Cependant, les traitements d'induction florale ne font qu'interrompre temporairement la phase juvénile des arbres. Tant que la maturité sexuelle des arbres n'est pas atteinte, la floraison ne sera maintenue que si les traitements d'induction sont poursuivis.

Lors de sa plantation en 1997, la durée de vie anticipée du test clonal de notre étude était de 5 ans. Sa vocation étant d'être un test précoce (Nanson 2004), la densité de plantation était élevée (1 m × 1 m). Au fil de leur développement, les arbres sont devenus très serrés, ayant un accès de plus en plus limité à la lumière et aux autres ressources comme l'eau et les éléments minéraux. De surcroît, en raison de l'objectif initial du test, les arbres n'ont été fertilisés que l'année de la plantation pour assurer leur reprise. Les CS présents dans le test étaient donc cultivés dans des conditions de plantation permettant l'expression de leur potentiel génétique mais assez peu favorables à la stimulation de la

floraison, ce qui n'a pas empêché certains CS de fleurir précocement dès l'âge de 4 ans, alors que les témoins zygotiques présents dans le test n'avaient toujours pas débuté leur floraison en 2008. Ceci indique clairement que la floraison observée ne peut être reliée qu'à l'expression du potentiel de floraison de chaque clone et non à des traitements cultureux favorables à l'initiation florale, et donc que l'âge de la maturité sexuelle est devancé chez les CS d'EPN. D'ailleurs, pour tous les CS, une fois la floraison débutée, celle-ci s'est maintenue au fil des années, démontrant ainsi que les arbres avaient atteint précocement la maturité sexuelle (Hackett 1983; Greenwood et Hutchison 1993). Des copies des CS d'EPN de notre étude, ainsi que des CS différents, mais implantés dans d'autres régions du Québec, présentent également une floraison précoce du même ordre (résultats non publiés), ce qui corrobore nos résultats.

Nous avons également observé, dans différents tests de clones, l'apparition précoce de fleurs femelles et la formation des cônes chez des CS de mélèze hybride (*Larix × marschlinsii* Coaz) et d'épinette blanche (*Picea glauca* (Moench) Voss) aux âges respectifs de 3 et 6 ans (données non publiées). Or, en conditions naturelles, les mélèzes du Japon et d'Europe, parents de l'hybride, ne débutent leur floraison, respectivement qu'à 10 et 15 ans (Shearer 2008), et l'épinette blanche entre 15 et 25 ans (Leadem et al. 1997). À notre connaissance, aucune publication scientifique n'a rapporté des résultats propres à la floraison des CS, seule une allusion a été faite par Helmersson et al. (2008) qui ont observé que des plants somatiques d'épinette de

Fig. 4. Vue de la plantation des plants produits à partir des graines issues de clones somatiques d'épinette noire, 2 ans après la mise en terre. Comportement et croissance normaux des plants produits à partir de graines issues de clones somatiques, 2 ans après la mise en terre (photos F. Colas et M.S. Lamhamedi, ministère des Ressources naturelles et de la Faune du Québec).



Norvège, dont l'âge n'était pas spécifié, ont fleuri à la même période que des arbres de la même espèce issus de semis conventionnels.

Différentes hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette maturité sexuelle précoce observée chez les CS. Serait-ce dû à un vieillissement accéléré en raison du passage par la voie de l'ES? Les CS ont-ils été cultivés dans des conditions particulières et stressantes favorisant l'apparition précoce de la floraison? La voie de l'ES a-t-elle favorisé la stimulation précoce des gènes responsables de la floraison?

La floraison est un phénomène physiologique contrôlé par l'interaction d'un complexe de plusieurs gènes, et la transition du développement végétatif vers le développement reproductif est généralement associée à la modification de l'expression de certains gènes des méristèmes apicaux (Hackett 1983; Bernier et Périlleux 2005; Glover 2007). L'expression de ces gènes est variable selon les essences, et l'initiation de leur expression dépend de stimuli différents selon les espèces (Bernier et Périlleux 2005).

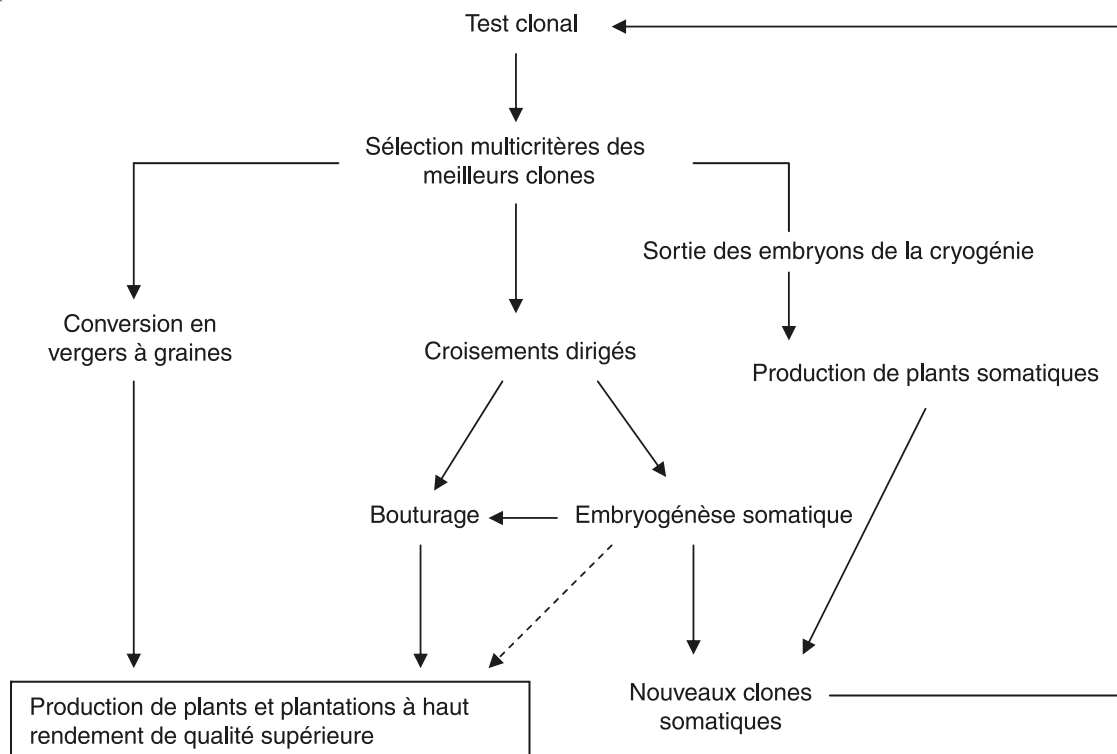
Dès 1985, McKeand (1985) évoque la possibilité que les stress subis par les cellules de pin à l'encens (*Pinus taeda* L.) cultivées in vitro à partir de tissu embryonnaire juvénile, notamment lors de la phase d'acclimatation, favoriseraient une maturation accélérée qui aurait pour conséquence, ici, l'apparition d'une floraison précoce. Cette hypothèse a été

reprise par Meilan (1997) qui parle plutôt des conditions de croissance in vitro en général qui induiraient la maturation des tissus. Toutefois, la nature des stress incriminés reste inconnue. Peu de données sont actuellement disponibles dans la littérature tant sur les arbres forestiers que sur d'autres espèces. Hackett (1987) rapporte que des embryons provenant de cals d'embryons zygotiques de palmier dattier ont fleuri à l'état embryonnaire, alors que les embryons zygotiques non induits n'ont pas fleuri avant plusieurs années. Gupta et al. (1991) ont montré que des espèces ligneuses comme le teck (*Tectona grandis* L. f.) et le tamarin (*Tamarindus indica* L.) produites par micropropagation (culture de bourgeons ou de méristèmes) présentent une floraison précoce, cela n'a cependant pas été le cas pour les gymnospermes qu'ils ont étudiés (sapin Douglas (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) et araucaria de Chine (*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook)).

De ce qui précède, nous supposons que la floraison précoce observée chez nos CS d'EPN a été provoquée par une stimulation précoce des gènes responsables de la floraison en réponse aux différents stress subis lors des différentes phases de l'ES.

Puisque la floraison débute à un stade précoce du développement des arbres, nous avons vérifié que les fleurs produites sont similaires à celles produites par des arbres issus

Fig. 5. Schéma illustrant l'intégration potentielle de l'embryogénèse somatique dans le programme de reboisement et d'amélioration génétique de l'épinette noire.



de semis conventionnels. Les fleurs femelles se retrouvent dans le tiers supérieur de la cime, ce qui est semblable à ce qui est observé sur des arbres en milieu naturel et décrit dans la littérature (Caron et Powell 1992; Bégin et Filion 1999), elle s'est maintenue au fil des années de floraison. Lors des premières années de floraison, seules des fleurs femelles ont été observées sur les CS, puis des fleurs mâles ont été observées 3 à 4 années plus tard, ce qui est conforme à ce qui est observé pour des arbres issus de semis conventionnels (Simpson et Powell 1981; Ross et Pharis 1987).

Le début de la période de réceptivité des fleurs femelles observée ainsi que sa durée est comparable à ce qui a été noté, pour les mêmes années, dans les vergers à graines et en nature. Il en est de même pour la durée de dissémination et la viabilité du pollen produit par les CS. De plus, la floraison n'a pas été sporadique, mais continue entre 2003 et 2008. Tout ceci montre que les CS produisent des fleurs dont le comportement est en tout point identique à celui des fleurs produites par des arbres issus de semis ou de greffes.

Les dimensions des graines (surface projetée, longueur et largeur rectilignes) produites par les différents CS et les CDO présentent une importante variabilité intrafamiliale, et les graines de CDO sont, à une exception près, toujours plus petites que les graines de CS. Il est connu que les conditions environnementales du site où sont produites les graines ont une influence sur leur composition et leurs dimensions (Morgenstern 1969) et que la masse des graines est un caractère d'ascendance maternelle (Castro 1999). Les CS et les arbres des CDO ont été cultivés sur le même site dont la composition est homogène, et les graines des CS et CDO ont été produites dans les mêmes conditions environnementales. Ainsi, les différences observées au niveau des

dimensions des graines sont attribuables au caractère intrinsèque du CS ou du CDO. Il faut également noter que, bien que les différences observées soient assez faibles, c'est l'importance du nombre de graines analysées qui rend ces différences significatives. En effet, comme cette étude étant la première du genre, nous avons analysé toutes les graines produites afin d'être sûrs de déceler toute variation potentielle. En conclusion, il faut retenir que les graines produites par les CS sont semblables pour leurs dimensions à celles produites par les CDO et les VGC.

Les taux de germination obtenus en conditions contrôlées ont été supérieurs à 96 %, ce qui est conforme aux valeurs habituellement obtenues avec l'EPN. Un seul clone a eu une germination inférieure, ce qui était surprenant puisque celui-ci avait produit les graines les plus lourdes de tout l'essai. En effet, des graines plus lourdes et plus grosses ont une meilleure capacité à germer (Skeates et Haavisto 1995).

Les faibles différences, bien que significatives, observées au niveau des dimensions et de la masse des graines, ne sont pas perceptibles lors de l'analyse des données morphophysiologiques des plants après leur deuxième année de croissance en pépinière. Ceci est conforme à ce qui a été observé dans la littérature (Chaisurisri et al. 1994). Ces mêmes analyses ne permettent pas de mettre en évidence de différence significative entre les trois sources de graines, que ce soit pour la morphologie des plants (hauteur, diamètre, masse totale) ou l'efficacité d'utilisation des éléments (N, P et K) montrant ainsi que les graines produites par des CS ont un comportement en tout point semblable à ce qui est observé avec des graines produites par des arbres issus de greffes ou de semis conventionnels, et donc que ces graines peuvent être utilisées pour la production de plants destinés au reboisement.

Conclusion et perspectives d'avenir

Nos résultats démontrent pour la première fois que des clones d'EPN produits par ES présentent une floraison précoce par rapport aux arbres cultivés en verger à graines, soit seulement 6 ans après leur mise en terre et ce, sans que les arbres aient été cultivés intensivement (pas de fertilisation ni de traitements d'induction florale). Les fleurs sont fonctionnelles et produisent des graines et du pollen de qualité. Les fleurs femelles ont généré des cônes qui contiennent des semences dont les taux de germination étaient similaires à ceux des semences issues des vergers à graines. Les graines produites par ces clones permettent la production de plants de qualité ayant, après deux saisons de croissance en pépinière, les mêmes caractéristiques morphophysiologiques que ceux produits à partir de graines de vergers. Ces plants ont également montré une bonne croissance et un excellent taux de survie en plantation après 2 ans. Il est donc envisageable d'intégrer les CS d'élite, sélectionnés selon une approche multi-critères (croissance, architecture de la cime, degré de branchaison, densité du bois, etc.) comme sources de semences et de pollens. Nous proposons, à la figure 5, un schéma qui détaille quelles sont les différentes possibilités qui s'offrent pour l'utilisation des CS comme semenciers, que ce soit la conversion des tests de clones en vergers à graines ou l'utilisation des CS comme parent pour des croisements dirigés dont les graines seraient utilisées pour la production de nouveaux CS.

Cette intégration des CS permettrait des économies d'échelle importantes pour l'aménagement des sources de semences, puisque les fonds investis dans l'implantation des tests de clones seraient rentabilisés par la conversion, après élimination des clones les moins performants, de ces tests en vergers à graines. La répartition initiale des CS dans les tests de clones devra donc tenir compte de cette opportunité afin de limiter la possibilité de réaliser des croisements entre clones apparentés. De plus, avec les risques de mortalité lors de l'implantation des vergers et la récurrence des feux qui sont très fréquents en forêt boréale (Stocks et al. 2002) et qui pourrait augmenter à cause des changements climatiques (Williamson et al. 2009), nous aurons l'avantage d'avoir toujours et très rapidement des copies de remplacement des CS utilisés. En effet, le tissu embryogène de chaque arbre est conservé dans l'azote liquide, ce qui permet la production des plants en tout temps. Ceci est un avantage indéniable sur les autres méthodes de multiplication végétative où une contrainte physiologique (vieillesse des pieds-mères et son impact négatif sur l'enracinement des boutures) ou technique (accessibilité à des greffons rapidement) vient limiter la production du matériel de remplacement. À cet égard, l'ES constitue une technique idéale de conservation à long terme du matériel génétique performant et de protection des investissements alloués aux programmes d'amélioration génétique pendant plusieurs années.

En outre, l'ajout de nouveau matériel génétique, via la sélection des CS d'élite, va pouvoir enrichir les programmes d'amélioration génétique et accroître plus rapidement les gains génétiques dans les futures générations. La floraison hâtive sera également un avantage en permettant un raccourcissement des délais de production de semences entre les nouvelles générations et une rentabilité accrue des programmes d'amélioration génétique.

Des travaux en génétique moléculaire pourraient être initiés afin de comprendre quels sont les mécanismes génétiques mis en jeu pour l'induction d'une floraison hâtive, et d'en tirer le meilleur parti.

Remerciements

Le test clonal a été installé par Patrick Lemay et Guildo Gagnon sous la supervision de Pierre Périnet et Michel Villeneuve. Les plants somatiques ont été produits par le laboratoire de culture in vitro de Francine M. Tremblay, Ph.D., de l'Université Laval dans le cadre d'une subvention octroyée par le MRNF (n° 032540). Le travail de terrain et de laboratoire a été effectué par Carol Parent, Monique Pelletier et Mario Renaud, tous de la Direction de la recherche forestière. Les analyses chimiques ont été réalisées par le personnel du laboratoire de chimie organique et inorganique de la Direction de la recherche forestière. Les plants ont été produits à la pépinière forestière de Saint-Modeste par l'équipe de Corine Rioux, et les coûts de production ont été assumés par la Direction générale des Pépinières et des Stations piscicoles. Les analyses statistiques ont été réalisées par Geneviève Picher de l'équipe Biométrie de la Direction de la recherche forestière. L'appui financier à ce projet, accordé à Fabienne Colas en collaboration avec Mohammed S. Lamhamedi, a été assuré par le MRNF (n° 1120549-112310084, <http://www.mrnf.gouv.qc.ca/publications/enligne/forets/activites-recherche/projets/description.asp?numero=314>). Nos remerciements s'adressent également à l'éditeur associé ainsi qu'aux deux réviseurs anonymes pour leurs commentaires et suggestions très détaillés qui ont permis de bonifier ce manuscrit.

Bibliographie

- Beaulieu, J., Corriveau, A., et Daoust, G. 1989. Stabilité phénotypique et délimitation de zones d'amélioration de l'épinette noire au Québec. Centre de foresterie des Laurentides, Forêts Canada. LAU-X-85.
- Bégin, C., et Filion, L. 1999. Black spruce (*Picea mariana*) architecture. *Rev. can. bot.* **77**(5) : 664–672. doi:10.1139/cjb-77-5-664.
- Bernier, G., et Périlleux, C. 2005. A physiological overview of the genetics of flowering time control. *Plant Biotechnol. J.* **3**(1) : 3–16. doi:10.1111/j.1467-7652.2004.00114.x. PMID:17168895.
- Bomal, C., et Tremblay, F.-M. 2000. Dried cryopreserved somatic embryos of two *Picea* species provide suitable material for direct plantlet regeneration and germplasm storage. *Ann. Bot. (Lond.)*, **86**(1) : 177–183. doi:10.1006/anbo.2000.1176.
- Bonnet-Masimbert, M., et Zaerr, J.B. 1987. The role of plant growth regulators in promotion of flowering. *Plant Growth Regul.* **6**(1–2) : 13–35. doi:10.1007/BF00043948.
- Bramlett, D.L., et O'Gwynn, C.H. 1981. Controlled pollination. *Dans Pollen management handbook. Sous la direction de E.C. Franklin.* USDA, Forest Service, Wash., É.-U. p. 44–51.
- Brault, N., Mercier, S., et Bettez, M. 1996. Traitement des graines d'arbres forestiers : 2^e partie de 2. L'Aubelle, **113**(37) : 1–12.
- Bridgwater, F.E., et Trew, I.F. 1981. Supplemental mass pollination. *Dans Pollen management handbook. Sous la direction de E.C. Franklin.* USDA, Forest Service, Wash., É.-U. p. 52–57.
- Caron, G.-É. 1995. Seed-cone and pollen-cone production models for young black spruce seedling seed orchards: a first approximation. *Rev. can. rech. for.* **25**(6) : 921–928. doi:10.1139/x95-101.

- Caron, G.-É., et Powell, G.R. 1992. Patterns of cone distribution in crowns of young *Picea mariana*. I. Effect of tree age on seed cones. *Rev. can. rech. for.* **22**(1) : 46–55. doi:10.1139/x92-006.
- Castro, J. 1999. Seed mass versus seedlings performance in Scots pine: a maternally dependent trait. *New Phytol.* **144**(1) : 153–161. doi:10.1046/j.1469-8137.1999.00495.x.
- Chaisurisri, K., Edwards, D.G., et El-Kassaby, Y.A. 1994. Effects of seed size on seedling attributes in Sitka spruce. *New For.* **8**(1) : 81–87.
- Cheliak, W.M., et Klimaszewska, K. 1991. Genetic variation in somatic embryogenic response in open-pollinated families of black spruce. *Theor. Appl. Genet.* **82**(2) : 185–190. doi:10.1007/BF00226211.
- Cherry, M.L., Anekonda, T.S., Albrecht, J., et Howe, G.T. 2007. Flower stimulation in young miniaturized seed orchards of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*). *Rev. can. rech. for.* **37**(1) : 1–10. doi:10.1139/X06-199.
- Colas, F., et Mercier, S. 2000. Évaluation et maintien de la viabilité des pollens utilisés dans le programme d'amélioration des arbres. Gouvernement du Québec, ministère des Ressources naturelles, Forêt Québec, Direction de la recherche forestière. Mémoire de recherche forestière 135. Disponible au <http://www.mrnf.gouv.qc.ca/publications/forets/connaissances/recherche/Colas-Fabienne/Memoire135.pdf>.
- Czabator, F.J. 1962. Germination value: an index combining speed and completeness of pine seed germination. *For. Sci.* **8**(4) : 386–396.
- Dean, C.A. 2008. Genetic parameters of somatic clones of coastal Douglas-fir at 51/2 years across Washington and Oregon, USA. *Silvae Genet.* **57**(4–5) : 269–275.
- Edwards, I.K. 1986. Review of literature on fertilization and conifer seed production. Northern Forestry Centre, Canadian Forestry Service, Government of Canada. Note 40.
- Girard, D., Gagnon, J., et Langlois, C.-G. 2001. Plantec : un logiciel pour gérer la fertilisation des plants dans les pépinières forestières. Direction de la recherche forestière, Ministère des Ressources naturelles, Gouvernement du Québec. Note de recherche forestière 111. Disponible au <http://www.mrnf.gouv.qc.ca/publications/forets/connaissances/recherche/Gagnon-Jean/Note111.pdf>.
- Glover, B.J. 2007. Understanding flowers and flowering. An integrated approach. Oxford University Press, New York, É.-U.
- Greenwood, M.S., et Hutchison, K.W. 1993. Maturation as a developmental process. *Dans* Clonal forestry. *Sous la direction de* M.R. Ahuja et W.J. Libby. Springer-Verlag, Berlin, Allemagne. p. 14–33.
- Grossnickle, S., et Folk, R. 2007. Field performance potential of a somatic interior spruce seedlot. *New For.* **34**(1) : 51–72.
- Gupta, P.K., Timmis, R., et Mascarenhas, A.F. 1991. Field performance of micropropagated forestry species. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **27**(4) : 159–164.
- Hackett, W.P. 1983. Phase change and intra-clonal variability. *HortScience*, **18**(6) : 840–844.
- Hackett, W.P. 1987. Juvenility and maturity. *Dans* Cell and tissue culture in forestry. Vol. 1. General principles and biotechnology. *Sous la direction de* J.M. Bonga et Don J. Durzan. Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht, Pays-Bas. p. 216–231.
- Helmersson, A., Jansson, G., Bozhkov, P.V., et Von Arnold, S. 2008. Genetic variation in microsatellite stability of somatic embryo plants of *Picea abies*: a case study using six unrelated full-sib families. *Scand. J. For. Res.* **23**(1) : 2–11. doi:10.1080/02827580701820043.
- Ho, R.H. 1991. A guide to pollen- and seed-cone morphology of black spruce, white spruce, jack pine and eastern white pine for controlled pollination. Ontario Forest Research Institute, Ontario Ministry of Natural Resources, Sault Sainte Marie, Ont., Canada.
- Hsu, J.C. 1996. Multiple comparisons theory and methods. Chapman & Hall, London, Royaume-Uni.
- ISTA. 2009. Règles internationales pour les essais de semences 2009. International Seed Testing Association, Bassersdorf, Suisse.
- Jain, S.M., et Gupta, P.K. (*Directeurs de la rédaction*). 2005. Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. Springer, Dordrecht, Pays-Bas.
- Lamhamedi, M.S., et Bernier, P.Y. 1994. Ecophysiology and field performance of black spruce (*Picea mariana*): a review. *Ann. Sci. For.* **51**(6) : 529–551. doi:10.1051/forest:19940601.
- Lamhamedi, M.S., et Tousignant, D. 2008. Clonal variations in *Picea abies* stockplants produced by somatic embryogenesis and their use in cutting propagation programs. *Dans* IUFRO–CTIA 2008 Joint Conference — Adaptation, Breeding and Conservation in the Era of Forest Tree Genomics and Environmental Change, Québec, Qué., 25 au 28 août 2008. p. 198. Disponible au <http://www.mrnf.gouv.qc.ca/activite/iufro-acaap/pdf/Lamhamedi-Tousignant-affiche.pdf>.
- Lamhamedi, M.S., Chamberland, H., Bernier, P.Y., et Tremblay, F.M. 2000. Clonal variation in morphology, growth, physiology, anatomy and ultrastructure of container-grown white spruce somatic plants. *Tree Physiol.* **20**(13) : 869–880. PMID:11303577.
- Lamhamedi, M.S., Chamberland, H., et Tremblay, F.M. 2003a. Epidermal transpiration, ultrastructural characteristics and net photosynthesis of white spruce somatic seedlings in response to in vitro acclimatization. *Physiol. Plant.* **118**(4) : 554–561. doi:10.1034/j.1399-3054.2003.00146.x.
- Lamhamedi, M.S., Margolis, H.A., Renaud, M., Veilleux, L., et Auger, I. 2003b. Effets de différentes régies d'irrigation sur la croissance, la nutrition minérale et le lessivage des éléments nutritifs des semis d'épinette noire (1+0) produits en récipients à parois ajourées en pépinière forestière. *Rev. can. rech. for.* **33**(2) : 279–291. doi:10.1139/x02-171.
- Lamhamedi, M.S., Colas, F., Tousignant, D., Tremblay, L., Rainville, A., Guay, J.-Y., Ouellette, C., et Rioux, M. 2006a. Intégration de l'embryogenèse somatique dans la filière de plants forestiers du Québec. *Dans* 4^e Atelier sur la production de plants forestiers au Québec. *Sous la direction de* ministère des Ressources naturelles et de la Faune, Sainte-Foy, Qué.
- Lamhamedi, M.S., Labbé, L., Margolis, H.A., Stowe, D.C., Blais, L., et Renaud, M. 2006b. Spatial variability of substrate water content and growth of white spruce seedlings. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **70**(1) : 108–120. doi:10.2136/sssaj2005.0109.
- Lamontagne, Y. 1992. Vergers à graines de première génération et tests de descendance implantés au Québec pour les espèces résineuses : bilan des réalisations. Direction de la recherche, ministère des Forêts, Gouvernement du Québec, mémoire de recherche forestière 106.
- Langlois, C.-G., et Gagnon, J. 1993. A global approach to mineral nutrition based on the growth needs of seedlings produced in forest tree nurseries. *Dans* Plant nutrition — from genetic engineering to field practice. *Sous la direction de* N.J. Barrow. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Pays-Bas. p. 303–306.
- Leadem, C.L., Gillies, S.L., Yearsley, H.K., Sit, V., Spittlehouse, D.L., et Burton, P.J. 1997. Field studies of seed biology. *Sous la direction de* F. Aitken. B.C. Ministry of Forests, Research Branch, Victoria, C.-B.
- McKeand, S.E. 1985. Expression of mature characteristics by tissue culture plantlets derived from embryos of loblolly pine. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **110**(5) : 619–623.

- Meilan, R. 1997. Floral induction in woody angiosperms. *New For.* **14**(3) : 179–202.
- MER. 1990. La récolte de semences forestières. Ministère de l'Énergie et des Ressources, Les Publications du Québec, Québec, Qué.
- Morgenstern, E.K. 1969. Genetic variation in seedlings of *Picea mariana* (Mill.) BSP. I. Correlation with ecological factors. *Silvae Genet.* **18** : 151–161.
- Morgenstern, E.K. 1996. Geographic variation in forest trees: genetic basis and application of knowledge in silviculture. University of British Columbia Press, Vancouver, C.-B.
- Morgenstern, E.K., et Fowler, D.P. 1969. Genetics and breeding of black spruce and red spruce. *For. Chron.* **45**(6) : 408–412.
- Nanson, A. 2004. Génétique et amélioration des arbres forestiers. Les Presses agronomiques de Gembloux, Gembloux, Belgique.
- Parent, B. 2008. Aménagement forestier — production de plants (chap. 5). *Dans Ressources et industries forestières — Portrait statistique. Sous la direction de* Direction du développement de l'industrie des produits forestiers ministère des Ressources naturelles et de la Faune. Gouvernement du Québec, Québec, Qué. p. 05-05-01–05-06-34. Disponible au http://www.mrnf.gouv.qc.ca/publications/forets/connaissances/stat_edition_complete/chap05.pdf.
- Park, Y.-S. 2002. Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. *Ann. For. Sci.* **59**(5–6) : 651–656. doi:10.1051/forest:2002051.
- Parkinson, J. 1989. Cone induction in coastal seed orchards. *Silviculture*, **2**(2) : 11–12.
- Philippe, G., et Baldet, P. 1997. Electrostatic dusting: an efficient technique of pollination in larch. *Ann. Sci. For.* **54**(3) : 301–310. doi:10.1051/forest:19970307.
- Ross, S.D., et Pharis, R.P. 1987. Control of sex expression in conifers. *Plant Growth Regul.* **6**(1–2) : 37–60. doi:10.1007/BF00043949.
- Savary, A., Deshaies, A., et Lévesque, D. 2008. Zoom in on the seed production in Québec. *Dans Proceedings of the IUFRO–CTIA 2008 Joint — Adaptation, Breeding and Conservation in the Era of Forest Tree Genomics and Environmental Change. CTIA Tree Seed Working Group Workshop, Québec, 25 au 28 août 2008.* p. 47.
- Shearer, R.C. 2008. *Larix* P. Mill. larch. *Dans The woody plant seed manual. Sous la direction de* F. T. Bonner, et R.P. Karrfalt. USDA Forest Service. p. 637–650.
- Simpson, J.D., et Powell, G.R. 1981. Some factors influencing cone production on young black spruce in New Brunswick. *For. Chron.* **57**(6) : 267–269.
- Skeates, D.A., et Haavisto, V.F. 1995. Heavier black spruce seeds produce more vigorous seedlings. Canadian Forest Service–Ontario, Natural Resources Canada. Technical Note 31.
- Smith, R.F., et Adam, C.I.G. 2003. A manual for managing conifer seed orchards in eastern Canada. *Sous la direction de* Forest Genetics Ontario, Ontario Ministry of Natural Resources, Sault Ste. Marie, Ont.
- Smith, R., et Greenwood, M. 1995. Effects of gibberellin A_(4/7), root pruning and cytokinins on seed and pollen cone production in black spruce (*Picea mariana*). *Tree Physiol.* **15**(7–8) : 457–465. PMID:14965928.
- Stocks, B.J., Mason, J.A., Todd, J.B., Bosch, E.M., Wotton, B.M., Amiro, B.D., Flannigan, M.D., Hirsch, K.G., Logan, K.A., Martell, D.L., et Skinner, W.R. 2002. Large forest fires in Canada 1959–1997. *J. Geophys. Res.* **107**(D1) : 8149. doi:10.1029/2001JD000484.
- Sweet, G.B. 1975. Flowering and seed production. *Dans Seed orchards. Sous la direction de* R. Faulkner. Forestry Commission Bulletin n° 54. London, R.-U. p. 72–82.
- Tousignant, D., Villeneuve, M., Rioux, M., et Mercier, S. 1995. Effect of tree flowering and crown position on rooting success of cuttings from 9-year-old black spruce of seedling origin. *Rev. can. rech. for.* **25**(7) : 1058–1063.
- Tousignant, D., Périnet, P., et Rioux, M. 1996. Le bouturage de l'épinette noire à la Pépinière de Saint-Modeste. Ministère des Ressources naturelles, Gouvernement du Québec. ISBN: 2-550-25581-X. Disponible au <http://www.mrnf.gouv.qc.ca/publications/forets/connaissances/recherche/Tousignant-Denise/Rapport-le-bouturage.pdf>.
- Tremblay, L., et Lamhamedi, M.S. 2006. Embryogenèse somatique au ministère des Ressources naturelles et de la Faune du Québec : du laboratoire au site de plantation. *Des Plants et des Hommes*, **9**(3) : 6–11.
- Tremblay, F.-M., Iraqi, D., et El Meskaoui, A. 2005. Protocol of somatic embryogenesis: black spruce (*Picea mariana* (Mill.) B.S.P.). *Dans Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. Sous la direction de* S.M. Jain et P.K. Gupta. Springer, Dordrecht, Netherlands. p. 59–68.
- Turgeon, J.J., et De Groot, P. 1993. Vergers à graines de conifères : identification des ravageurs et guide de protection. Ministère des Richesses Naturelles de l'Ontario, Forêts Canada, Sault-Ste-Marie, Ont.
- Valadon, A., et Philippe, G. 1991. Traitements fructifères dans les vergers à graines d'arbres forestiers. *Informations Techniques du CEMAGREF, mars 1991*(81) : 1–8.
- Viereck, L.A., et Johnston, W.F. 1990. Black spruce *Picea mariana* (Mill.) B.S.P. *Dans Silvics of North America*, Vol. 1. Conifers. *Sous la direction de* R.M. Burns et B.H. Honkala. USDA, Forest Service, Wash. p. 11. Disponible au http://www.na.fs.fed.us/spfo/pubs/silvics_manual/table_of_contents.htm.
- Villeneuve, M. 1999. Les programmes d'amélioration génétique : bilan des réalisations. L'épinette noire. *Dans L'amélioration génétique en foresterie: où en sommes-nous? Sous la direction du* Service Canadien des Forêts (CFL) et Forêt Québec (DRF), Rivière-du-Loup, Qué. p. 45–51.
- Wang, B.S.P. 1973. Laboratory germination criteria for red pine (*Pinus resinosa* Ait.) seed. *Proceedings of the Association of Official Seed Analysts*, **63** : 94–101.
- Wang, B.S.P., et Ackerman, F. 1983. A new germination box for tree seed testing. Environment Canada, Canadian Forestry Service, Petawawa National Forestry Institute. Inf. Rep. PI-X-27F.
- Westfall, P.H., Tobias, R.D., Rom, D., Wolfinger, R.D., et Hochberg, Y. 1999. Multiple comparisons and multiple tests using the SAS System. SAS Institute Inc., Cary, N.C.
- Williamson, T., Colombo, S.J., Duinker, P., Gray, P., Hennessey, R., Houle, D., Johnston, M., Ogden, A., et Spittlehouse, D. 2009. Les changements climatiques et les forêts du Canada : des impacts à l'adaptation. Réseau de gestion durable des forêts, Service canadien des forêts, Centre de foresterie du Nord, Edmonton, Alta. Disponible au http://nofc.cfs.nrcan.gc.ca/bookstore_pdfs/29617.pdf.
- Youngblood, A., et Safford, L.O. 2008. *Picea* A. Dietr. spruce. *Dans The woody plant seed manual. Sous la direction de* F.T. Bonner et R.P. Karrfalt. USDA, Forest Service. p. 793–806.
- Zimmerman, R.H. 1972. Juvenility and flowering in woody plants: a review. *HortScience*, **7**(5) : 447–455.