



L'embryogenèse somatique des conifères, état et perspectives

Marie-Anne Lelu-Walter, Luc Harvengt

► To cite this version:

Marie-Anne Lelu-Walter, Luc Harvengt. L'embryogenèse somatique des conifères, état et perspectives. Informations forêt AFOCEL, 2004, 694, 6 p. hal-02674294

HAL Id: hal-02674294

<https://hal.inrae.fr/hal-02674294>

Submitted on 31 May 2020

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.

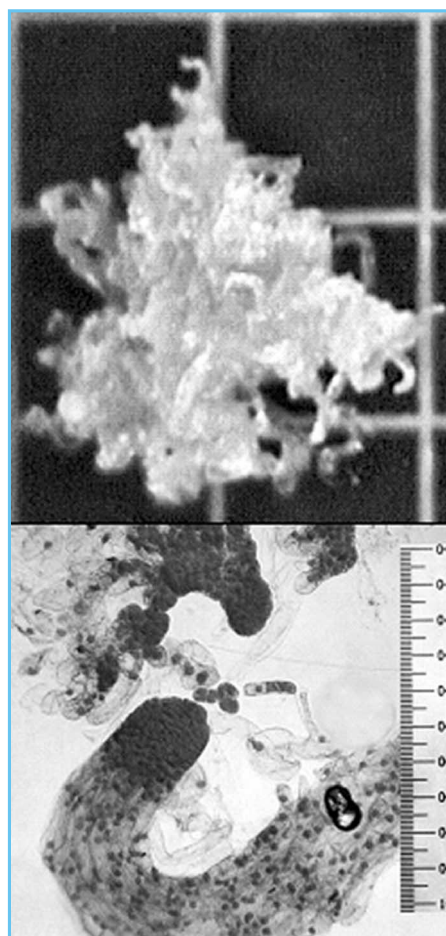
Mots clés

- Amélioration génétique
 - Biotechnologie
 - Conifères
- Diversité génétique
 - Recherche

L'embryogenèse somatique des conifères, état et perspectives

La multiplication végétative est le meilleur moyen d'accélérer la production de variétés améliorées et de maximiser, sous forme de production de bois, le gain génétique dont elles sont porteuses. Elle a ainsi permis les progrès réalisés en peuplier et eucalyptus tropicaux, espèces emblématiques des plantations intensives. En revanche, les conifères sont peu aptes à la multiplication végétative. Cette inaptitude est une conséquence de la précocité de leur maturité physiologique, résultant notamment en une chute rapide de l'efficacité du bouturage. Le greffage, l'autre technique traditionnelle de multiplication végétative des ligneux, est, quant à lui, un processus lent et gourmand en main d'œuvre. La multiplication végétative des résineux n'est donc possible qu'à très petite échelle et à des coûts prohibitifs pour une utilisation en plantation.

L'embryogenèse somatique est une troisième technique qui commence à permettre une multiplication végétative très efficace des conifères.



Aspect d'embryons somatiques de pin maritime à différentes échelles. Les cultures sont constituées d'embryons similaires à ceux issus de la fécondation d'un ovule par un grain de pollen qui se développent dans les graines. Ils ont une forme filamenteuse. Ils produisent un mucilage qui les maintient en amas blanchâtres (photo du haut). L'échelle est donnée par le quadrillage : (intervalle = 1 cm) en haut et par l'échelle graduée en bas (longueur totale de l'échelle : 1 mm).

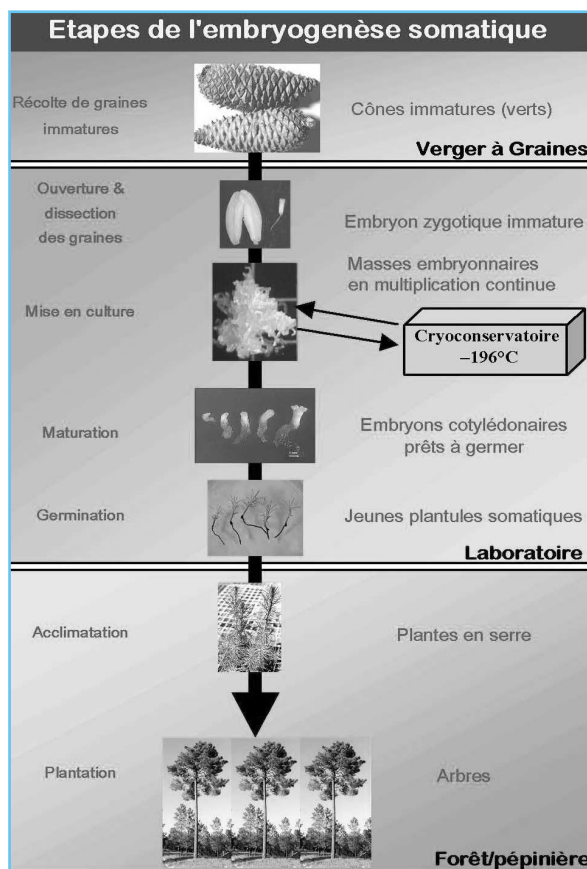
Description de la technique

L'embryogenèse consiste en une séquence d'évènements conduisant au développement d'un embryon.

Celui-ci est nommé **zygotique** quand il est issu de la fécondation d'un ovule par un grain de pollen (reproduction sexuée, graine) ; il est nommé **somatique** quand l'embryon est formé à partir des cellules non reproductrices de la plante, ou cellules somatiques (reproduction asexuée, "graine végétative").

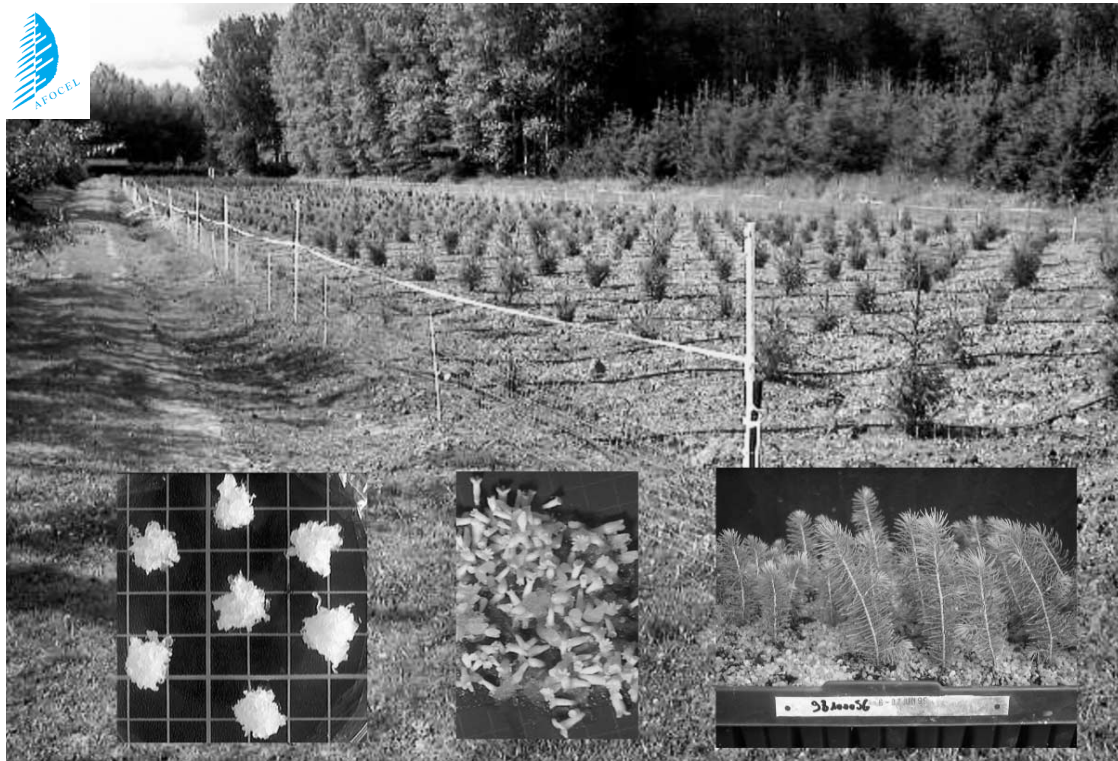
Ces "graines végétatives" peuvent alors germer puis se développer en plante tout comme le ferait un semis. Issus d'une technique de multiplication végétative, les embryons somatiques sont donc génétiquement identiques entre eux (= un seul cultivar) et au matériel végétal dont ils proviennent.

La **cryoconservation** est une conservation de longue durée dans l'azote liquide (-196°C) de tissus ou d'organes. Elle permet de conserver un matériel végétal, pendant des dizaines d'années sans altération ni vieillissement, et de le remettre en culture très rapidement. La cryoconservation permet de



Etapes de l'embryogenèse somatique (cas du pin maritime).

L'épicéa commun : une espèce pour laquelle l'embryogenèse somatique est maîtrisée.



Plantation sur 50 ares de 5 cultivars d'épicéa produits par embryogenèse somatique, en comparaison avec un lot de semis amélioré (plants de 3 ans).

En insertion, détail de l'aspect des "cals" en prolifération (à gauche), des embryons somatiques cotylédonaire prêts à germer (au centre) et des plantules de 3 mois (à droite).

limiter fortement les coûts et les risques sanitaires et de détérioration. Il s'agit donc d'un outil puissant pour "doper" la création variétale.

L'embryogenèse somatique comporte plusieurs étapes réalisées en conditions stériles *in vitro* (en laboratoire). La première étape (initiation) consiste en la mise en culture d'embryons (zygotiques) extraits de graines immatures afin de produire les cultures embryonnaires constituées d'embryons somatiques. Une culture embryonnaire est constituée d'embryons somatiques restant dans un état très indifférencié. Elle peut être aisément conservée dans l'azote liquide (**cryoconservation**), pour longtemps (potentiellement plusieurs siècles) nécessitant donc une intervention humaine extrêmement réduite. Le changement des conditions de culture permet d'induire le développement des embryons somatiques cotylédonaire, stade équivalent à celui retrouvé dans la graine prête à germer. Cette étape dite de **maturation**, permet l'accumulation de substances de réserve et la mise en place des structures nécessaires à la germination. Suite à la maturation, les embryons somatiques peuvent éventuellement être soumis à une déshydratation pour les conditionner en vue d'une conservation à court ou moyen terme, ce qui permet notamment d'étaler sur une longue période la production d'un nombre donné de plants. La **germination** et le développement des plantes s'obtiennent en transférant les embryons somatiques cotylédonaire sur un milieu de culture simplifié, similaire à un engrais liquide dilué. Les plantules ayant commencé une croissance active, peuvent alors être transférées dans des conditions classiques de culture en serre puis en pépinière. La période de transition pendant laquelle les conditions de lumière, température et hygrométrie en serre doivent être contrôlées de manière très précise est dénommée **acclimatation**.

Avantages de l'embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique se révèle intéressante pour :

1) sa vitesse de multiplication élevée assurant une multiplication végétative de masse (multiplication du nombre d'individus par un facteur compris entre 2 et 10 toutes les semaines, soit un facteur théorique d'au moins 4 000 en un trimestre),



Plantation expérimentale de plants issus d'embryons somatiques d'épicéa en comparaison avec des semis, après 8 saisons de végétation (site expérimental AFOCEL de l'Etançon, Nangis, Seine-et-Marne). La croissance d'un semis témoin (à gauche) est identique à celle d'un plant issu d'embryon somatique (à droite).

2) la possibilité de cryoconserver dans l'azote liquide (-196°C) les "cals" ou cultures "embryogènes", assurant un maintien illimité de la juvénilité du matériel et sa disponibilité à long terme. Cela permet aussi de sécuriser et de pérenniser les collections de matériel végétal. Par ailleurs, la collection ainsi constituée ("cryobanque") permet une conservation aisée et sûre des ressources génétiques à très long terme (plusieurs milliers de cultivars sur quelques mètres carrés avec un coût d'entretien très faible),

3) la possibilité d'une production planifiée pour une utilisation du matériel végétal produit à la meilleure saison (germination/plantation).

L'embryogenèse somatique constitue une méthode particulièrement performante pour les améliorateurs d'espèces forestières, principalement pour la multiplication rapide en masse de cultivars élités issus de croisements contrôlés et la conservation à long terme dans l'azote liquide sans perte de juvénilité (Lelu et Thompson, 2002).

L'embryogenèse somatique permet d'accélérer et d'améliorer la précision de l'évaluation des cultivars. C'est particulièrement important pour la mise au point de la sélection assistée par marqueurs (Plomion, 1996). En effet, la multiplication végétative permise par l'embryogenèse somatique permet de tester directement la valeur des cultivars (en test clonal) plutôt que d'avoir recours à des tests de descendance qui se révèlent un peu moins performants (manque de précision) et plus coûteux (Lstiburek et Mullin, 2000). L'ensemble de ces avantages fait de l'embryogenèse somatique un outil puissant d'accélération des travaux de sélection. Ces arguments ont motivé sa mise en oeuvre dans le cadre du programme suédois d'amélioration de l'épicéa commun piloté par Skogforsk (Högborg et al., 1998).

Techniquement, une production en routine à petite échelle est au point chez les épicéas et les mélèzes, espèces maîtrisées en France par l'AFOCEL et l'INRA. De manière générale, les facteurs clés de la méthode sont bien connus et la transposition entre ces espèces est relativement aisée. Les pins font exception avec des comportements parfois très différents entre espèces proches. Ainsi, bien que le processus d'embryogenèse somatique soit maîtrisé par des équipes étrangères pour trois espèces (radiata, taeda et Weymouth), la majorité des pins pose encore problème. C'est particulièrement vrai pour le pin maritime, espèce intéressant fortement la France puisqu'elle améliore et cultive cette essence.

Les plants issus d'embryons somatiques peuvent servir à constituer les pieds mères sur lesquels sont prélevées des boutures qui deviendront des plants disponibles pour le reboisement.

La multiplication par bouturage amortit alors le prix des plants produits en culture *in vitro*. Par ailleurs, la cryoconservation permet de renouveler, jusqu'à plusieurs fois par an, les pieds mères, minimisant les coûts de gestion du matériel en pépinière (gain en temps et espace). Ce schéma est déjà effectif et mis en place en Irlande pour l'épicéa de Sitka (Coillte Teoranta) et en Nouvelle-Zélande pour le pin radiata. La facilité accrue de bouturage des plants issus d'embryons somatiques par rapport à celle des plants issus de semis est mise à profit pour "diluer" le coût de la production en laboratoire des embryons somatiques.

Limitations

Bien sûr, l'embryogenèse somatique présente aussi certaines limites. La première est la réticence réflexe des utilisateurs face à du matériel produit en culture *in vitro*, du fait de risques éventuels de production de plants non conformes (génétiquement ou morphologiquement). À ce jour, les études menées sur des plants régénérés par embryogenèse somatique, n'ont révélé aucun comportement anormal de ceux-ci. La deuxième limite est que l'embryogenèse somatique ne peut être facilement obtenue qu'à partir de graines. Il s'avère donc nécessaire de tester les performances des plants produits, avant de pouvoir les diffuser à grande échelle. Ensuite, l'obtention d'embryons somatiques, aptes à germer et à se développer en plante, n'est efficace que pour un nombre limité d'espèces. Enfin, les nombreuses manipulations du matériel végétal et les besoins importants en main d'œuvre qualifiée entraînent également des coûts élevés. Ces derniers sont en voie de forte réduction par l'automatisation progressive des opérations et la simplification des techniques permettant leur mise en oeuvre par une main d'œuvre moins spécialisée.

Le risque de limitation de la diversité génétique, résultant de l'emploi d'un très petit nombre de cultivars, peut être contourné en prenant soin de multiplier des cultivars appartenant à des familles suffisamment diverses, et en limitant le nombre de plants diffusés par cultivar. La gestion des opérations de pépinière reste simple si on organise l'alternance entre cultivars d'année en année, permettant de répartir la diversité du matériel sur au moins une décennie et donc d'avoir un nombre raisonnable de cultivars multipliés simultanément (une même année).

Etat d'avancement des travaux en embryogenèse somatique et applications

L'embryogenèse somatique est actuellement mise en pratique pour la sélection et la diffusion de variétés améliorées de résineux :

- au Canada : Cellfor (tests de cultivars au Chili, *pin taeda*, *épinette blanche*, *Douglas* plus autres espèces) et J.D. Irving Ltd (*épinette blanche* et *épinette noire*),
- en Nouvelle-zélande : Carter Holt Harvey Ltd (*pin radiata*),
- au Chili : (*pin radiata*),
- en Irlande : Coillte Teoranta (*épicéa de Sitka*).

D'autres compagnies ont un programme de recherche et développement et utilisent la technique dans le cadre de leur programme privé d'amélioration : Meadwestvaco, Weyerhaeuser, et International Paper aux USA, Fletcher Challenge en Nouvelle Zélande...

L'embryogenèse somatique s'adresse à des espèces pour lesquelles la création de variétés composées d'un mélange de cultivars est envisagée (pin radiata, pin maritime, Douglas, mélèze hybride). Ces cultivars élités sont sélectionnés dans des familles elles-mêmes très performantes. Généralement, les niveaux d'amélioration génétique désirés nécessitent la sélection des 5 % de cultivars les plus performants. CellFor (Canada, Colombie Britannique) a engagé des programmes pour tester les cultivars au cours de ces 8 dernières années et a maintenant des plants en test représentant plus de 4 500 cultivars. Ainsi, la commercialisation de cultivars testés a débuté : l'épinette blanche au Canada depuis quelques années, le pin radiata en Nouvelle-Zélande à partir de fin 2003. La société privée J.D. Irving Limited (Canada, côte Est), qui assure une reforestation annuelle de 20 millions d'arbres, dont 1 million de boutures, a intégré les aspects appliqués de l'embryogenèse somatique du laboratoire au test à long terme sur le terrain.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

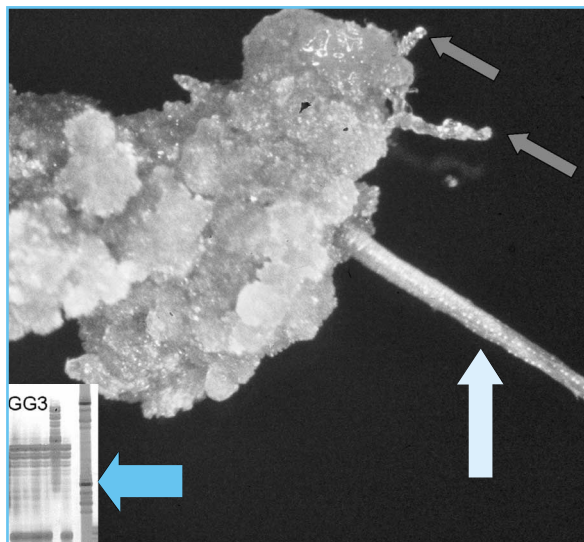
■ Quelles perspectives ?

Les dernières années ont vu une nette amélioration du processus avec la production d'un nombre croissant de plants, permettant enfin de prendre en compte la qualité du plant pour la mise au point de la technique.

L'embryogenèse somatique associée au bouturage est certainement la voie la plus prometteuse et viable.

Actuellement en France, la qualité du bois n'est pas ou très peu payée. Si le gain supplémentaire résultant de l'emploi de plants issus de l'embryogenèse somatique consistait uniquement en un accroissement de volume à qualité constante, l'homogénéité de la qualité du bois (découlant de la multiplication végétative) constituerait une prime pour le transformateur. Cette prime pourrait l'amener

à privilégier ce type d'approvisionnement et, en retour, à l'encourager financièrement.



Initiation d'embryons somatiques (flèches obliques) obtenus par l'AFOCEL directement à partir d'une aiguille (flèche verticale) d'un plant d'épicéa âgé de 3 ans. L'identité et la conformité à la plante de départ ont été confirmées dans 3 laboratoires indépendants par empreintes génétiques (flèche horizontale).

■ Conclusions

À court terme, les nombreux avantages de l'embryogenèse somatique en font un outil performant pour le développement des programmes d'amélioration. En l'associant à la cryoconservation, la perspective de conservation à très long terme des ressources génétiques est réelle. À moyen terme, l'embryogenèse somatique va prendre une place croissante dans la diffusion de variétés très améliorées valorisées par les systèmes forestiers à forte productivité en Amérique (USA, Canada, Chili) et en Océanie (Australie, Nouvelle-Zélande)

L'embryogenèse somatique à partir de tissus d'arbres âgés (10 à 15 ans minimum) dont les performances réelles sont connues, permettrait d'utiliser complètement le gain génétique obtenu à chaque étape d'amélioration. Ce développement de la technique est l'objet d'activités de recherche soutenue de par le monde.

L'utilisation de l'embryogenèse somatique en déploiement n'est pas un besoin immédiat. Mais il surviendra pour les variétés "multi-cultivars" lorsque l'utilisation de l'embryogenèse somatique aura été validée en amélioration/sélection. Si le gain génétique est substantiel et le coût associé abordable, la technique sera alors acceptée par les sylviculteurs et les pépiniéristes.

Afin de répondre plus rapidement et plus efficacement aux questions qui restent ouvertes, l'AFOCEL et l'INRA développent en partenariat un **projet intégré de recherche en biotechnologie**

du pin maritime optimisant les interactions entre l'amélioration classique et la recherche en biotechnologie en intégrant la qualité du bois et les données socio-économiques.

Pour en savoir plus

HARVENGT L., DUMAS E. (2003)

La cryoconservation des ligneux, une technique au service de la gestion des ressources génétiques sauvages et domestiquées.

AFOCEL, Informations-Forêt, n° 664

LSTIBUREK M. et MULLIN T. J. (2003)

Clonal replication for genetic tests of forest trees - worth the effort ?

Poster présenté à la Gordon Research Conference in Quantitative Genetics and Genomics, 9-14 Février 2003, Ventura, Californie, USA
www4.ncsu.edu/~mlstibu/WWWPoster1.pdf

LELU M.-A. et THOMPSON D. (2002)

L'embryogenèse somatique des conifères : une filière pour produire du matériel forestier de reboisement.

In : Verger M. (ed) Multiplication végétative des ligneux forestiers, fruitiers et ornementaux. Actes (CD-Rom). Montpellier, France, CIRAD-INRA, p167-174. 3ème rencontre du groupe de la Sainte Catherine.

HARVENGT L., DULIEU H. (2001)

Exemple d'utilisation des marqueurs moléculaires pour gérer la biodiversité au cours de la multiplication clonale.

AFOCEL, Informations-Forêt, n° 635

SERVICE CANADIEN DES FORETS (2001)

L'embryogenèse somatique des conifères.

http://www.nrcan-rncan.gc.ca/cfs-scf/science/biotechfacts/somatic/index_f.html

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.

PLOMION C. (1996)

Sélection assistée par marqueurs chez les arbres forestiers.

AFOCEL, Informations-Forêt, n° 536

Remerciements : Nous remercions la **Direction Générale de la Forêt et des Affaires Rurales** pour son soutien financier au travers de la convention N° 61.45.37/01 portant sur la réalisation d'une synthèse bibliographique sur l'embryogenèse somatique des conifères.



Marie-Anne LELU-WALTER

INRA

Unité Amélioration,

Génétique et Physiologie Forestières,

INRA-CRO BP 20 619

Ardon F-45166 Olivet Cedex

Tél. : 02.38.41.78 39

Fax : 02.38.41.48.09

E-mail : leluwa@orleans.inra.fr

Luc HARVENGT

AFOCEL

Laboratoire de Biotechnologie

Domaine de l'Etançon

77370 Nangis

Tél. : 01.60.67.00.32

Fax : 01.60.67.02.56

E-mail : biotech@afocel.fr



ISSN : 0336-0261