HAL
open science

Production de plants résineux forestiers par embryogenèse somatique : synthèse bibliographique et état d'avancement des recherches en France

Marie-Anne Lelu-Walter, Luc Harvengt

▶ **To cite this version:**

Marie-Anne Lelu-Walter, Luc Harvengt. Production de plants résineux forestiers par embryogenèse somatique : synthèse bibliographique et état d'avancement des recherches en France. [Rapport Technique] Association Forêt Cellulose (AFOCEL). 2003. hal-02829978

HAL Id: hal-02829978

https://hal.inrae.fr/hal-02829978v1

Submitted on 7 Jun 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.

GIS "Variétés Forestières Améliorées"

Production de plants résineux forestiers par embryogenèse somatique : synthèse bibliographique et état d'avancement des recherches en France

(convention DERF N° 61.45.37/01)

Projet AFOCEL EE01

Rapport final
29 novembre 2002

Version revue du 30/01/03 et compte-rendu du comité de pilotage final (10/04/03)

Rédigé par
Marie-Anne Lelu (INRA, Orléans)
et
Luc Harvengt (AFOCEL, Nangis)

Coordonné par M.-A. Lelu

Remerciements

Ce rapport est l'aboutissement d'un travail collectif de longue haleine. Aussi tenons-nous tout particulièrement à associer à ce travail, en les remerciant :

Dr David Thompson, Dr David Cyr et Dr Yill-Sung Park pour leurs précieuses informations concernant l'embryogenèse somatique et ses applications,

Dr Catherine Bastien pour ses commentaires et corrections concernant la partie Amélioration,

Dr Elizabeth Le Net pour son remarquable travail sur la partie économique,

Dr Jean-François Trontin pour sa participation essentielle à la rédaction de ce rapport.

Messieurs Pierre Alazard, Mohamed Najar et Saïd Difle pour leurs indications précieuses en matière d'amélioration, de sylviculture et de productivité en pin maritime.

Carole Kolossy pour son aide efficace dans la mise en forme de ce rapport.

Et toutes personnes avec lesquelles nous avons été amenés à avoir de fructueuses discussions.

ABREVIATIONS

AGM	Arbres Génétiquement Modifiés).
CRC	Cooperative Research Center (Australie)
ES	Embryogenèse Somatique
MFR	Matériel Forestier de Reproduction
OGM	Organismes Génétiquement Modifiés
PEMs	masses pro-embryonnaires
QTL	Quantitative Trait Loci (portion d'ADN liées au déterminisme génétique d'un caractère quantitatif)
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
SAM	sélection assistée par marqueurs
SCF	Service canadien des forêts
STBA	Southern Tree Breeding Association
TEV	total economic value
VAN	valeur actuelle nette

Note : Les biotechnologies comprennent les techniques de culture *in vitro* (micropropagation encore appelée microbouturage, microgreffage, embryogenèse somatique, transgenèse encore appelée transformation génétique, cryoconservation) et les techniques moléculaires (génomique, études de diversité génétique moléculaire, biologie moléculaire de la physiologie et des QTL).

Table des matières

1 - DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES CONCERNANT L'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE DES CONIFÈRES DANS LE MONDE....1

1.1. Définition, intérêts et limites de l'embryogenèse somatique....1

1.1.1. Définition....1

1.1.2. Ontogenèse de l'embryon somatique : aspects physiologiques et biochimiques....3

1.1.3. Avantages et limites de l'embryogenèse somatique....4

1.2 État d'avancement des travaux de pré-développement et de développement : étude technique....5

2 - L'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE DES CONIFÈRES : UTILISATION PRATIQUES ET PERSPECTIVES À COURT TERME....11

2.1. Articulation avec les programmes d'amélioration....11

2.1.1. Besoins des améliorateurs....11

2.1.1.1. Gestion à long terme de la population d'amélioration....11

2.1.1.2. Création variétale....15

2.1.1.3. Diffusion de matériel amélioré....17

2.1.2. Pré requis, précautions à prendre avant tout développement/intégration de l'embryogenèse somatique aux programmes d'amélioration....19

2.1.2.1. Questions cognitives....19

2.1.2.2. Essais de démonstration....19

2.1.3. Conclusions....20

2.2 Articulation avec les autres biotechnologies....21

2.2.1. Les méthodes de conservation....21

2.2.1.1. La déshydratation....21

2.2.1.2. La cryoconservation....21

2.2.2. La transformation génétique....24

2.3. Analyse du gain économique lié à l'intégration de l'embryogenèse somatique à l'amélioration et à la production de plants....26

2.3.1. Introduction....26

2.3.2. Etat de l'art....27

2.3.2.1. Impact économique des biotechnologies....28

2.3.2.2. Biotechnologies et forêt....29

2.3.2.3. Les analyses économiques de programmes d'amélioration forestière....31

2.3.2.4. Les résultats (gains réalisés)....35

2.3.3. Etude développée pour le pin maritime....36

2.3.3.1. Evaluations coûts/bénéfices pour le pin maritime....36

2.3.3.2.Les schémas de production de MFR étudiés....37

2.3.3.3.Les caractéristiques des schémas de production de MFR....37

2.3.4. Méthode....37

2.3.4.1. Les principes généraux....37

2.3.4.2. Les données....38

2.3.4.3. Les étapes....38

2.3.4.4. Les hypothèses....38

2.3.5. Résultats et limites de la méthode.....42
2.3.5.1. Prix des plants en sortie de pépinière.....44
2.3.5.2. Rentabilité des plantations.....44

3 - BILAN DES PROGRAMMES D'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE À L'AFOCEL ET À L'INRA.....47

3.1. Programmes développés à l'AFOCEL.....47
3.1.1. Epicéa.....47
3.1.2. Le pin maritime.....52
3.1.3. Synthèse des perspectives.....57
3.1.4. Liste des publications et documents réalisés.....59
3.2. Programmes développés à l'INRA.....62
3.2.1. Embryogenèse somatique du mélèze hybride.....62
3.2.1.1. Vers la maîtrise de l'embryogenèse somatique du mélèze hybride.....62
3.2.1.2. Étude de l'implication des régulateurs de croissance au cours de l'embryogenèse somatique.....63
3.2.2. Embryogenèse somatique du pin sylvestre et du pin maritime.....64
3.2.3. Applications de l'embryogenèse somatique.....66
3.2.4. Perspectives.....68
3.2.5. Liste des publications et documents réalisés.....68

4 - CONCLUSIONS (AVANT RÉUNION DU COMITÉ DE PILOTAGE).....72

4.1 Etat et besoins.....72
4.2 Proposition.....73

COMPTE RENDU DE LA REUNION DE PILOTAGE POUR.....75

DISCUSSION, VALIDATION DE L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUIVANTE :.....75

BIBLIOGRAPHIE.....81

ANNEXE.....89

1 - Données bibliographiques concernant l'embryogenèse somatique des conifères dans le monde

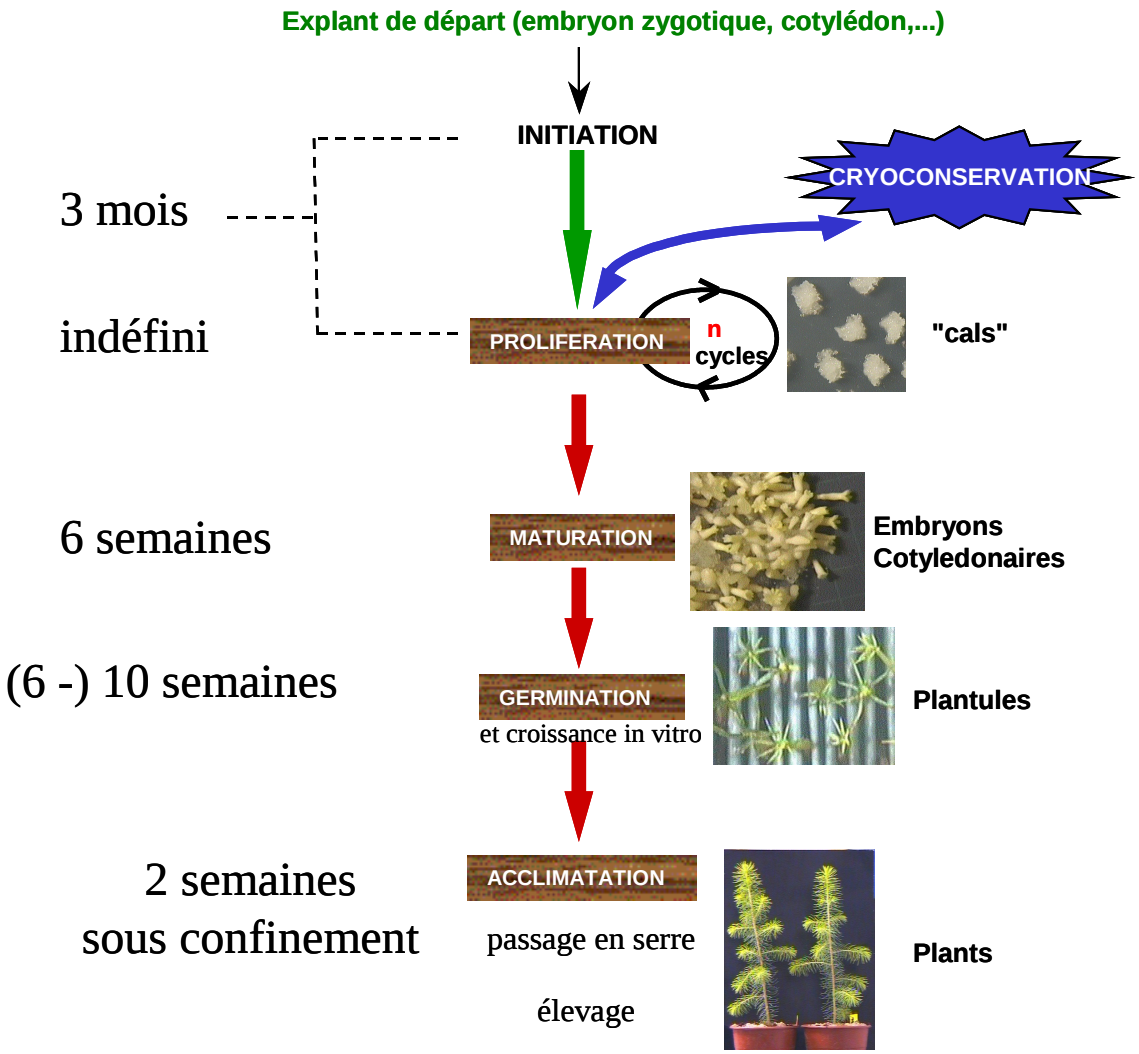
1.1. Définition, intérêts et limites de l'embryogenèse somatique

1.1.1. Définition

L'embryogenèse somatique désigne l'ensemble des événements provoqués artificiellement *in vitro* et conduisant à la formation d'un embryon à partir d'une cellule somatique. Elle désigne plus généralement l'ensemble du procédé permettant de produire des clones d'embryons à partir d'un explant végétal et de régénérer des plantules à partir de ceux-ci. Les embryons somatiques sont donc génétiquement identiques aux cellules dont ils proviennent et entre eux (et contiennent le même nombre de chromosomes).

L'obtention d'embryons somatiques chez les conifères est récente. Elle a été décrite en 1985 par Hakman *et al,* à partir d'embryons zygotiques immatures d'épicéa (Figure 1). Depuis lors, l'embryogenèse somatique a été obtenue chez de nombreux conifères, le plus souvent à partir d'embryons zygotiques immatures (embryons extraits de graines).

La première étape consiste en la mise en culture (parfois appelée induction = exposition aux conditions de culture) en conditions stériles *in vitro* (en laboratoire) d'un explant, constitué classiquement d'une graine immature, afin de produire les premiers embryons somatiques (initiation = formation des premiers embryons somatiques). Cette technique allie les avantages de la graine et de la bouture en produisant des « graines végétatives ». S'agissant d'une technique de multiplication végétative, ces embryons somatiques seront tous génétiquement identiques à l'embryon présent dans la graine de départ et constituent donc un clone. Les cultures embryonnaires initiées doivent être stabilisées de manière à présenter une prolifération régulière et facile à maintenir. Une culture stabilisée est constituée d'embryons somatiques restant spontanément dans un état très peu différencié, qui peuvent aisément être conservés à très long terme (potentiellement plusieurs siècles) dans l'azote liquide (cryoconservation) avec une intervention humaine extrêmement réduite. La régénération de plantes nécessite de conditionner les embryons de manière à les faire évoluer vers le stade cotylédonaire équivalent à celui qui est retrouvé dans la nature dans la graine prête à germer. Ce traitement est appelé maturation. Celle-ci consiste en l'augmentation de taille individuelle des embryons somatiques accompagnée de la différentiation d'un protoderme (futur épiderme), de l'accumulation de substances de réserve et de la mise en place des structures qui permettront la germination (méristèmes, tissus vasculaires et cotylédons). A la fin de la maturation, un traitement est parfois nécessaire pour lever la dormance des embryons ou les conditionner pour une conservation à court ou moyen terme. Les embryons cotylédonaires germent (développement de la racine) puis se développent en plante (développement de la partie aérienne). Une fois que les plantules ont commencé une croissance active, elles peuvent être progressivement transférées dans des conditions de culture classiques 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.



Au total, 6 mois pour produire en quantité des plants de 3cm qui atteindront 40 - 60 cm en 2 ans. Ces données ont été validées sur une quarantaine de clones produits à une échelle de 100 à 10 000 plants/clone par production.

Figure 1 : Etapes de l'embryogenèse somatique chez un conifère : exemple de l'épicéa commun

1.1.2. Ontogenèse de l'embryon somatique : aspects physiologiques et biochimiques

➢ **Origine tissulaire**

Les premiers embryons somatiques de *Picea abies* décrits dans la littérature ont été d'abord obtenus à partir de matériel très juvénile : des embryons immatures (Hakman et von Arnold 1985). Par la suite, des embryons somatiques ont été obtenus à partir de matériel de plus en plus différencié, des cotylédons âgés de 7 jours (Lelu *et al*. 1987, 1990, Lelu et Bornman 1990), des cotylédons prélevés sur des semis âgés de 4,5 mois (Ruaud *et al*. 1992), des cotylédons, hypocotyle, épicotyle et aiguilles de plantules âgées de 36 jours (Mo et von Arnold 1991), des aiguilles âgées de 3 puis 14 mois (Lelu *et al.* 1994, Ruaud *et al*. 1992). Enfin, des travaux récents indiquent la possibilité d'obtenir des embryons somatiques immatures à partir d'arbres âgés de 3 à 26 ans (Westcott 1994, Pâques et Bercetche 1998, Hristoforoglu et Schmidt, 1997 et données non publiées).

En ce qui concerne le genre *Pinus*, l'embryogenèse somatique n'a été décrite jusqu'à présent dans la littérature scientifique qu'à partir d'embryons zygotiques immatures, excepté pour le *Pinus lambertiana* et *P. nigra* chez qui il a été possible d'initier des embryons à partir d'embryons zygotiques matures (Gupta et Durzan 1986, Radojevic *et al*. 1999). L'évolution positive des résultats décrits pour le genre *Picea* permet d'espérer des progrès rapides pour le pin. Dans la plupart de ces cas, il a été montré que les embryons somatiques étaient initiés à partir de cellules dermiques (protoderme ou épiderme).

➢ **Origine cellulaire**

Récemment, un suivi microscopique automatique au niveau de chaque cellule individuelle ("cell-tracking") a permis de confirmer l'hypothèse de la poly-embryogenèse par clivage avec la séparation de l'apex embryonnaire en plusieurs embryons (Figure 2, Filonova *et al*. 2000 a, b).

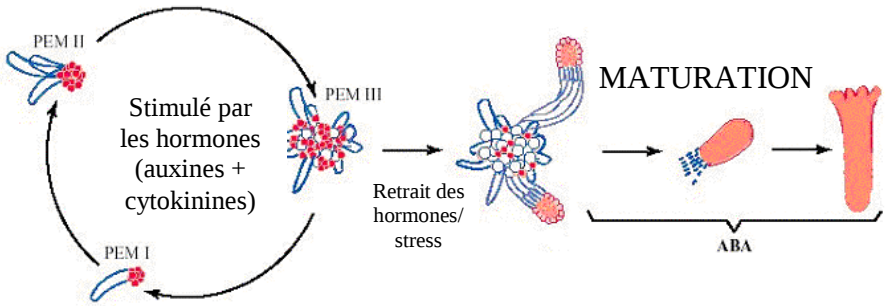


Figure 2 : Schéma du développement des embryons somatiques de conifères (d'après Filonova *et al.*, 2000 a, b). Les masses pro-embryonnaires (PEMs) composées d'embryons très immatures prolifèrent sous la stimulation d'auxines et cytokinines endogènes et/ou exogènes. Chaque PEM individuelle passe par trois stades caractéristiques (I, II et III) au cours de sa différenciation en embryon cotylédonnaire (maturation). Au stade I, la PEM est constituée d'un agrégat compact de cellules au cytoplasme très dense (cellules méristèmatiques, pôle apical de l'embryon) connecté à une unique cellule vacuolisée de grande taille (cellule suspensorale). Le stade II consiste en des agrégats cellulaires identiques mais accompagnés de plusieurs cellules suspensorales. Au stade III, le nombre de cellules méristèmatiques sont plus nombreuses et elles sont agrégées de manière moins cohésive. La polarité de l'embryon n'est plus nette. Le transfert sur un milieu de culture sans hormones (ou un stress si les embryons étaient maintenus en prolifération sans hormones exogènes).

Stimulé par hormones (auxines et cytokinines)

Le mode de développement des embryons somatiques est équivalent à celui d'un embryon excisé d'une graine. Cependant, il y a des différences morphologiques notables entre les plantes somatiques et les semis. Ainsi, l'hypocotyle, les cotylédons et la racine des plantes somatiques de *Picea abies* (Bercetche *et al.* 1993) et *Picea glauca x engelmanii* (Cyr *et al.* 1991, Roberts *et al.* 1993) sont en général moins développés que chez le semis. La comparaison des plantes somatiques avec des semis et des plantes développées à partir d'embryons zygotiques matures excisés de la graine cultivés *in vitro* indique que, pour un même stade de développement, les embryons zygotiques ont une croissance intermédiaire entre les semis et les plantes somatiques. La différence majeure entre les trois types d'embryons est l'absence du mégagamétophyte. Le rôle de celui-ci semble important puisqu'il contient environ 80 % des réserves nutritives de la graine. Dès lors, il paraît essentiel d'obtenir des embryons somatiques présentant des teneurs élevées en protéines de réserve et en lipides afin de compenser l'absence du mégagamétophyte (Feirer 1994). Mais cela ne suffit pas car le mégagamétophyte exerce également une action physique (contrainte mécanique limitant le développement) et hormonale sur l'embryon, influences difficiles à reproduire car encore mal connues.

Les différences rapportées pour les trois types de plantes ne s'expliquent pas exclusivement par l'absence ou la présence des nutriments du mégagamétophyte. Elles semblent aussi en partie associées à une utilisation différente des réserves (Cyr *et al.* 1991). Dans la graine, les réserves restent élevées pendant la première semaine de germination puis diminuent rapidement pendant l'élongation de la racine et de l'hypocotyle. Au contraire, chez les embryons somatiques et les embryons excisés de l'endosperme, l'hydrolyse des réserves a lieu dès le premier jour de culture en conditions de germination (Roberts *et al.* 1993). Chez les graines à mégagamétophyte comme celles des conifères, les cotylédons jouent un rôle essentiel pendant les premiers stades de germination (Brown et Gifford 1958, Kramer et Kozlowski 1979). Ce ne sont pas seulement des organes de réserve mais également des organes de transfert des réserves du mégagamétophyte vers les structures en croissance, comme la racine et l'épicotyle.

Une meilleure compréhension de l'ensemble des relations embryon zygotique - endosperme-milieu extérieur devrait permettre de définir des protocoles aboutissant à la production d'embryons somatiques plus vigoureux et plus semblables aux embryons zygotiques. Ainsi, l'enrobage des embryons somatiques mimant le mégagamétophyte pourrait contribuer à une meilleure maîtrise de la germination.

1.1.3. Avantages et limites de l'embryogenèse somatique

Le système idéal de multiplication végétative aurait les caractéristiques suivantes : il serait indépendant du génotype, indépendant de l'âge de la plante, possédant un taux de multiplication élevé et uniforme, disponible et utilisable à long terme et possédant un coût de production de plants bas. A ce jour, aucun système de multiplication végétative ne peut prétendre répondre à tous ces critères. Cependant, comparée au bouturage, l'embryogenèse somatique se révèle intéressante pour un certain nombre d'aspects dont :
- son taux de multiplication potentiellement bien supérieur assurant une multiplication végétative de masse.
- la possibilité de cryoconserver les cultures embryogènes assurant un maintien illimité de la juvénilité du matériel et sa disponibilité à long terme (voir 2.2.1). Cela permet aussi de sécuriser et pérenniser les collections de matériel végétal. En outre, la cryoconservation représente un faible encombrement et un faible coût d'entretien.
- la possibilité d'une production étalée pour une utilisation à la meilleure saison avec la facilité d'une production continue toute l'année.

En tant que système efficace de multiplication végétative, les gains génétiques peuvent être énormes (discuté au chapitre 2.3. consacré à l'étude des performances économiques). Travaillant sur du matériel complètement caractérisé sur le plan génétique, la traçabilité est aisée (il suffit de comparer génotype par génotype sans avoir besoin de recourir à des modèles probabilistes lourds comme dans le cas de populations de semis). La facilité de manipulation des embryons matures permet d'envisager un mélange facile pour une production de plants en bulk par simple semis alors qu'un obstacle important au bouturage en bulk de clones identifiés est la lourdeur de manipulation des plants après une propagation indépendante des clones (afin d'assurer une représentativité équilibrée et constante de chacun).

L'embryogenèse somatique, outre son utilisation en tant que méthode de multiplication végétative, représente un matériel idéal pour :
- Les études fondamentales en physiologie et biologie moléculaire.
- La transformation génétique (voir 2.2.2).
- La production de molécules naturelles à haute valeur ajoutée (industrie pharmaceutique et chimie fine) avec ou sans transformation génétique.

Bien sûr, l'embryogenèse somatique présente aussi certaines limites. La première vient de la méthode elle-même. En effet, il existe toujours une réticence réflexe face à du matériel produit en culture *in vitro*, du fait de risques éventuels de production de plants non conformes génétiquement. C'est pourquoi des tests de démonstration ont été établis par différentes compagnies privées pour des espèces comme les épicéas afin d'étudier la croissance, le comportement au champ des plants produits par embryogenèse somatique (uniformité, conformité). A ce jour, les études réalisées à partir de plants obtenus par embryogenèse somatique, n'ont mis en évidence aucun cas de comportement anormal de ce matériel par rapport à des semis ou à des boutures (Grossnickle et Major, 1994a, b, Grossnickle *et al.*1994).

Comme le bouturage, l'embryogenèse somatique dépend de l'âge de la plante : en routine, elle ne peut être obtenue qu'à partir de matériel juvénile (graines). Par ailleurs, les problèmes rencontrés concernent en général :
- Le rendement de régénération (maturation).
- L'optimisation de la germination et de l'élevage des plants.
- L'optimisation de la main d'œuvre (automatisation).

1.2 État d'avancement des travaux de pré-développement et de développement : étude technique

La propagation clonale des conifères par bouturage et/ou par micropropagation est techniquement opérationnelle pour *Pinus* sp. dans différentes régions (Chili, Nouvelle Zélande, Afrique de Sud). Bien que l'embryogenèse somatique des résineux n'ait pas encore atteint l'échelle d'une production industrielle, de multiples signes indiquent qu'elle est à un niveau de pré-développement. A ce jour, des tests clonaux sont en cours d'évaluation et les efforts de production portent sur un nombre limité de clones sélectionnés, entre autres, sur leurs performances en embryogenèse somatique. Cependant, ce pré-développement est une première étape permettant de valider le procédé d'embryogenèse somatique et son produit et le développement d'une production pilote.

Concernant le procédé, son déploiement nécessitera une structure assurant le transfert de technologie du laboratoire à la production pilote. Pour le produit final, sa validation dépend des

clients et des résultats sur le terrain (en pépinière et au champ). Pour ces nouvelles technologies, comme l'embryogenèse somatique, la commercialisation du produit est du ressort du marketing. A long terme, elle est uniquement dépendante du développement d'un système de production fiable et économiquement attractive. Mais, il y a des contraintes biologiques (le système d'embryogenèse lui-même) et techniques (mécanisation) à intégrer. Beaucoup d'étapes de l'embryogenèse somatique sont réalisées en conditions stériles ; de plus les génotypes montrent des variations significatives vis-à-vis de la production et leur adaptabilité à un protocole donné (Timmis 1998). Les difficultés techniques concernent l'automatisation et le maniement à grande échelle des étapes *in vitro* d'embryogenèse somatique. Il est attendu une réduction des coûts en évitant notamment la germination *in vitro* et en développant des systèmes efficaces de diffusion de plants. Enfin, les coûts de production dépendent aussi de la valeur des produits de l'embryogenèse somatique. Ces coûts seront fonction d'une part de la demande économique et d'approvisionnement, et d'autre part de la valeur ajoutée apportée par le produit de l'embryogenèse somatique. Ce dernier point comprend l'uniformité clonale, l'amélioration de la résistance aux maladies et ravageurs et de tout autre caractère génétique capturé par les méthodes classiques de sélection ou de génie génétique. Les critères de succès pour une commercialisation comprennent aussi le développement et l'amélioration des principes de fabrication. Il est donc nécessaire de caractériser la productivité, l'origine des coûts (biologique, autres) et le rendement de chaque étape de l'embryogenèse somatique (Polonenko 1999).

Initialement, l'embryogenèse somatique a été développée en utilisant des boîtes de Petri comme support et la germination des embryons somatiques était réalisée *in vitro*. Si ces conditions sont adaptées pour établir des tests clonaux, elles apparaissent inappropriées pour une production commerciale. L'automatisation de l'embryogenèse somatique comprend la multiplication en milieu liquide, la maturation en bioréacteur, la sélection et la déshydratation des embryons somatiques. Mais les conditions optimales sont fortement clones-spécifiques (Timmis 1998, Cyr *et al.* 2001).

L'utilisation de cultures en milieu liquide assure une amplification rapide du matériel et une homogénéité de production. Cela a été développé chez *Picea* sp., *Pseudostuga menziesii* et *Pinus taeda*. Les bioréacteurs, qui utilisent des supports solides et des milieux liquides, permettent de moduler des étapes clé de la maturation (ajout d'ABA, d'agents osmotiques…). Il a été estimé qu'un bioréacteur était l'équivalent de 30 boîtes de Petri. Chez le Douglas, l'utilisation de ces bioréacteurs a amélioré le rendement et la sélection des embryons somatiques en permettant la déshydratation de milliers d'embryons (Cyr *et al*. 2001). Une évolution possible pour un développement à grande échelle comprendrait la sélection des cultures et des embryons somatiques assistée par analyse d'image (Hamalainen et Jokinen 1992, Roberts *et al.* 1995). Cependant, l'efficacité de cette utilisation n'a pas encore été démontrée. En effet, le cas des gymnospermes est plus difficile que celui des angiospermes pour lesquels plusieurs laboratoires sont arrivés à mettre au point une méthode moyennement efficace. La Weyerhaeuser (Timmis et Ghermay 1997) a quelques réalisations à son actif mais le paramétrage informatique doit être mis au point spécifiquement pour chaque clone (synthèse récente : Zhang *et al.*1999 et surtout Ibaraki 1999) .

Le développement de graines artificielles requiert la capacité de pouvoir les conserver et les traiter comme des semis. Chez les conifères, deux approches ont été développées. Tout d'abord, la fabrication d'un prototype de graine artificielle comprenant l'embryon somatique entouré d'un tégument imperméable et d'un mégagamétophyte artificiel, le tout présentant un point de moindre résistance pour la sortie racinaire (Carlson et Hartle, 1995, Timmis 1998). Cette graine synthétique renferme des éléments nutritifs, des antibiotiques et des régulateurs de croissance. Cependant, l'application pratique n'a pas encore été réalisée à ce jour. La deuxième approche consiste en la germination directe des embryons somatiques (Cyr *et al.*

2001, Sutton 2002). L'efficacité de ce système a été démontrée pour *Picea* sp., *Pseudostuga menziesii*, *Pinus radiata* et *P. taeda*. L'utilisation commerciale semble envisagée car adaptée aux pratiques des professionnels pour leurs semis.

Au Canada, Etats-Unis, Nouvelle-Zélande, de nombreuses compagnies privées (CellFor Inc, Westvaco, Weyerhauser,…) utilisent déjà l'embryogenèse somatique à une échelle pré-industrielle pour la production de plants de conifères d'importance pour ces pays (Park *et al*. 1998, Polonenko 1999, Timmis 1998, Sutton 2002). Le grand nombre de brevets déposés par ces compagnies (voir tableau 1) révèle l'intérêt qu'elles portent à une utilisation éventuellement commerciale de l'embryogenèse somatique. Force est de constater qu'à ce jour rien n'est encore fait en France et en Europe dans ce domaine alors que des systèmes performants d'embryogenèse somatique ont été pré-développés (pour la France, *Picea abies* à l'AFOCEL, *Larix* sp. à l'INRA). Il est vrai que nous ne disposons que de peu de données quant aux limites d'application de l'embryogenèse somatique. En effet, les productions réalisées à ce jour restent du domaine confidentiel (quelques centaines voire milliers de plants, quelques productions ponctuelles d'une dizaine de milliers de plants par clones ont été réalisées par l'AFOCEL).

Nous ne disposons que de peu de publications concernant la production commerciale de plants de conifère issus d'embryons somatiques. La majorité de l'information concerne en fait une espèce (*Picea glauca* x *engelmannii)*. La production d'un lot de plus de 10 000 plants, rapportée pour la première fois en 1993, avec un total cumulé de 1 million de plants en 1999. Plus récemment, ont été rapportées des productions pour *Picea sitchensis* (1998, 50 000), *P. glauca* (2000, 1.45 million), *Pinus taeda* (1999-01, 0.2 million), et *Pseudostuga menziesii* (2000-01, 0.5 million) représentant un total cumulé de 3.2 millions de plants issus d'embryons somatiques (Cyr *et al.* 2001). Une production pilote pour *Pseudostuga menziesii* en utilisant des bioréacteurs et la germination directe en serre était attendue pour 2001 (Cyr et Klimaszewska 2002). Enfin très récemment, pour le Douglas et le pin taeda, CellFor rapporte une production annuelle de 2 millions de plants issus d'embryons somatiques (Sutton 2002).

L'utilisation de l'embryogenèse somatique dans un but de production de plantes à l'échelle industrielle requiert une meilleure compréhension et un meilleur contrôle du processus ainsi que la réalisation d'essais de pré-production à échelle croissante en utilisant du matériel amélioré. Les améliorateurs et les partenaires industriels potentiels doivent être associés au développement de cette biotechnologie en participant à la réflexion pour une efficacité accrue. Ces conditions sont déterminantes pour assurer la supériorité effective de l'embryogenèse somatique en tant que procédé de multiplication végétative ou de clonage conforme. Cela est acquis depuis plusieurs années pour la plupart des cultures industrielles tropicales (café, cacao, banane,…).

.

Table 1 . Brevets déposés en embryogenèse somatique (SE) des conifères.

Pays/Numéro/Année	Titre	Détenteur
-1-Procédé:		
Général ("recette")		
WO 94/00051 1995	Growth medium for conifer embryogenic tissue	N. Z. Forest Res. Inst. L.
USA 5,413,930 1995	Method for regeneration of coniferous plants by SE	Westvaco
USA 5,482,857 1996	Method for reproducing douglas-fir by SE	Weyerhaeuser Co.
USA 5,565,355 1996	Growth medium	N. Z. Forest Res. Inst. L.
USA 5,506,136 1996	Method for regeneration of coniferous plants by SE	Westvaco
USA 5,534,433 1996	Basal nutrient medium for in vitro cultures of loblolly pines	Westvaco
USA 5,731,191 1998	Method for regeneration of coniferous plants by SE employing polyethylene glycol	Westvaco
USA 5,731,203 1998	Method for regeneration of coniferous plants by SE	Westvaco
USA 5,731,204 1998	Method for regeneration of coniferous plants by SE employing polyethylene glycol	Westvaco
USA 5,821,126 1998	Method for clonal propagation of gymnosperms by somatic polyembryogenesis	University of California
WO 01/56368 2001	Method for producing somatic embryos of pine trees (genus *Pinus*)	Ramirez Serrano C.
Initiation		
USA 4,217,730 1980	Embryogenesis of gymnosperm forest trees	Weyerhaeuser Co.
USA 5,310,672 1994	Induction of SE in taxus, and the production of taxane-ring containing alkaloids	Union Camp Corporation
USA 5,501,972 1996	Production of embryogenic callus of Norway spruce and regeneration of plantlets	Wescott
WO 96/00049 1996	Improved embryogenesis process for initiation and maturation	Carter Holt Harvey L
USA 5,677,185 1997	Method for regeneration of coniferous plants by SE in culture media containing abscisic acid	Westvaco
USA 5,856,191 1999	Method for regeneration of coniferous plants by SE in culture media containing abscisic acid	Westvaco
WO 99/23874 1999	Method for rejuvenating gymnosperms by SE	AFOCEL
Multiplication, suspension		
USA 4,957,866 1989	Method for reproducing coniferous plants by SE	Weyerhaeuser Co.
USA 5,491,090 1996	Embryogenic coniferous liquid suspension cultures	Westvaco
USA 5,563,061 1996	Method for reproducing conifers by SE using a maltose enriched maintenance medium	Weyerhaeuser Co.
Maturation		
USA 5,034,326 1991	Method for reproducing coniferous plants by SE using adsorbent materials in the development stage media	Weyerhaeuser Co.
USA 5,036,007 1991	Method for reproducing coniferous plants by SE using abscisic acid and osmotic potential variation	Weyerhaeuser Co.
USA 5,041,382 1991	High concentration enrichment of conifer embryonal cells	Weyerhaeuser Co.
USA 5,236,841 1993	Method for reproducing conifers by SE using stepwise hormone adjustment	Weyerhaeuser Co.
USA 5,187,092 1993	SE in gymnosperms	Inst of Pap Sci Tech

USA 5,294,549 1994	Method for reproducing conifers by SE using mixed growth hormones for embryo culture	Weyerhaeuser Co
USA 5,523,230 1996	Method of environmental control	N. Z. Forest Res. Inst. L.
USA 6,200,809 2001	Maturation of somatic embryos	Cellfor Inc.
WO 01/20971 2001	Method for maturation of conifer somatic embryos	WoodyPlant Biotech APS
WO 01/64020 2001	Method for producing somatic embryos of scots pine (*P. sylvestris*)	Ramirez Serrano C.

Germination, Déshydratation

USA 5,183,757 1993	Process for the production, desiccation and germination of conifer somatic embryos	B. C. Res.
WO 99/26469 1999, et USA 6,134,830 2000	Method for storing and improving the survival rate of conifer somatic embryo germinants	Weyerhaeuser Co.
USA 6,180,405 2001	Starvation and storage of mature somatic embryos	Carter Holt Harvey Ltd
USA 6,340,594 2002	Production of desiccation-tolerant gymnosperm embryos	Cellfor, Inc.
USA 6,372,496 2002	Desiccation-tolerant gymnosperm embryos	Cellfor, Inc.

Analyses

USA 6,117,678 2000	Method for determining maturity of conifer somatic embryos	Weyerhaeuser Co
USA 6,150,167 2000	Method of determining conifer embryo maturity using sugar alcohol content	Weyerhaeuser Co

Transformation

USA 5,681,730 1997	Particle-mediated transformation of gymnosperms	Cellfor Inc.
WO 97/01641 1997	Stable transformation of undifferentiated conifer cells	N. Z. Forest Res. Inst. L
WO 02/31112 2002	Enhanced transformation and regeneration of transformed embryogenic pine tissue	Westvaco
WO 02/31113 2002	Enhanced selection of genetically modified pine embryogenic tissue	Westvaco

-2- Production:

USA 5,119,588 1992	Method and apparatus for culturing autotrophic plants from heterotrophic plant material	Weyerhaeuser Co
USA 5,236,469 1993	Oxygenated analogs of botanic seed	Weyerhaeuser Co
USA 5,427,593 1995	Analogs of botanic seed	Weyerhaeuser Co
USA 5,451,241 1995	Oxygenated analogs of botanic seed	Weyerhaeuser Co
USA 5,464,769 1995	Desiccated conifer somatic embryos	Univ.Saskatchewan
USA 5,486,218 1996	Oxygenated analogs of botanic seed	Weyerhaeuser Co
USA 5,564,224 1996	Plant germinants produced from analogs of botanic seed	Weyerhaeuser Co
USA 5,701,699 1997	Manufactured seed with enhanced pre-emergence survivability	Weyerhaeuser Co
USA 5,737,872 1998	Formulation for synthetic seed	Nat Res. Council Canada
WO 99/65291 1999	A process for *ex vitro* sowing and germination of plant somatic embryos	Silvagen
WO 99/65293 1999	A process for production and subsequent *ex vitro* sowing and propagation pre-germinated plant somatic embryos	Silvagen
USA 6,119,395 2000	End seals for manufacturing seed	Weyerhaeuser Co
WO 00/68357 2000	Scalable bioreactor culture process and system for the maturation of conifer somatic embryos	Université Laval
WO 00/62599 2000	Enhancing germination of plant somatic embryos by priming	Cellfor Inc.

2 - L'embryogenèse somatique des conifères : utilisation pratiques et perspectives à court terme

L'embryogenèse somatique des conifères est un outil biotechnologique utilisé à différentes fins. Elle constitue tout d'abord un outil de recherche. Intégrée aux programmes de physiologie, elle permet d'étudier les mécanismes qui régissent, entre autres, les phénomènes de dédifférenciation cellulaire, de programme ontogénétique permettant d'accréditer le concept de totipotence cellulaire. L'embryogenèse somatique constitue aussi un outil d'amélioration des espèces et de développement en foresterie, points que nous allons développer ci-dessous. Par ailleurs, les applications qui en découlent sont nombreuses ; nous ne présenterons que les plus importantes d'un point de vue appliqué (cryoconservation, transformation génétique).

2.1. Articulation avec les programmes d'amélioration

L'embryogenèse somatique, dont l'intégration dans les programmes d'amélioration commence à être étudiée (Högberg *et al.* 1998, Park 2002), offre à l'améliorateur d'une espèce forestière une méthode particulièrement performante pour deux principales raisons : la multiplication rapide et en masse de génotypes élites issus de croisements contrôlés et la conservation à long terme dans l'azote liquide du génotype sans perte de sa juvénilité. Nous présenterons les besoins estimés en concertation avec les améliorateurs (réflexion menée par Annie Raffin) pour les différentes applications possibles de l'embryogenèse somatique aux programmes d'amélioration.

2.1.1. Besoins des améliorateurs

L'embryogenèse somatique permet d'accélérer et d'améliorer la précision de l'évaluation clonale des génotypes quelle que soit la stratégie de sélection choisie, que cette dernière vise la production de variétés par voie générative ou par voie végétative (Shaw et Hood, 1985). Son niveau d'intégration dans les schémas d'amélioration dépend de l'espèce et de la place de la multiplication végétative dans la création variétale. La mise en œuvre de l'embryogenèse somatique à un programme d'amélioration se justifie cependant pour des programmes d'amélioration avancés.

2.1.1.1. Gestion à long terme de la population d'amélioration

A. *Conservation à long terme de génotypes (ressources génétiques, matériel de recherche)*

Chez les conifères, la performance d'un génotype ne peut guère s'apprécier valablement avant 10 voire 15 ans selon les espèces et selon les critères concernés. Dans un schéma classique où le génotype est conservé sous forme de pied-mère, ce dernier, du fait de la longueur de la phase d'évaluation, subit un vieillissement physiologique le rendant inapte à produire des boutures. Dans le cas où le génotype est cryoconservé, l'améliorateur dispose à l'issue de la longue phase d'évaluation d'un matériel juvénile apte à produire en masse les génotypes sélectionnés. De fait, les cultures embryogènes de conifères peuvent être stockées indéfiniment dans l'azote liquide à –196°C sans changement de leurs caractéristiques physiologiques et génétiques originelles, et notamment leur forte aptitude à la régénération liée à la juvénilité (Partie 2.2.1). Ainsi, l'améliorateur est assuré de la conservation de la juvénilité de son matériel. Par ailleurs, le fait que les génotypes puissent être conservés, peut aussi entraîner une réduction des coûts de gestion du matériel (gain en temps et espace) en parcs à pieds mères traditionnels.

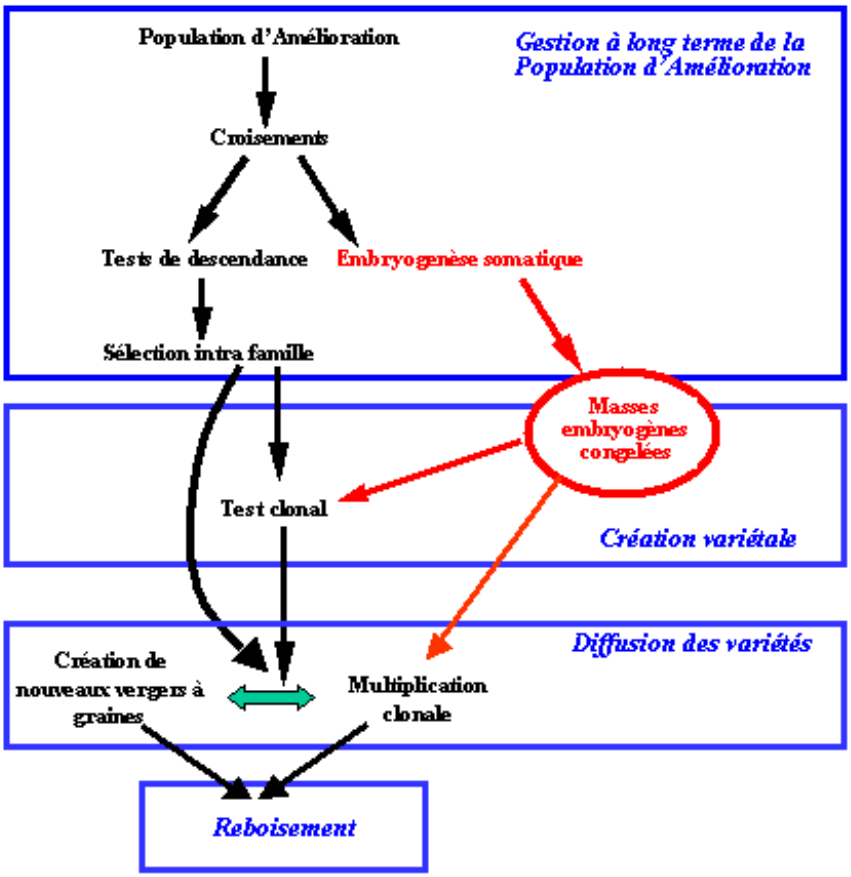


Figure 3. Embryogenèse somatique: intérêt pour les programmes d'amélioration, type pin maritime

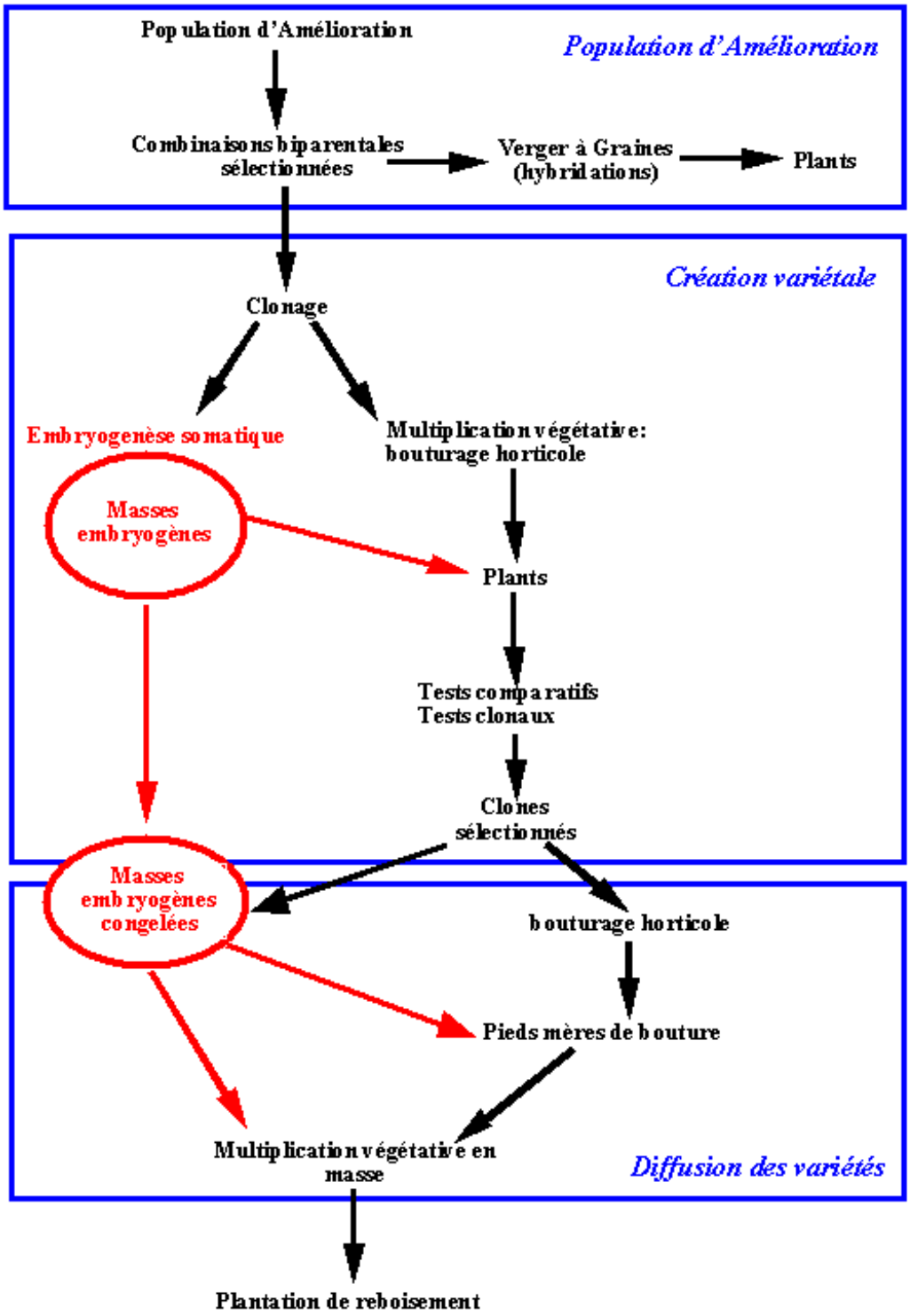


Figure 4. Embryogenèse somatique: intérêt pour les programmes d'amélioration, type Mélèze hybride (pourrait également concerner le pin maritime)

Besoins estimés avec les améliorateurs : démontrer la conformité morphologique et moléculaire des plantes somatiques produites à partir de clones cryoconservés à long terme (15 à 25 ans).

B. *Augmentation de la pression de sélection intra-famille (*Figure *3 : exemple pin maritime)*

La plupart des programmes d'amélioration à long terme reposent sur une sélection récurrente cumulant plusieurs cycles associant évaluation génétique, sélection et recombinaison. En absence d'outil de multiplication végétative, l'efficacité de la sélection repose essentiellement sur une valorisation des effets génétiques additifs, estimables grâce à une structuration familiale du matériel végétal mis en test. Une amélioration significative de ces schémas de sélection récurrents est attendue par l'introduction de l'outil multiplication végétative dans la phase d'évaluation génétique du matériel. La mise en place de tests clonaux multisites avec un nombre suffisant d'individus permet de réaliser la sélection des meilleurs individus dans les meilleures familles à partir d'estimation de valeurs génétiques totales prenant en compte les interactions et l'effet de l'environnement.

Dans le cadre du schéma d'amélioration du pin maritime, l'introduction d'une méthode de multiplication végétative, comme l'embryogenèse somatique, permettrait de réaliser des tests plus étoffés (s'affranchissant notamment de l'effet du porte-greffe ou de la sélection des meilleures greffes ou boutures d'un génotype pour la plantation, risquant de biaiser l'estimation des performances) afin d'optimiser la sélection génétique intra-famille avant recombinaison pour création d'une nouvelle génération, et d'améliorer simultanément la sélection des géniteurs installés dans de nouveaux vergers à graines (Figure 3).

Remarque : Une limite actuelle de l'embryogenèse somatique semble être la forte dépendance génétique de la capacité de propagation par cette technique de multiplication végétative. Pour certaines espèces, il est encore difficile d'obtenir à volonté, la multiplication d'un grand nombre de clones différents issus de croisements contrôlés de compositions parentales variées. Une alternative possible pourrait être la production en masse par embryogenèse somatique de porte-greffes génétiquement homogènes. Ainsi, un certain nombre de caractères d'intérêt, tels que la phénologie ou les caractères de branchaison, pourraient être évalués en tests clonaux utilisant des plants greffés.

Besoins estimés avec les améliorateurs : quelques copies seulement du maximum d'individus par famille (5-6 copies mesurées sur 3 à 5 sites, soit au plus 30 copies/individu).

C. Recherches cognitives : intérêt pour la détection de QTL

L'efficacité de la sélection assistée par marqueurs dépend de la précision acquise dans la phase de détection de QTL (régions de l'ADN gouvernant des caractères quantitatifs tels que croissance ou qualité du bois). L'évaluation en test clonal de la valeur génétique totale de tous les individus d'un pedigree donné devrait elle aussi améliorer considérablement la détection de QTL.

Une fois de plus, il est nécessaire que la méthode de multiplication végétative, ici l'embryogenèse somatique, n'exerce pas de pression de sélection significative sur le matériel végétal utilisé. Les ségrégations observées, pour les différents marqueurs, doivent être comparables dans la population avant multiplication végétative et dans la population issue d'embryogenèse somatique. Il faut donc prévoir de démontrer qu'il y a bien absence de sélection génétique par la méthode (liaison négative de l'aptitude à la multiplication par embryogenèse somatique avec des caractères d'intérêt, perte de diversité), ce qui a déjà été réalisé chez l'épicéa commun, espèce présentant une bonne aptitude à la multiplication végétative (Passerieux *et al.* 1999). Il serait cependant souhaitable de vérifier cette hypothèse

pour des espèces présentant une faible aptitude à la multiplication végétative, comme le pin maritime.

Besoins estimés par les améliorateurs (A. Raffin,…) : 15 copies par individu pour 1000 individus par famille (pour une à quelques familles tout au plus).

2.1.1.2. Création variétale

Cela s'adresse à des espèces pour lesquelles la création de variétés multiclonales est envisagée (pin radiata, pin maritime, Douglas, mélèze hybride). Ces variétés multiclonales sont constituées d'un mélange de clones élites sélectionnés dans des familles elles-mêmes très performantes.

A. Exemple du mélèze hybride (Figure 4)

Il s'agit donc d'optimiser la composition génétique de variétés multiclonales en identifiant en test clonal les meilleurs individus des meilleures combinaisons parentales disponibles. Cette sélection clonale sera d'autant plus efficace que la valeur génétique totale G des individus candidats, sera estimée avec précision sur un grand nombre de sites.

Une fois les meilleures combinaisons parentales produites par croisements contrôlés, une partie des graines obtenues peut être clonée soit par multiplication végétative horticole (bouturage) soit par embryogenèse somatique. Pour celle-ci, chaque culture embryogène initiée à partir d'une graine immature, sera d'une part multipliée, pour produire de 30 à 50 plants, et d'autre part cryoconservée. Tous les plants obtenus (par bouturage ou par embryogenèse somatique) serviront ainsi à l'évaluation d'un maximum de génotypes en tests clonaux multisites. L'évaluation génétique concernant plusieurs caractères d'intérêt s'exprimant à des âges très différents et rarement précoces, une sélection des meilleurs clones ne pourra être envisagée qu'à l'âge de 10-15 ans. Une fois la composition génétique de la variété multiclonale fixée, il reste à organiser la phase de production en masse de cette variété pour une utilisation en reboisement. Dans un schéma classique où la multiplication végétative horticole est maîtrisée, cette production en masse est réalisée par bouturage à partir de parcs à pied-mères régulièrement entretenus. L'embryogenèse somatique permet quant à elle de s'affranchir de ces coûts d'entretien de parcs à pied-mères. Les cultures embryogènes des clones élites composant la variété multiclonale sont simplement décongelées. Elles seront alors utilisées soit directement pour la production en masse de la variété, soit indirectement pour la reconstitution spécifique de pied-mères de bouture.

Chez les conifères, la production d’un nombre suffisant de copies d’un individu par bouturage horticole (lorsqu’il est techniquement possible comme chez le mélèze, Douglas), nécessite un délai d’au moins 4 ans. Grâce à l’embryogenèse somatique, ce délai est réduit de moitié.

Bien qu'il soit nécessaire de réaliser des tests clonaux pour identifier les plus performants, le gain génétique dans ce schéma est bien plus important que dans un schéma utilisant du matériel non testé au niveau individuel (plants issus de vergers à graine, Park 2002).

B. Etablissement de tests clonaux

L'établissement de tests clonaux est indispensable et constitue un pré-requis à la diffusion des clones "élites" dont les performances seront connues. Un certain nombre d'entreprises en Amérique du Nord et Nouvelle-Zélande (JD Irving Lim., CellFor, CHHF, Weyerheauser) ont commencé à intégrer l'embryogenèse somatique en produisant un petit nombre de plants pour un grand nombre de clones dans le but d'établir ces tests clonaux (Tableau 2). Des programmes ont été initiés avec l'objectif de tester de 500 à 2000 clones à partir de 10 à 30 croisements (Sutton 2002). Généralement, les niveaux d'amélioration génétique désirés nécessite la sélection des 5% de clones les plus performants. CellFor (Canada, Colombie Britannique) a engagé des programmes de tests clonaux au cours de ces 8 dernières années

et a maintenant des plants en test représentant plus de 4500 clones (toutes espèces confondues, Tableau 2). La commercialisation de clones testés est en démarrage (*Picea glauca* au Canada depuis quelques années, pin radiata en Nouvelle-Zélande à partir de fin 2003).

Tableau 2 : Nombre de clones établis en tests, obtenus par embryogenèse somatique (Park communication personnelle, Sutton 2002)

Organisation	Espèce	Nombre total de Clones testés	Date de plantation
J.D. Irving Ltd*			
(Canada, Est)	*Picea abies*	*208*	1999, 2001
	P. glauca	678	2000, 2001, 2002
	P. mariana	356	1996, 2000
CellFor**			
(Canada, Ouest)	*Pseudotsuga menziesii*	75	2001
tests clonaux au Chili	*Picea* sp. *(glauca, sitchensis, glauca x engelmannii)*	1900	2001
	Pinus taeda	*590*	2001
	Pinus radiata	1953	2001

*** :** en général, la stratégie adoptée pour les tests clonaux à chaque cycle d'amélioration est de tester 200 à 300 clones plantés dans 3 à 4 sites en utilisant 10 ramets par site (Park, communication personnelle). **** :** (Sutton, 2002)

C. Exigences techniques

Le succès de l'intégration de l'embryogenèse somatique en vue d'une production clonale nécessite des rendements d'initiation des cultures embryogènes et de productions de plants suffisamment élevés. L'amélioration des taux d'initiation de l'embryogenèse somatique a constitué une activité de recherche conséquente car elle est dépendante de nombreux facteurs comme le milieu de culture, le stade de développement de l'embryon zygotique (maturité de la graine) et l'influence génétique. Chez les épicéas, les taux d'initiation sont suffisamment élevés (au dessus de 65%) et 80% des cultures embryogènes produisent des plantes (Park 2002). A l'inverse, à ce jour pour les pins, les taux d'initiation restent encore bas.

Besoins estimés avec les améliorateurs :

Par génération d'amélioration, les besoins sont de l'ordre de 300-500 familles dans le cas idéal, 30-40 individus par famille et 15 copies par individu. Les besoins minima sont estimés à 100 familles.

2.1.1.3. Diffusion de matériel amélioré

Cela s'adresse aux espèces pour lesquelles il y a une forte valeur ajoutée (le mélèze hybride par exemple). Par ailleurs, une bonne acceptabilité de l'embryogenèse somatique comme outil classique de multiplication végétative est indispensable. Cela passe d'abord par l'acceptabilité des boutures (en mélange = bulk puis en multiclonal) et la garantie d'une acceptabilité économique.

A. *Multiplication des clones sélectionnés*

Exigences techniques

L'influence de la génétique sur les différentes étapes du processus d'embryogenèse somatique est bien connue. Chez *Picea glauca* une étude a été menée à partir de 30 familles de pleins frères obtenues par croisement diallèle (Park *et al.* 1993, 1994). Si l'initiation de l'embryogenèse somatique est sous un contrôle génétique fort (69% de la variance totale est due à des effets génétiques), cette influence génétique décroît rapidement au cours des étapes suivantes (9% pour la maturation et 3% pour la germination). Par conséquent, c'est l'étape d'initiation qui peut être le plus efficacement influencée par l'amélioration parce qu'une grande partie de la variance est additive (42% de la variance totale). Par ailleurs, aucune corrélation n'a pas été mise en évidence entre les rendements des différentes étapes de l'embryogenèse somatique. Outre chez *Picea glauca*, chez *Pinus strobus* l'initiation de l'embryogenèse somatique est aussi sous influence génétique (Klimaszewska *et al.* 1991). Par ailleurs, l'ampleur de l'effet génétique semble très variable selon l'espèce et visiblement assez faible chez le pin maritime mais une étude solide nécessite une quantité importante de matériel végétal difficile à produire (croisements contrôlés réciproques) sur plusieurs sites pendant plusieurs années.

Par ailleurs, l'intégration de l'embryogenèse somatique aux méthodes de multiplication commerciale nécessite le maintien de la stabilité génétique des cultures embryogènes au cours de leur cryoconservation, ce qui ne pose pas de problème (voir 2.2.1.2.).

Diversité génétique

L'un des problèmes majeurs soulevé par l'utilisation de clones en plantation est le risque d'avoir une base génétique étroite rendant alors les plantations clonales plus vulnérables aux maladies et ravageurs que les arbres en forêt. Cependant, comparés aux plantes de grande culture (très domestiquées), les plantations en forêt ont une base génétique extrêmement large pour les caractères de résistance.

Dans une population clonale, le risque réside dans le fait de multiplier involontairement des génotypes sensibles. Il est généralement admis que plus grand est le nombre de génotypes multipliés, plus bas est le risque. Cependant augmenter le nombre de clones dans une plantation résultera dans la réduction du gain génétique. La question subjacente est donc : "quel serait le nombre adéquate (sûr ?) de clones dans une plantation clonale ?". En utilisant différentes approches, les scientifiques estiment généralement que planter 10 à 30 clones en mélange dans une plantation devrait être suffisant pour prévenir les risques tout en conservant les bénéfices d'une sylviculture clonale (Hühn 1987, Libby 1982, Roberds et Bisher 1997, Hubert et Bastien 1999, Sutton 2002). Lindgren (1993) définit différents facteurs à prendre en considération pour déterminer le nombre optimal de clones à utiliser :
- si l'espèce a une durée de vie limitée ou est exploitée en courte rotation, un nombre plus faible de clones peut être utilisé du fait que la période d'exposition à des risques potentiels sera réduite.

- un nombre très peu élevé de clones peut être acceptable dans le cas d'une conduite d'une sylviculture intensive et incluant un contrôle sanitaire.
- mieux un clone sera connu (caractérisé, testé), plus son utilisation sera acceptable.

Une fois le nombre de clones défini, une stratégie de diffusion de ceux-ci doit être adoptée. Elle peut consister en un mélange aléatoire de clones ou en une mosaïque de parcelles monoclonales (Libby 1987). Cependant, compte tenu de l'organisation de la forêt française, le contrôle de la formation de mosaïque sera difficile voire impossible.

Récemment, Park (2002) propose pour la province canadienne du Nouveau Brunswick , une autre alternative à savoir le mélange de clones et de semis. La plantation serait constituée de 60% de plants issus d'un mélange des meilleurs clones, identifiés à partir des tests génétiques, les 40% restants étant constitués de plants issus de graines récoltées en verger à graines. En plus de réduire le coût de la plantation, le mélange de clones et de semis augmentera la diversité initiale de la plantation. De plus, environ 40% de la plantation d'origine est en général éclaircie à la moitié de l'âge de l'exploitabilité, gardant les arbres de qualité supérieure pour la coupe finale. Il est probable que les plants restants proviendront des clones testés et des meilleurs arbres propagés à partir des semis issus des vergers à graines. Cela maintiendra un niveau élevé de la diversité.

Conduite de la diversité au cours du temps

La sylviculture clonale doit être basée sur l'amélioration des arbres et les tests génétiques. Au niveau de la population d'amélioration, des génotypes améliorés sont régulièrement obtenus à chaque génération. Les tests génétiques des clones, obtenus à chaque cycle du schéma d'amélioration, donneront lieu à la création de futurs clones sélectionnés. Par conséquent la composition du mélange de clones, pour les futures plantations clonales, pourra varier au cours du temps. Par ailleurs l'évaluation des tests génétiques en tests successifs, conduira en permanence à revoir les compositions clonales disponibles pour chaque plantation. La diversité des plantations clonales peut donc elle aussi être gérée de manière évolutive au cours du temps. Cependant, cela dépend de la réglementation.

Conclusion

La sylviculture clonale offre un gain génétique plus élevé que celui généralement obtenu à l'aide des méthodes classiques d'amélioration. L'embryogenèse somatique et la cryoconservation sont les clés "technologiques" rendant possible la pratique d'une sylviculture intensive clonale. Au Canada, en particulier dans les provinces de l'est, pour *Picea glauca*, *P. mariana*, *P. abies* et *Pinus strobus,* la mise en œuvre d'une sylviculture clonale utilisant l'embryogenèse somatique est réalisable et est prête à être commercialisée pour les raisons suivantes (Park 2002):
- Les rendements sont suffisamment élevés (initiation et nombre de plants produits)
- Les lignées clonales sont génétiquement stables au cours de leur cryoconservation
- Les parcelles de démonstration montrent une croissance normale.

C’est utilisé en pratique notamment par la société privée J.D. Irving limited qui assure une reforestation annuelle de 20 millions d'arbres dont 1 million de boutures. Elle a intégré les aspects appliqués de l'embryogenèse somatique au laboratoire en :
- initiant des cultures embryogènes à partir de croisements contrôlés
- cryoconservant les clones obtenus
- produisant des plants par embryogenèse somatique en vue de leur test à long terme sur le terrain.

Besoins estimés avec les améliorateurs : Il n'y a pas de besoins en déploiement aujourd'hui. Mais ils s'exprimeront nécessairement en terme de variétés clonales lorsque l'utilisation de l'embryogenèse somatique aura été validée en amélioration/sélection. Si le gain génétique est substantiel et le coût associé abordable, l'acceptabilité par les utilisateurs des variétés multiclonales sera alors facilitée.

B. *Multiplication des individus âgés*

Il s'agit là de développer l'embryogenèse à partir de tissus d'arbres âgés (10 à 15 ans minimum) dont les performances réelles sont connues de manière à pouvoir utiliser complètement le gain génétique obtenu à chaque étape d'amélioration pour chaque individu.

L'embryogenèse somatique permettrait ou faciliterait le clonage d'arbres élites. A ce jour, l'initiation de cultures embryogènes à partir d'individus âgés n'a été obtenue que pour *Picea abies* mais pas encore en routine (voir partie 3.1). L'initiation se fait généralement à partir d'aiguilles ou tout autre explant révélant des capacités à l'embryogenèse somatique.

Cet axe s'avèrerait particulièrement important dans le cas du programme d'amélioration du mélèze hybride pour lequel il n'existe pas de méthode de multiplication végétative d'individu âgé. Il est au plus haut point stratégique pour le pin maritime, essence essentiellement à vocation industrielle ; le moteur de l'amélioration de cette espèce c'est donc le gain génétique qui peut être obtenu.

Besoins estimés avec les améliorateurs : recherche fondamentale pour poursuivre l'étude des possibilités de développement des méthodes nécessaires (base brevet ou autres voies). Le développement des méthodes de production (initiation) d'embryons somatiques à partir d'arbres sélectionnés devrait être poursuivi.

2.1.2. Pré requis, précautions à prendre avant tout développement/intégration de l'embryogenèse somatique aux programmes d'amélioration

2.1.2.1. Questions cognitives

Les questions cognitives sont à traiter en priorité si l'on souhaite un jour réellement intégrer l'embryogenèse somatique aux programmes d'amélioration/sélection. Les améliorateurs insistent sur le fait que ces questions cognitives se posent pour chaque espèce. Ainsi, il est peu probable que les réponses déjà apportées chez certaines espèces (*Picea glauca*, *P. glauca engelmannii*…) pourront être transposées à toutes. La question cognitive la plus importante à analyser semble être l'impact de l'embryogenèse somatique sur la diversité génétique de populations d'amélioration ou bien encore de familles multipliées pour la recherche de QTL.

2.1.2.2. Essais de démonstration

L'utilisation de l'embryogenèse somatique par les améliorateurs ne sera effective qu'après avoir démontré le comportement conforme des plants issus d'embryogenèse somatique. Pour ce faire, il faut continuer à installer des essais de démonstration qui viseront à comparer embryons zygotiques et somatiques sur le long terme et vérifier le comportement " normal " du matériel issu d'embryogenèse somatique à partir de familles ou de génotypes déjà repérés pour leurs performances (adaptation, croissance…).

2.1.3. Conclusions

A court terme, les nombreux avantages de l'embryogenèse somatique en font un outil performant pour le développement des programmes d'amélioration. Associée à la cryoconservation, la perspective de conservation à très long terme des ressources génétiques est réelle. A moyen terme, l'embryogenèse somatique va prendre une place croissante dans la diffusion de variétés très améliorées dans le cadre de sylviculture à forte productivité en Amérique (USA, Canada, Chili) et en Océanie (Australie, Nouvelle-Zélande) qui y ont consacré des efforts de recherche importants depuis 20 ans ayant profité des synergies importantes liées à l'intérêt.

L'Europe, pionnière dans le domaine, est à la traîne, tout en ne pouvant bénéficier que d'une partie infime des résultats étrangers, la gamme d'espèces cultivées étant différente..

Les améliorateurs ont besoin d'une méthode de multiplication végétative performante pour accélérer leurs programmes d'amélioration/sélection, de création variétale et de déploiement de génotypes élites. C'est particulièrement vrai pour les pins car pour beaucoup d'entre eux les méthodes de multiplication végétative horticoles ne sont pas performantes. De plus, l'extrapolation à d'autres programmes dans le monde (Nouvelle-Zélande, USA) est plus intéressante (fort développement des espèces de *Pinus* économiquement importantes). C'est pourquoi, il faut l' amélioration du rendement qualitatif et quantitatif de la maturation est nécessaire afin de réussir à produire :

- un petit nombre de copies par individu (une quinzaine) pour beaucoup d'individus par famille (de l'ordre de 50 pour les tests clonaux à 1 000 pour la recherche de QTL) pour 100 à 500 familles (tests clonaux) ou quelques familles seulement (recherche de QTL).
- un grand nombre de copies pour les clones sélectionnés pour la phase de déploiement.

Le point capital pour les améliorateurs, c'est de pouvoir tester le maximum de de la variabilité disponible. L'idéal est donc de tester en multiplication végétative beaucoup de familles et beaucoup d'individus par famille. Or les besoins annoncés par les améliorateurs sont parfois énormes. Dans le cas du pin maritime, ils sont estimés à 300-500 familles et 30-40 lignées/famille soit 20 000 lignées. En comparaison, le total des collections existantes au monde, toutes espèces de conifères confondues, est à peine équivalent à ce chiffre. L'échelle de travail est donc radicalement différente. Une question se pose tout de même : les besoins exprimés seront-ils ponctuels ou graduels au cours du programme d'amélioration ? Si l'objectif s'avère trop ambitieux dans le cadre d'une utilisation de l'embryogenèse somatique, il est souhaitable de constituer des populations de familles élites (lignées) qui sont dix fois plus petites que les populations d'amélioration de base. L'embryogenèse somatique pourrait répondre à cet objectif.

- Les pertes éventuelles de diversité génétique, garante d'un bon potentiel d'adaptation aux fluctuations environnementales, liées à l'utilisation de l'embryogenèse somatique doivent être estimées rigoureusement. Pour les améliorateurs, c'est un pré-requis à l'usage de l'embryogenèse somatique. Il paraît aussi particulièrement important de se lancer dans une campagne d'installation de tests de démonstration qui répondent aux attentes des améliorateurs et des planteurs, plus particulièrement dans le cas du pin maritime pour lequel l'embryogenèse somatique serait un outil extrêmement intéressant car couplé à la cryoconservation. De tels tests permettront également aux utilisateurs potentiels pour valider progressivement l'acceptabilité des sélections clonales et plantations multiclonales. Mais sans oublier le fort contenu psychologique de la question. En effet, aucune corrélation stricte entre diversité clonale et adaptabilité ou résistance n'a a ce jour été démontrée. Les possibilités offertes par le mélange (bulk) de clones à différentes étapes (laboratoire ou pépinière)devront être explorées. Que ce soit dans un sens ou dans un autre, nous ne devons pas conclure hâtivement sur la question puisque le passé nous montre que les

pratiques présentées comme définitives à un moment donné peuvent changer mais lentement (ex. 1. 50% des reboisements se font encore avec des semis malgré l'acceptation et la forte extension des plantations; 2. à l'époque du gemmage, les arbres droits étaient volontairement contre-sélectionnés).

Enfin, nous devrons renforcer les interactions avec les améliorateurs dans un premier temps, puis avec les sylviculteurs (les améliorateurs tentent normalement de répondre aux besoins des sylviculteurs donc notre interlocuteur favori est bien l'améliorateur et non pas le sylviculteur !) afin d'intégrer au mieux leurs besoins et leurs contraintes. Nous proposerons également notre aide aux chercheurs plus fondamentaux intéressés par le matériel végétal que nous pouvons produire.

2.2 Articulation avec les autres biotechnologies

Chez les conifères, les perspectives d'utilisation des cultures embryogènes sont nombreuses, l'attrait pour ce matériel végétal provenant de sa forte réactivité et capacité de régénération. L'une des premières utilisations des cultures embryogènes fut l'isolement de protoplastes aboutissant, pour la première fois chez les conifères, à la régénération de plantes à partir de ceux-ci (Gupta et Durzan 1987). Depuis, les principales applications développées sont la cryoconservation et la transformation génétique présentées plus loin.

2.2.1. Les méthodes de conservation

Elles sont nombreuses. Seules seront présentées les deux techniques les plus importantes, c'est-à-dire la déshydratation et la cryoconservation.

2.2.1.1. La déshydratation

Initialement la déshydratation des embryons somatiques a été réalisée dans le but d'améliorer leur germination et leur développement en plantes (Roberts *et al.* 1990). Outre le fait d'augmenter les taux de germination, les embryons déshydratés présentent un développement rapide et surtout *synchrone* : le matériel dont on dispose est donc plus homogène, ce qui rend sa manipulation plus facile.

La déshydratation a ensuite été envisagée comme une méthode de conservation des embryons somatiques (Lelu *et al.* 1995). Des études montrent qu'il est possible de maintenir en vie des embryons déshydratés pendant des mois voire des années. L'avantage est de pouvoir manipuler des centaines voire des milliers d'embryons somatiques physiologiquement identiques produits progressivement mais mis en germination de manière groupée, aboutissant donc à un développement homogène des plantes. C'est particulièrement pratique dans le cas d'une production en grande quantité de plants d'un grand nombre de clones aux différents comportements en culture *in vitro*. Néanmoins, la déshydratation d'embryons somatiques ne constitue pas une conservation à très long terme et n'est pas encore optimisée et disponible pour toutes les espèces.

2.2.1.2. La cryoconservation

Chez les conifères, la cryoconservation dans l'azote liquide est exclusivement réalisée à partir de matériel juvénile, en particulier les masses embryonnaires en multiplication. Il est aussi possible de cryoconserver des embryons somatiques matures (cotylédonaires = prêts à germer).
A partir des masses embryogènes, la cryoconservation a été réalisée pour la première fois chez *Picea abies* et *Pinus taeda* (Galerne et Dereuddre 1987, Gupta *et al*. 1987) puis chez

Picea glauca (Kartha *et al.* 1988) ; depuis elle a été obtenue pour 26 espèces représentées par les genres *Abies* (1), *Larix* (6), *Picea* (8), *Pinus* (10) et *Pseudotsuga* (1) (Cyr 1999).

Réussite, stabilité et précautions à prendre

La tolérance à la cryoconservation est en moyenne supériure ou égale à 90% pour des espèces comme *Pseudostuga menziesii* (Gupta *et al.* 1994), *Picea glauca engelmannii* (Cyr *et al*. 1994), *Picea glauca* (Park *et al*. 1994), *Pinus pinaster* (Bercetche et Pâques 1995) et ne semble pas dépendante du facteur famille (Norgaard *et al.* 1993). Le principal facteur déterminant le succès à la cryoconservation est la qualité du matériel à congeler. Les masses embryogènes doivent, avant congélation, être en croissance très active (Cyr *et al.* 1994, Park *et al*. 1998). La régénération de plantes, à partir de masses embryogènes congelées, a été rapportée par de nombreux auteurs (revue dans Cyr 1999). Considérant leur phénotype, les plantes apparaissent normales et ont été transférées sur le terrain (Lainé *et al.* 1992, Klimaszewska *et al.* 1992, Find *et al*. 1993, Cyr *et al.* 1994).

La question préliminaire à l'utilisation de la cryoconservation est celle de la stabilité du matériel congelé. Les cultures congelées doivent être conformes au matériel d'origine ; cela concerne aussi bien les aspects physiologiques (capacité de régénération) que génétiques (stabilité de l'ADN). Chez *Picea glauca,* des lignées décongelées après 3 et 4 ans de congélation, montrent, pour les traits pris en compte, une stabilité quant à leurs caractères morphologiques (développement *in vitro :* maturation, germination) et leur croissance *ex vitro* (survie, hauteur, longueur branches latérales… Park *et al.* 1998). Des résultats similaires ont été obtenu par l'AFOCEL chez l'épicéa (après 8 ans de congélation) et le pin maritime (8 ans également, Trontin *non publié*).

Cette stabilité des masses embryogènes congelées est un pré-requis à leur utilisation ultérieure. Toutes les précautions doivent être prises tout au long des phases de culture conduisant à la cryoconservation pour s'assurer de la qualité du matériel qui sera congelé. Par ailleurs, la gestion de la cryoconservation dépend de l'utilisation qui en sera faite à court terme pour des activités de recherche soit à long terme pour des activités de déploiement (constitution d'une cryobanque). En outre les précautions à prendre consistent à dupliquer le stockage des cryotubes sur plusieurs sites (répartition des cryotubes dans différents conteneurs) et à automatiser la distribution d'azote pour une sécurité optimale.

Applications

Initialement, la cryoconservation a été développée pour répondre à un souci de sauvegarde du matériel en culture *in vitro*. En effet, la multiplication des masses embryogènes nécessite un repiquage régulier (en général tous les quinze jours), ce qui représente une contrainte importante au laboratoire (disponibilité en temps et espace). Par ailleurs, ce repiquage est réalisé avec des milieux de culture contenant généralement (mais pas tous) des régulateurs de croissance comme les auxines (2,4-D). Par conséquent, les risques encourus (pertes de matériel, variations génétiques, diminution des capacités de régénération…) ont très vite incité à développer leur cryoconservation. Celle-ci s'avère à ce jour indispensable pour le genre *Pinus* pour lequel les masses embryogènes présentent une diminution voire une perte de leurs capacités de régénération, effet pouvant se révéler très rapidement après 1 mois voire 2 mois de culture. La gestion des cultures embryogènes nécessite une bonne organisation. En effet, toutes les lignées obtenues doivent être systématiquement congelées avant même de les caractériser. De plus, le nombre d'échantillons congelés devra garantir une régénération suffisante et rapide.

Par la suite, la cryoconservation est apparue comme un outil indispensable au développement de l'embryogenèse somatique (en amélioration et développement industriel).

La cryoconservation, outre ses avantages pour la culture *in vitro,* assure à l'utilisateur de disposer à volonté et à très long terme du matériel le plus juvénile qu'il soit. La cryoconservation, permettant la conservation des ressources génétiques, entraînera une réduction substantielle des coûts de gestion du matériel en parcs à pieds mères traditionnels qui présentent un certain nombre d'autres inconvénients dont la perte de l'aptitude au bouturage du matériel sélectionné. De fait pour les épicéas et les mélèzes, la propagation en bulk du matériel passe par la production de boutures à partir de pied-mères. Après 4 à 5 ans, ces pieds mères vieillissant entraînent la perte de la capacité d'enracinement des boutures qui peuvent de plus présenter une croissance plagiotrope. Cette dégradation nécessite alors de remplacer les pieds mères. En Irlande pour *Picea sitchensis*, il est prévu que, dès 2003, les plants issus d'embryons somatiques (clones, obtenus à partir de matériel amélioré, et testés) serviront de pieds mères et permettront le renouvellement tous les 5-6 ans du matériel génétiquement amélioré (Coillte Teoranta, David Thompson communication pers.). Le phénomène est encore accentué chez les espèces de pin dont la perte de l'aptitude au bouturage est particulièrement rapide, raison pour laquelle le bouturage commercial du pin maritime a été impossible jusqu'à présent en France.

Dans le cadre d'un déploiement de l'embryogenèse somatique, la cryoconservation lui est bien sûr pleinement intégrée car c'est l'association de ces deux techniques qui permet maintenant de produire à volonté au fil du temps, des arbres génétiquement identiques.

Les masses embryogènes sont initiées à partir de graines améliorées (issues de croisement contrôlé à partir d'arbres sélectionnés). Pour chaque lignée, une partie est congelée, l'autre servant à la régénération de plantes pour installer des tests comparatifs (évaluation génétique, adaptation, production…). Suite à cette évaluation montrant quels clones sont les plus performants, les stocks cryoconservés correspondants peuvent alors être décongelés et propagés par embryogenèse somatique. Les variétés développées de cette manière utiliseront pleinement la forte amplitude de gain génétique permise par la voie clonale (voir partie 2.1).

Les premières banques de clones congelés ont été initiées très tôt (années 90) par des organismes privés. Cela a conduit à l'établissement de programmes de cryoconservation au Canada, en France, Nouvelle-Zélande, Suède et USA (Tableau 3). Jusqu'en 1999, cela représentait près de 10 000 génotypes congelés, majoritairement des épicéas et pins (Cyr 1999).

Tableau 3 : Nombre de lignées embryogènes de conifères congelées en vue de constituer une banque de clones (extrait de la revue Cyr 1999, actualisé en 2002). Des collections supplémentaires existent pour lesquelles aucune information précise n'est disponible (notamment en épiocéa commun et pin sylvestre chez SkogForsk, Suède).

Espèce	Nombre de Familles	Nombre de clones	Organisation
Larix sp.	-	70	Canadian Forest Service
Picea			
P. abies	3	100	AFOCEL
	5	77	Université Copenhague
P. abies et *P. glauca*	-	500	J.D. Irving Ltd.
P. glauca	30	497	Canadian Forest Service
P. glauca x engelmannii	48	2100	Cellfor
P. mariana	>30	250	J.D. Irving Ltd.
	65	300	Canadian Forest Service
P. sitchensis	23	500	Cellfor
Pinus			
P. monticola	7	58	Cellfor
P. pinaster	60	1500	AFOCEL
P. radiata	>80	1593	Carter Holt Harvey Ltd.
	-	200	NZ Forest Research Ins.
P. strobus	15	70	Canadian Forest Service
Pseudotsuga menziesii	-	700	Weyerhaeuser
	12	250	Cellfor

En conclusion, les techniques de congélation de masses embryogènes développées à ce jour sont simples, rapides et très performantes. Leur mise en œuvre ne nécessite pas un équipement lourd . Cet outil est donc très abordable et est utilisé dans tout laboratoire travaillant en embryogenèse somatique.

2.2.2. La transformation génétique

L'ajout de nouveaux caractères via le génie génétique nécessite de disposer d'une méthode efficace de culture *in vitro* permettant non seulement la transformation de cellules mais aussi la régénération efficace de plantes au départ de cellules uniques. A ce jour, l'embryogenèse somatique représente la seule technique répondant à ces critères pour les conifères. En biotechnologies forestières, la transformation génétique a très rapidement constitué une activité en développement fort devant l'émergence possible d'applications commerciales et son intérêt évident pour assister la recherche fondamentale (physiologie du développement, génomique, marqueurs moléculaires).

Historique, principe

Le développement et la maîtrise de l'embryogenèse somatique a facilité les recherches en transformation génétique et la régénération d'arbres transgéniques (Peña et Seguin 2001). Initialement, des méthodes directes de transformation génétique ont été appliquées comme l'électroporation (à partir de protoplastes). Néanmoins cette méthode a été très rapidement supplantée par la microprojection (ou biolistique) du fait de sa rapidité et de sa facilité d'utilisation. De petites particules enrobées d'ADN sont projetées jusqu'à des vitesses permettant leur pénétration dans des cellules végétales intactes en l'occurrence des masses embryogènes voire des embryons somatiques. Si la transformation génétique a ainsi été réalisée chez de nombreux conifères, elle ne donnait lieu le plus souvent qu'à une expression transitoire. Celle-ci peut toutefois s'avérer utile pour tester rapidement (quelques jours après l'introduction du gène) de nombreuses constructions plasmidiques. Par la suite, des transformations stables ont été obtenues (Ellis *et al.* 1993, Klimaszewska *et al.* 1997, Walter *et al.* 1998) mais les taux de transformation restent encore faibles (de l'ordre de 2 à 3 évènements de transformation / gramme de masse embryogène initiale).

Parallèlement à la biolistique, une méthode indirecte de transformation génétique utilisant la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* a été développée avec succès (Levée *et al*. 1997, Levée *et al*. 1999). Comparée à la biolistique, cette méthode est longue et fastidieuse car l'élimination de la bactérie est nécessaire. Cependant, son rendement en transformations stables (régénération sans difficulté de plants transgéniques) est un très net avantage. De plus, les taux de transformation sont sans conteste bien supérieurs à ceux obtenus par la méthode biolistique (de l'ordre de 50 à plus de 1000 évènements de transformation/ gramme de matériel végétal, Lelu et Pilate 2000, Klimaszewska *et al*. 2001, Trontin *et al.* 2002).

L'aptitude à la transgenèse est fonction de l'espèce et du génotype (Klimaszewska *et al*. 2001) ainsi que de la méthode de transformation. Par ailleurs, même si le transgène est efficacement intégré dans les cellules, leur expression varie en fonction du promoteur, du nombre de copies et du site d'intégration. Par ailleurs, l'établissement en plein champ d'arbres transgéniques ne pourra se faire qu'une fois que les risques principaux auront été évalués précisément pour les conifères. En particulier il sera nécessaire de s'assurer du non transfert de certains transgènes (comme ceux conférant des résistances) aux espèces sauvages. La stratégie adéquate pour résoudre ce problème serait de développer des arbres transgéniques stériles.

Applications

La transformation génétique constitue un outil précieux pour l'étude *in planta* de la régulation de l'expression des gènes et de leur fonction. Comme dans le projet européen GEMINI actuellement en cours, la transformation génétique peut être utilisée pour confirmer la fonction présumée de nouveaux gènes mis à jour par les recherches en génomique. Il s'agit d'une contribution essentielle à la mise au point rapide de marqueurs ("étiquettes") moléculaires permettant la sélection assistée par marqueurs (SAM) pour l'amélioration de la forme de l'arbre, de la qualité technologique du bois et la résistance aux stress physiques (sécheresse, froid, *etc*.) et biotiques (insectes, champignons, maladies virales et bactériennes) ainsi que des progrès dans la connaissance fine des phénomènes physiologiques sous-jacents.

La transformation génétique constitue à la fois un outil de recherche (étude fonctionnelle des gènes) et d'amélioration des espèces. Les applications possibles comprennent l'introduction de gènes conférant des résistances (herbicides, maladies, ravageurs, stress) mais aussi des altérations génétiques entraînant des modifications de caractères comme la quantité et/ou la qualité de la lignine, de la cellulose, des propriétés du bois, la stérilité.

Il devient progressivement envisageable d'améliorer les arbres forestiers en modifiant directement la structure et/ou l'expression de leur génome. Les perspectives sont importantes car c'est la notion même de ressources génétiques qui se trouve élargie aux yeux de l'améliorateur. Tout gène issu du règne vivant (procaryotes, animaux, champignons, plantes) ou même construit de toute pièce (gène artificiel) peut en effet être isolé et, par manipulations moléculaires, transféré dans l'arbre dont on souhaite modifier le génome. L'amélioration ne porte donc pas seulement sur les caractères héritables d'un individu (facilement mobilisables et transmissibles à la descendance par voie sexuée) mais également sur les caractères faiblement héritables (donc difficiles à sélectionner à court terme) ou absents au sein de l'espèce.

La réussite de la transgenèse présuppose la maîtrise de techniques de biologie moléculaire, de clonage et de régénération *in vitro* de plantes. Elle nécessite également d'avoir accès à du matériel sélectionné et aux gènes d'intérêt. L'application pour laquelle l'intérêt pratique est le plus élevé est la résistance aux maladies fongiques. Malheureusement, c'est également la plus ardue. D'autre part, si application il y a, à moyen terme (10-15 ans), cela ne sera que du ressort de l'AFOCEL, l'INRA se positionnant clairement pour une utilisation actuelle de la transgenèse des arbres forestiers exclusivement comme outil de validation et d'étude de la fonction de gènes.

Par ailleurs concernant la transformation génétique, nous touchons le domaine sensible des Organismes Génétiquement Modifiés (OGM ou AGM pour Arbres Génétiquement Modifiés). La problématique OGM en elle-même suscite une forte demande d'information. Le cas des arbres est compliqué en raison de leurs particularités biologiques (complexité bien supérieure à celle des plantes de grande culture, caractère pérenne). Avant toute utilisation de plants forestiers transgéniques, il faudra au préalable répondre aux questions relatives à l'impact sur l'environnement. Outre ces points, il est probable que l'application dépendra aussi de l'acceptabilité par l'opinion publique de ces AGM (Trontin et Harvengt 2002).

2.3. Analyse du gain économique lié à l'intégration de l'embryogenèse somatique à l'amélioration et à la production de plants

2.3.1. Introduction

Contexte de l'étude

Le coût du plant dans la filière française de production de MFR (Matériel Forestier de Reproduction) est un élément déterminant de la diffusion de matériel amélioré. Il est donc primordial de mettre en relation le coût de l'embryogenèse somatique (technique dans son état à court, moyen et long terme) et le gain potentiel.

Objectifs

Les objectifs visés par notre étude sont d'étudier :

- le gain économique lié à l'intégration de l'embryogenèse somatique dans le processus de l'amélioration (caractérisation du matériel végétal)
- le gain économique lié à l'intégration de l'embryogenèse somatique à la production de plants (diffusion du matériel amélioré, directe ou indirecte *i.e. via* pieds mères …).

Ainsi, l'analyse se fera :

- non pas en mettant en rapport le coût d'une recherche plus ou moins fondamentale et la mise au point technique avec le gain économique lié à une utilisation à grande échelle des meilleurs clones disponibles dans le futur,
- mais en mettant en perspective le coût prévisible de production de plants et le gain de performance économique qu'ils permettraient.

L'impossibilité d'obtenir pour des raisons pratiques (confidentialité, …) et techniques (spécificités des cas particuliers) les valeurs réelles des coûts de production applicables pour le cas général ne nous permet que de réaliser des estimations dont la fiabilité pourra être discutée avec les professionnels concernés. N'oublions pas que dans des limites de coût plus ou moins larges, la subjectivité et le jeu des incitations et/ou obstacles réglementaires influencent plus fortement les décisions d'achat que la réalité des coûts effectifs.

Méthode

L'approche utilisée repose sur :

- une recherche bibliographique pour toutes les essences
- une concertation avec les améliorateurs/sélectionneurs et les personnes du procédé et du terrain (aspects pépinière, sylviculture et exploitation)
- une comparaison de l'embryogenèse somatique avec les autres options techniques
- la prise en compte des réflexions qui ont pu être tenues sur :
  - l'amélioration envisagée seule
  - l'embryogenèse somatique réalisée sur le meilleur matériel issu des programmes d'amélioration
- une étude coûts/bénéfices pour :
  - une estimation du gain génétique (vigueur et rectitude, autres critères majeurs)
  - une évaluation des coûts de production par embryogenèse somatique (différents schémas et hypothèses de performances en connexion avec les spécialistes de la modélisation de la croissance).

Le gain génétique a été pris en compte de manière globale en intégrant l'influence des variations de performances sur plusieurs critères par le biais de la variation de la valeur marchande du bois produit par hectare. Les résultats ont été exprimés en valeur actualisée nette.

2.3.2. Etat de l'art

L'objet de ce chapitre est de :

- rappeler certaines approches réalisées dans d'autres domaines d'études, celles-ci pouvant permettre certaines analogies avec notre champ d'étude
- présenter le contexte général des travaux liés directement au thème étudié
- faire une synthèse des travaux centrés sur l'embryogenèse somatique

2.3.2.1. Impact économique des biotechnologies

A. Des cas particuliers à une approche généraliste

Des études d'impact économique ont été réalisées les domaines non forestiers. Ces études portent en particulier sur : les plantes annuelles (riz, maïs, …) et les animaux ("*animal breeding programs*", ILRI, 1999). De manière générale, ces travaux s'inscrivent dans l'approche traditionnelle des ressources biologiques comme source de matière.
Par exemple, les essais conduits au champ depuis 1990 ont permis de mieux cerner la différence de rendement en fonction du taux d'infestation entre un maïs classique nécessitant des traitements chimiques et les maïs transgèniques Bt résistants aux larves de lépidoptère (essentiellement la pyrale du maïs). Des simulations de bilans économiques entre les deux types de culture ont ainsi pu être réalisés (Kergoat, 1999). Aux USA, dans le cas du Coton IR (résistante aux insectes), les semences OGM apportent des solutions spécialement intéressantes dans l'Alabama et la Géorgie où le gain de l'agriculteur peut atteindre 107 €/ha. Enfin, dans le cas du Soja HT (tolérance aux herbicides totaux), les problèmes d'adventices sont très variables selon les exploitations, sans qu'il soit possible de faire ressortir des tendances régionales. Le gain de l'agriculteur du à l'usage d'OGM peut atteindre au maximum 46 €/ha (Joly*, et al.*, 2001).

Les impacts économiques et industriels sont primordiaux et appréhendés de façon directe (approches coûts/bénéfices) ou indirecte (méthode des prix hédoniques, évaluation contingente, etc.; Nunes et van den Bergh,, 2000, Riera 2001).
Certaines études sont réalisées en termes de patrimoine génétique, celui-ci faisant partie intégrante de la "valeur économique totale" (TEV, *total economic value*) qui correspondent à la somme ou à l'agrégation des valeurs directes, indirectes, d'option ou de quasi-option et des valeurs passives d'utilisation. Cette TEV est estimée pour une ressource ou un système de ressources (Plän 1999)[1]. Par ailleurs, certains travaux analysent le poids des incitations économiques sur les comportements des agents dans l'utilisation des variétés améliorées (Rausser 1998).

Malgré l'élargissement de la problématique (patrimoine) et des différents types de valeur rappelés ci-dessus, il n'en reste pas moins que les thématiques développées se placent souvent dans le *bioprospecting* défini comme l'exploration de la biodiversité dans un but d'exploitation commerciale des ressources génétiques et biochimiques.

B. Des marchés

Selon certaines estimations, le marché européen de la biotechnologie pourrait valoir plus de 100 milliards d'euros d'ici à 2005. A la fin de la décennie, les marchés mondiaux, notamment les secteurs où les sciences du vivant et la biotechnologie constituent la majeure partie des nouvelles technologies appliquées, pourraient atteindre plus de 2 000 milliards d'euros. Ces marchés potentiels directs et indirects des sciences du vivant et de la biotechnologie se décomposent en (UE, 2001) :

- Industrie : marché mondial de 1 500 milliards d'euros dans la technologie industrielle et environnementale durable en 2010 (en partie seulement dans le domaine de la biotechnologie), la technologie environnementale étant estimée à 90-120 milliards d'euros

[1] La TEV est composée de nombreuses valeurs : valeur d'option - usage réservé pour le futur ; valeur d'usage passif - mesure de la valeur donnée à l'existence d'un facteur ou d'un élément similaire pour le présent, les générations futures et les autres espèces ; valeur de quasi-option - valeur du décalage d'une décision irréversible permettant d'attendre une information additionnelle aidant à la prise de décision. La plupart des études portant sur l'évaluation de la valeur économique des forêts ne reposent que sur partie des valeurs entrant dans la TEV. Les valeurs indirectes et de non-usage sont négligées et les valeurs d'usage direct généralement considérées de façon incomplète (Plän, ,1999).

- Produits pharmaceutiques : marché mondial de 506 milliards d'euros en 2004 (818 milliards d'euros en 2010 en admettant une hausse constante)
- Agriculture : bien qu'on enregistre une augmentation régulière des surfaces ensemencées en OGM, il est difficile de prévoir la valeur de marché future, qui dépendra de l'évolution potentielle d'un marché des aliments non génétiquement modifiés pour animaux.

2.3.2.2. Biotechnologies et forêt

Une grande partie des travaux sur l'impact économique potentiel de l'usage des biotechnologies en forêt portent sur les forêts tropicales (biodiversité, forêt naturelle ; par exemple Plän 1999) et/ou sur l'intérêt que représentent ces techniques pour les pays en voie de développement (par exemple Graudal et Kjær 1998).

Globalement, ces différents thèmes reposent sur la question de l'estimation de la valeur des forêts. Ainsi, Costanza *et al*. (1997) et Kriström (1999) rappellent les estimations suivantes. Sur la base d'une estimation de la valeur totale des services produits par l'écosystème forestier :

- La moyenne annuelle par hectare est de 969 dollars, soit 12 % de la valeur total de l'écosystème mondial
- Les ressources génétiques (médecine, etc.) représentent 16 dollars par ha.

Les forêts tropicales ont une valeur plus forte puisqu'il a été estimé, au milieu des années 90, que les revenus par hectare représentaient de 262 dollars à 1 000 dollars (Plän 1999).

<u>Les politiques de développement des applications pratiques des biotechnologies forestières.</u>
Les implications politiques se retrouvent par exemple dans la stratégie canadienne en matière de biotechnologie. Celle-ci a été refondue en 1998 pour garantir une réglementation appropriée au secteur des biotechnologies en pleine expansion. Le nouveau cadre stratégique comporte des paramètres sociaux, éthiques, sanitaires, environnementaux et réglementaires. Plus largement, les implications politiques se retrouvent surtout dans les deux dimensions suivantes :

A. **<u>Acceptabilité</u>**

- *Acceptabilité sociale*

Les études canadiennes indiquent qu'il n'y a pas d'éléments montrant l'existence d'effets négatifs des semis ou plants issus de l'embryogenèse somatique (Sutton et Polonenko 1999), ce qui n'exclut pas que des précautions soient prises afin de limiter les risques potentiels. Cependant, dans un contexte de débats sur les OGM, l'acceptabilité sociale est un élément non négligeable en forêt.

- *Acceptabilité économique*

Grossnickle *et al.* (1996) indiquent que l'acceptabilité des produits issus d'une nouvelle technologie comme l'embryogenèse somatique repose sur la possibilité de développer et de mettre en place une utilisation opérationnelle de cette technologie. Celle-ci passe par :

1. Le développement d'un processus de production peu coûteux (cost-effective) :
   - Pour ce faire, il faut minimiser les coûts de main d'œuvre, principal poste de coût.
   - Au lieu de développer et d'optimiser les systèmes automatiques, il faut d'abord privilégier la mise en place de procédures bien définies (protocoles).
2. L'approvisionnement en produits de haute qualité qui fournissent des performances prévisibles et régulières.
3. Une validation de la technologie et sa promotion sur le marché.

Une des voies proposées dans la volonté d'explication de la biotechnologie pour une meilleure acceptabilité a été de mettre en perspective la génétique et la biotechnologie dans l'histoire des innovations du secteur (Sedjo 1997).

B. Développement

Une dimension prégnante se retrouve dans la plupart des travaux anglo-saxons, à savoir la mise en place effective des nouvelles technologies dans la sphère économique :

1. Commercialisation :
   - Cette thématique est particulièrement importante en Colombie Britannique (Sutton et Polonenko 1999), aux USA (Paperstudies 2002), en Nouvelle-Zélande[2].
   - Elle l'est d'autant plus que les industries du bois sont dans un contexte de pression financière de plus en plus importante et que les attentes des entreprises sont fortes (Lucier *et al.* 2001).
2. Transfert de technologie :
   - Ce transfert peut s'opérer par la mise en place de partenariats entre la recherche et l'industrie. C'est par exemple le cas en Australie *via* STBA (Southern Tree Breeding Association) pour les avancées du CRC (Cooperative Research Center) dans le cadre du programme de développement durable et de plantation australien sur l'eucalyptus et le pin radiata[3].
   - Cependant, comme indiqué par Strauss et Brunner (2002), le système de licences et de droits d'enregistrement pour mettre en place des droits de propriété, combiné avec des coûts de transaction importants (avec les autorités et le grand public) découragent clairement l'intérêt et le soutien de l'industrie forestière, des petits propriétaires et certains professionnels, qui pourtant seraient nécessaires.

Le tableau 4 permet de mettre en perspective l'intérêt potentiel pour les utilisateurs industriels et les vendeurs de bois de différentes modifications génétiques obtenues par transgenèse ou par amélioration classique.

[2] **http ://www.forestresearch.cri.nz**

[3] **http ://www.forestry.crc.org.au**

Tableau 4 : Utilité perçue des modifications génétiques pour l'industrie forestière

	Utilité pour l'industrie forestière.					
Caractère modifié	**Réduction coût de plantation**	**Marketing et publicité bases sur écologie**	**Adaptabilité face au marché et à l'environnement**	**Capacité de régénération de l'espèce en plantation**	**Diminution des coûts de production de pâte**	**Créneau d'utilisation étendu (gamme de produits finis)**
Lignine		✓			✓	✓
Vitesse de croissance	✓		✓		✓	✓
Sensibilité à un Herbicide	✓	✓				
sensibilité à une maladie ou un ravageur	✓	✓	✓	✓		
Homogénéité du bois			✓		✓	✓
Stockage de carbone	✓	✓				
Stérilité		✓				
Marqueurs Non-antibiotiques		✓				

Source : Owusu, 1999.

2.3.2.3. Les analyses économiques de programmes d'amélioration forestière

Dans la littérature, la distinction entre techniques de multiplication végétative elles-mêmes et amélioration du matériel végétal n'est souvent pas explicitée, que ce soit dans les analyses coûts/bénéfices ou dans les analyses multicritères. Les principaux résultats des évaluations économiques présentées ci-après reposent essentiellement sur des essences particulières. Les données sur le pin maritime en France sont présentées plus loin.

A. Les méthodes

L'analyse économique vise à estimer les gains génétiques *via* une évaluation monétaire (Williams et de Stieguer 1990, Fins et Moore 1984).

B. Analyses coûts/bénéfices

Principes généraux

- L'analyse traditionnelle coûts/bénéfices (modèles *cash-flow*) permet d'étudier les gains génétiques en combinant, lorsque cela est possible, les différents critères d'amélioration.
- La valeur actuelle nette (VAN) est le critère de décision le plus utilisé et semble mieux adapté que les autres méthodes comme le taux interne de rentabilité[4] (Ahtikoski 2000).
- Ahtikoski (2000) compare les graines de vergers et les graines de semenciers par une technique légèrement différente : l'approche différentielle. La VAN est calculée à partir des bénéfices différentiels actualisés et des coûts différentiels actualisés sur la base de prix implicites (*shadow prices*). Ces prix implicites sont, par défaut, les prix de marché. Cette

[4]Cette méthode a été utilisée au Canada en terme d'analyse des retours potentiels sur investissement.

approche est utile lorsque l'objectif est d'évaluer les impacts de l'amélioration génétique sur l'ensemble de la société (approche en terme de surplus).

- Cette méthode d'analyse différentielle a également été utilisée par Lester et Libby (1998) au Canada, mais de façon plus limitée car il n'y a pas eu d'analyse du bilan pour la société entière. Dans cette étude, à travers une perspective générique d'analyse des coûts/bénéfices, l'impact du gain génétique est estimé par le volume (variable la plus facilement estimée) et le coût supplémentaire de l'amélioration par arbre planté.
- De façon complémentaire, il est possible d'estimer la surface en plantations nécessaire pour équilibrer les coûts et les bénéfices associés à un programme d'amélioration. Johnson *et al.* (2000) ont par exemple fait cet exercice pour un programme de sélection assistée par marqueurs (SAM).

Analyser les seuls impacts sylvicoles ?

En règle générale, l'évaluation de la valeur potentielle de la multiplication végétative vers la sylviculture opérationnelle se fait en séparant la production des plants améliorés du processus de multiplication (Sutton et Polonenko 1999). Or, dans les vergers, "quasiment toutes les analyses économiques montrent que le facteur déterminant du gain de l'amélioration des arbres est le coût réel de production des graines et semis" (Raleigh 2000).

Incorporer la recherche et développement (R&D) ?

Généralement, les coûts de R&D ne sont pas pris en compte. Cependant, des calculs réalisés dans les années 70, ont montré, pour l'épicéa, que même si l'on inclut les coûts de la recherche fondamentale, l'amélioration des arbres apparaît encore profitable (Carlisle et Teich 1978). La prise en compte de la R&D modifierait l'horizon temporel de l'analyse (Lester et Libby 1998) et non le coût marginal associé à la distribution du produit. En effet, une fois l'investissement d'innovation réalisé, il devient un coût fixe (Sedjo 2001).

Quels contextes ?

L'approche coûts/bénéfices peut viser à étudier :

- l'apport de l'amélioration forestière pour la société (Ahtikoski 2000),
- la profitabilité d'un investissement privé (Lowe *et al.* 1999, Williams et de Stieguer 1990, Apiozola *et al.* 2001),
  - pour l'opérateur
  - pour le propriétaire
  - ou pour l'industrie lorsqu'elle est verticalement intégrée[5].

Quels critères ?

Les calculs réalisés reposent généralement sur le changement d'une caractéristique (ou paramètre) toutes choses égales par ailleurs :

- diminution du temps de révolution ;
- augmentation des volumes (par ha : modèles économiques sur l'eucalyptus du CRC en particulier) ;
- proportion plus forte d'arbres "plantés récoltables".

[5]L'internalisation des gains génétiques est d'autant plus aisée que les entreprises de la filière sont intégrées verticalement.

Tableau 5 *:* Méthodes pour estimer l'effet du gain génétique

Critère	Modalité	Travaux	Commentaires
Taille	Index du site	Buford, 1987; Williams et deStieguer, 1990	Pas de modification des modèles de croissance
Volume	Les volumes sont posés constants	Fins et Moore, 1984; Talbert *et al.*, 1985	Les périodes de récolte sont inchangées. Les VAN peuvent être considérées comme étant la frontière inférieure.
Diamètre et hauteur	Avantages proportionnels constants	Fins et Moore, 1984	Il est possible de prendre en compte les différences entre les taux de croissance selon l'âge des peuplements, car les gains génétiques sont ajustés. Les modifications temporelles pour les opérations sylvicoles peuvent être prises en compte ainsi que la diminution de la révolution.

Source : Ahtikoski, 2000

D'autres effets positifs moins immédiats pourraient également être pris en compte tels que l' impact de ces plantations sur une meilleure efficacité dans l'exploitation et le process notamment.

Les attentes en terme de process sont importantes. Aux USA, l'approvisionnement de l'industrie de la pâte et du papier en bois s'est orienté vers des arbres plantés et gérés selon les techniques agricoles ce qui a permis d'augmenter de façon considérable la productivité. Toutefois, le coût de la fibre représente encore 40% du coût total de la production de papier. Les gains de productivité reposent ainsi sur les avancées des biotechnologies (Paperstudies, 2002). Certaines avancées ont été réalisées récemment (Michigan Technology University pour les feuillus ; North Carolina State University pour *Pinus taeda*). Pour estimer les gains attendus, on peut rappeler le chiffre suivant : le coût évité maximum serait de l'ordre de 20 milliards de dollars par an correspondant au montant actuellement dépensé par l'industrie de la pâte et du papier pour enlever la lignine (Mann et Plummer 2002).

C. Approches multicritères

Principes généraux

La méthode repose sur une identification des enjeux globaux. Le principe de l'analyse multicritères est de combiner plusieurs facteurs en prenant en compte l'importance particulière de chacun. L'intérêt de cette démarche est double :

- elle permet de combiner plusieurs facteurs afin d'obtenir des résultats ;
- l'importance de chaque critère étant modifiable, chaque acteur peut déterminer quels sont les paramètres les plus importants selon lui.

Cette pondération peut donner lieu à un dialogue ou un débat entre experts ou entre acteurs. Les résultats traduisent la perception de la situation par celui qui a hiérarchisé les facteurs durant l'analyse multicritères.

Approche en biotechnologie forestière

Les programmes d'amélioration génétique visent à atteindre des objectifs définis au préalable. Des techniques ont été mises au point pour estimer le poids économique de chacun des traits recherchés. Dans ce cadre, l'information économique et génétique est regroupée

dans un index de sélection. Ces travaux sont récents, en cours de mise au point et développés dans quelques pays anglo-saxons (Australie notamment[6]).

Borralho *et al.* (1993) ont par exemple montré dans le cas de l'eucalyptus, que la sélection génétique basée sur des index portant sur les volumes, la densité du bois et le rendement à la tonne de pâte, donne des gains espérés importants. Leur méthode a été reprise par Lowe *et al.* (1999) pour le pin taeda. Leurs principales conclusions sont :

- si la sélection génétique vise à maximiser la productivité de la production de pâte (kg de pâte sèche / kg de bois sec), alors la densité du bois (kg de bois sec / m^3 de bois vert) doit avoir un poids dans l'index supérieur à celui du taux de croissance (résultats pour la pâte kraft et la pâte mécanique) ;
- le poids de la densité doit, dans le cas étudié, être de 8 fois supérieur à celui du taux de croissance (ce qui signifie qu'il est possible que le critère de densité du bois seul soit suffisant si l'objectif est de minimiser les coûts de production de la pâte) ;
- ce résultat s'explique par le fait que la densité a une incidence importante sur les principaux postes de coût que sont l'exploitation, le transport et les coûts de process (coûts par m^3) alors que le taux de croissance n'affecte que les coûts de reboisement et les coûts de maintenance (coûts par ha).

Toutefois Apiozola et Greaves (2001) ont montré qu'en pratique, les agents économiques n'utilisent pas ces approches, quelle que soit leur situation :

- un propriétaire forestier ;
- une usine de pâte intégrée ;
- un secteur multi-produits et multi-acteurs (scieries, usine de pâte) verticalement intégré.

Les raisons évoquées sont :

- la mauvaise connaissance des relations entre les traits biologiques et les propriétés des produits-finis ;
- l'incertitude sur les coûts de structure et les niveaux de prix futurs ;
- le manque de bonnes estimations sur les critères de sélection et les traits recherchés ;
- la difficulté pour transformer les gains en avantages économiques pour l'industrie (ie. faible « signal de marché » entre les acteurs de l'industrie).

Quelques travaux récents ont cependant fait avancer le débat. Apiozola et Garrick (2001) par exemple, ont simulé une compagnie générique intégrée verticalement et comprenant une forêt "commerciale", une scierie et une usine de pâte selon trois régimes sylvicoles. Les caractères à l'âge de la récolte qui étaient compris dans l'objectif d'amélioration étaient le volume total (m^3/ha) et la densité moyenne du bois (kg/m^3). La valeur économique de chaque caractère a été calculée comme la différence entre le profit obtenu pour une augmentation marginale unitaire du volume ou de la densité. Ces valeurs ont été exprimées sur une base relative afin de faciliter les comparaisons entre objectifs.

[6] Les modèles élaborés en Australie visent à maximiser la valeur économique par une pondération optimale des différents traits comme la croissance et la densité.

2.3.2.4. Les résultats (gains réalisés)

A.Les épicéas (*Picea* sp.)

- Essence pour laquelle les techniques sont les plus matures.
- Le SCF (Service canadien des forêts), considéré comme l'un des chefs de file de l'embryogenèse somatique, fournit les indications suivantes sur les gains génétiques estimés de l'amélioration classique de l'épicéa épinette blanche (*Picea glauca*):
  - arbres âgés de 15 ans : hauteur plus importante de l'ordre de 15 % à 25 %[7] ;
  - arbres améliorés de 45 ans : le volume peut être de 50 % supérieur à celui des arbres régénérés naturellement.
- Le programme d'amélioration de l'épinette blanche table sur une plus grande résistance aux attaques d'insectes.

Embryogenèse somatique (Grossnickle *et al.* 1996) *:*

- Silvagen Inc., BCRI, est passé d'une production initiale en 1993 de 12 000 plants à 350 000 en 1996 et ensuite plus d'un million par an (voir chapitre 1.2: État d'avancement des travaux de pré-développement et de développement). La phase opérationnelle de l'embryogenèse somatique de l'épinette blanche a ainsi débuté depuis quelques années.
- Le taux de survie des plants après une saison de croissance est en moyenne de 95% et de 88% après deux saisons. Ces taux montrent que les performances de l'embryogenèse somatique sont satisfaisantes pour les programme de reboisement.

B. Pin radiata

L'utilisation de plants génétiquement améliorés permet de réduire la densité de plants de 1 000-1 200 plants à l'hectare à 600-800, et d'avoir, malgré tout, un gain en volume de 20% à la récolte (Sutton et Polonenko 1999). A partir de quelques essais et par extrapolation, Carson *et al.* (1999) ont modifié le modèle de croissance du pin radiata afin de prendre en compte "les multiplicateurs de gain génétique".

C. Eucalyptus

Le programme d'amélioration de *E. globulus* au Portugal a permis d'atteindre des gains génétiques de 20 à 40 % en terme de volume supplémentaire et de densité du bois (Arbe, 2000).

D. Peuplier

Les recherches sur la "domestication" du peuplier portent sur les rendements (m^3/ha, morphologie, qualité de la fibre, ..), sur la structuration des propriétés du bois pour des utilisations spécifiques, la définition de nouveaux produits et sur les fonctions écologiques (Bradshaw, 2000).

E. Teck

[7] Gain espéré de 22% de hauteur (Grossnickle, 1996). Percy, *et al.* (2000) rappellent par ailleurs qu'un programme pluriannuel a été mis sur pied afin de développer un système d'embryogenèse somatique pour la multiplication clonale du pin argenté (*Pinus monticola* Dougl.).

Différents programmes ont permis une réduction de la rotation de 60-100 ans à 40-50 ans, voir 20-30 ans dans les nouvelles plantations au Costa Rica et au Brésil (pour des bois de faible diamètre) avec un gain en volume de 10% (Kjaer et Foster, 2000).

F. Résultats économiques généraux

Estimation pour l'embryogenèse somatique

Sutton et Polonenko (1999) évaluent l'augmentation de 20% (hypothèse de calcul) du volume récolté par amélioration génétique en posant que les autres coûts opérationnels sont identiques aux conditions habituelles de plantation. La valeur estimée est la valeur de l'amélioration génétique actualisée à l'année 0.

- Ces auteurs remarquent que l'effet de la diminution de la rotation est plus grande qu'une seule augmentation du volume avec des méthodes traditionnelles.
- Dans la deuxième moitié des années 90, de grands espoirs reposaient sur l'automatisation. Finalement, les principales réductions sont venues de protocoles plus précis sur les opérations d'embryogenèse somatique (gains substantiels qui ont permis de réduire le prix de vente de 25 à 30% et de rendre compétitif ce produit comparativement aux boutures).

Autres résultats

- Le gain espéré de la sélection en verger pour une plus forte densité du bois pour les usines de pâtes est évalué, en première estimation, à 3,3% (Paperstudies 2002).
- Une réduction de 20% d'input bois par tonne de pâte produite serait possible en utilisant des essences clones sélectionnées dans des programmes de plantations (Macrea *et al*. 1999 cité dans Clark 2000).
- Les gains (m^3/ha/an) dus aux provenances et peuplements à graines (~ 20 %), aux vergers à graines d'arbres plus (~ 5 %) ou à graines d'arbres d'élite (~ 20 %), aux variétés clonales ou multi-clonales (~10-20 %) sont cumulatifs dans la mesure où les matériels d'une phase sont sélectionnés à partir du matériel de la phase précédente. Au total sur une première génération, pour un programme d'amélioration complet, le gain réalisable s'élèverait en moyenne de 45 % à 60 % en production totale (Nanson 2000). Les gains en qualité, en résistance et en adaptation ne sont pas pris en compte dans ces estimations.

2.3.3. Etude développée pour le pin maritime

2.3.3.1. Evaluations coûts/bénéfices pour le pin maritime

Le processus de l'embryogenèse somatique est quasiment identique dans tous les laboratoires. La recherche actuelle poursuit deux objectifs principaux (Sutton et Polonenko, 1999) :

- le développement de process aux résultats plus réguliers ;
- la diminution des coûts unitaires de production.

Ces deux objectifs se retrouvent dans les modalités de calcul des coûts réalisés pour l'embryogenèse somatique du pin maritime *via* :

- des taux de réussite par opérations entrant dans le processus ;
- la prise en compte des coûts par étapes de production.

2.3.3.2.Les schémas de production de MFR étudiés

La méthode repose sur une comparaison des méthodes traditionnelles de multiplication et de l'embryogenèse somatique pour le pin maritime. Quatre techniques sont disponibles pour produire un plant (semis) que pourra utiliser un propriétaire :

1. plant (semis) issu d'un verger classique ;
2. plant (semis) issu d'un verger avec pollinisation contrôlée ;
3. plant (semis) issu d'une multiplication végétative par croisements performants (bouturage) ;
4. plant (semis) issu de l'embryogenèse somatique.

2.3.3.3.Les caractéristiques des schémas de production de MFR

- Verger classique : durée du verger: 20 ans, production de 10 à 20 ans
- Verger avec pollinisation contrôlée : durée : 10 ans, production de 5 à 10 ans
- Multiplication végétative de croisements performants
- Embryogenèse somatique : les coûts de production n'incorporent que les coûts de main d'œuvre pour deux raisons : 1) des études internes AFOCEL sur l'épicéa montrent que la main d'œuvre représente 90% du coût du plant ; 2) il est difficile d'isoler les autres coûts (frais d'infrastructure, etc.). On peut estimer que les coûts pourront diminuer avec la mise en place de nouveaux systèmes de production robotisés à l'exemple de ForBio, entreprise australienne de production de plants améliorés (Owusu 1999).

2.3.4. Méthode

2.3.4.1. Les principes généraux

- Les calculs réalisés reposent sur l'hypothèse d'un changement technologique qui est neutre au temps, c'est-à-dire que ce changement implique une augmentation proportionnellement uniforme du volume de bois récolté pour toutes les classes d'âges (certains travaux ont levé cette hypothèse en rendant les changements dépendants du temps, notamment, Wagner et Holmes 1999).
- L'extrapolation est utilisée étant donné que les résultats des améliorations génétiques sont obtenus sur des populations juvéniles ou après mi-rotation (Alazard 2001). Ceci permet de travailler sur l'horizon d'une rotation.
- L'âge de la récolte n'est fondé que sur des recommandations sylvicoles et sur les pratiques réelles.
- Les calculs reposent sur des valeurs moyennes (ex : 5 boutures par pied-mère ou 30 plants d'un clone par embryogenèse somatique).
- L'évaluation du gain génétique repose sur deux dimensions :
  - *le volume* : le gain génétique se traduit par un accroissement des volumes supposé linéaire le long de l'itinéraire sylvicole : le même pourcentage d'accroissement est imputé aux volumes récoltés lors des éclaircies et à la coupe finale.
  - *la qualité* : le gain génétique se traduit par l'amélioration de caractéristiques qui ont un intérêt économique (rectitude, branchaison, etc.). On suppose que le gain en qualité s'exprime par un prix d'achat plus important pour le bois d'industrie (éclaircies) et le bois d'œuvre (coupe rase).

L'impact réel des changements liés à une augmentation du volume produit et des modifications de la qualité du bois est très difficile voire impossible à cerner actuellement faute d'études spécifiques suffisantes et à cause de la complexité du problème.

De plus, les critères de sélection et de fixation de la valeur du bois peuvent fluctuer fortement dans le temps et dans l'espace.
Nous avons donc combiné ces deux dimensions (qualité et quantité) par le biais d'un raisonnement sur le gain génétique exprimé en variation de la valeur actualisée nette produite par unité de surface (répartie uniformément au cours du temps et sur les différentes "récoltes", coupes ou éclaircies).

2.3.4.2. Les données

- A chacun des schémas correspondent des opérations spécifiques avec des coûts associés. Les données sont tirées de Alazard (1992) et Cotten (1997) et de données internes AFOCEL pour l'embryogenèse somatique de l'épicéa (AFOCEL 1999, projet EU-FAIR1 CT95-0873, Developing somatic embryogenesis as a tool for spruce tree improvement). Ces données ont été ajustées aux niveaux pratiqués actuellement (information AFOCEL SO).
- Les prix du bois sur pied utilisés sont supposés être ceux du marché, ce qui induit que ne sont pas prises directement en compte les éventuelles imperfections du marché (en particulier le nombre réduit d'agents). Ces prix se basent sur des données particulières (prix des producteurs/vendeurs).

2.3.4.3. Les étapes

Plusieurs étapes permettent de comparer les différentes options de sorties variétales pour semis direct ou plantation. On peut réaliser :

- un comparatif des coûts unitaires de production (graine/plants) ;
- un comparatif des gains (par arbre) : volume, qualité du bois, des fibres, durée de la révolution (volet non abordé ici);
- un comparatif coûts/bénéfices en tendant compte des opérations sylvicoles et d'exploitation.

2.3.4.4. Les hypothèses

On suppose que les surfaces plantées ou ensemencées avec du matériel amélioré l'auraient été, autrement, avec du matériel non-amélioré (cette hypothèse exclut la possibilité que la subvention incite à planter dans de mauvais sols).

A. Techniques horticoles

Tableau 6 : Identification des opérations de production en pépinière (d'après Alazard, 1992).

	Verger classique	Verger avec pollinisation contrôlée	Multiplication végétative de croisements performants (bouturage)
Frais d'implantation	✓	✓	
Frais d'entretien : – production de graine – coûts de gestion	✓	✓	
Frais de pollinisation contrôlée		✓	✓
Frais de récolte et d'ouverture	✓	✓	✓
Surcoût production pied-mère			✓
Surcoût bouturage			✓
Total autres coûts pour plant sortie pépinière	✓	✓	✓

Les calculs reposent sur :

- une production de 40 kg de graines par hectare et par an en verger à graines de clones entre 10 et 25 ans après la plantation;
- un taux de germination de 90 %.
- un coefficient de 5 boutures produites par pied mère a été utilisé.

B. Embryogenèse somatique

Les deux niveaux d'utilisation de l'embryogenèse somatique examinés sont :

- *la multiplication de matériel pour la sélection (amélioration)* : il s'agit de produire quelques individus par clones qui seront mis en tests clonaux à l'issue desquels les meilleurs clones seront sortis de cryoconservation et multipliés à petite échelle pour être incorporés à un nouveau cycle d'amélioration ou une production de graines, boutures ou embryons : les opérations nécessaires pour produire un clone vont de l'étape d'initiation à celle de la plantation en test clonal ; les temps nécessaires en main d'œuvre sont importants et le nombre de plants produits est faible.

- *embryogenèse somatique en production* : il s'agit de l'hypothèse de plantations commerciales réalisées à partir de plants issus d'embryons somatiques: les opérations nécessaires pour produire un clone sont moins nombreuses que pour l'approche "amélioration" (de la maturation à la plantation) ; on suppose que le stock de matériel à multiplier existe déjà (ressortie de cryoconservation de clones déjà testés sur le terrain) ; le besoin en main d'œuvre est donc moindre. Le nombre de clones produits est plus important que pour l'utilisation comme outil d'amélioration.

Tableau 7 : Durée totale du processus de production des plants et années de sortie pour les options embryogenèse somatique

Embryogenèse somatique	Durée totale	Première année de production*
Option amélioration	4 années	production à partir de la 4ème année
Option production	3 années	production à partir de la 3ème année

* = début de la période en année 0.

Les coûts pris en compte sont différents selon les options (Tableau 8).

Tableau 8 : Identification des opérations pour les deux options d'embryogenèse somatique

	Embryogenèse somatique - Amélioration	Embryogenèse somatique - Production
Initiation	✓	
Stabilisation	✓	
Mise en Cryoconservation	✓	
Multiplication (y compris réactivation de cryo)	✓	✓
Maturation	✓	✓
Conversion	✓	✓
Plantules (dont acclimatation, élevage)	✓	✓
Plantation	✓	✓

Pour caractériser les améliorations prévisibles en embryogenèse somatique, trois scénarios sont étudiés pour les deux options :

- le scénario "pessimiste" (P) correspondant à des rendements *in vitro* actuels;
- le scénario "moyen" (M) correspondant à des rendements *in vitro* intermédiaires;
- le scénario "optimiste" (O) correspondant à des rendements *in vitro* identiques à ceux obtenus en épicéa.

C. Les options étudiées

Les différentes méthodes présentées sont comparées à la méthode "de base" correspondant à un semis de graines non-améliorées dont le prix au kilogramme sera fixé en année 0 (année de plantation). Les cas considérés se retrouvent dans le tableau 9.

Tableau 9 : Les modalités de plantation envisagées

	Embryogenèse Somatique		Verger			Graines non-améliorées
	Production	Amélioration	Pollinisation contrôlée	Multiplication végétative croisement performant	Classique	
Semis						Cas 1
Plants	**Cas 5**	**Cas 6**	Cas 4	Cas 3	Cas 2	

Il faut compter les scénarios (P), (M) et (O) pour les cas 5 et 6, ce qui donne :

- **10 modalités de plantation** étudiées pour comparer le bénéfice actualisé net (bénéfice calculé en prenant en compte les intérêts que pourraient produire les sommes d'argent correspondant aux frais engagés et aux recettes) pour un propriétaire qui plante ou sème un hectare de pin maritime en année 0 ;
- **à travers deux variantes :**

– *variante 1* : le temps nécessaire à "faire" les plants ou les semis n'est pas pris en compte ;

– *variante 2* : le temps nécessaire à "faire" les plants ou les semis est pris en compte. Dans ce cas, les coûts de production des plants sont actualisés en année 0, date de plantation. Cette deuxième modalité permet de comparer les durées *des techniques de sorties variétales*.

D. Valeurs de gain génétique

Selon Chaperon (1986), le gain en volume peut atteindre 50 % et le gain en rectitude 70 % pour des boutures en bulk (de familles sélectionnées) tandis que des boutures de clones sélectionnés permettraient un gain de 90 % en volume et 80 % en rectitude avec une forte homogénéité et une très bonne branchaison. Nous avons donc considéré des gains en valeurs du bois produit par hectare de 0 à 40 % pour les matériels améliorés "classiques" (verger à graines open et croisements contrôlés) seuls ou en mélange et des valeurs jusqu'à 100 % pour du matériel issu de multiplication végétative (embryons somatiques, boutures).

Les estimations disponibles pour les vergers à graines de première et seconde génération ont été calculées sur base d'observations réalisées en cours de rotation. Elles restent à valider en fin de rotation.

E. Caractéristiques des itinéraires sylvicoles

Deux itinéraires sont pris en compte :

- *Semis* : semis (graines non-améliorées) en lignes espacées de 4m ; 2,5 kg de semis par hectare ; deux dépressages à 3 et 5 ans ; 5 éclaircies en année 13, 18, 24, 31 et 39 ; coupe rase à 47 ans. Cette date de coupe correspond en moyenne à ce qui est pratiqué dans le massif landais.
- *Plantations* : 1 666 tiges par hectare en 4m x 1,5m ; 4 éclaircies en années 16, 20, 27, 33 et coupe rase à 45 ans. Cet itinéraire est standard. Il correspond à 90% des plantations faites actuellement en Aquitaine.

F. Caractéristiques des horizons temporels des modalités étudiées

Tableau 10 : Le temps de production des semis/plants/clones n'entre pas dans l'horizon temporel : modalité 1

Années	0	1		45	46	47
	Reboisement			Coupe rase		
Graines non améliorées	Semis					✓
Verger pollinisation contrôlée	Plants			✓		
Multiplication végétative croisements performants	Plants			✓		
Verger à graines classique	Plants			✓		
ES* amélioration	Plants			✓		
ES* production	Plants			✓		

* = embryogenèse somatique.

Tableau 11 : Le temps de production des semis/plants/clones entre dans l'horizon temporel (l'année 0 reste l'année du reboisement pour chaque option) : modalité 2

Années	-11		-6	-5	-4	-3	-2	-1	Reboisement 0	Coupe rase 45	46	47	**Durée totale**
Graines non améliorées									Semis			✓	**49**
Verger à graines classique									Plants	✓			**57**
Multiplication végétative									Plants	✓			**51**
Verger pollinisation contrôlée									Plants	✓			**52**
ES production									Plants	✓			**48**
ES amélioration									Plants	✓			**49**

2.3.5. Résultats et limites de la méthode

Les résultats sont conditionnés par les différentes variables (paramètres). Celles-ci se décomposent en :

- Variables majeures : le gain génétique en volume et le gain génétique en qualité ;
- Autres variables (taux d'actualisation ; taux de marge ; prix sur le marché du bois ; prix de la main d'œuvre, etc).

Un ensemble de feuilles de calcul et macro-commandes Excel a été construit afin de permettre de recalculer facilement les valeurs recherchées pour chaque nouvelle combinaison de valeurs des différents paramètres. Cet outil pourra servir de bases à de futures études concernant ou non l'embryogenèse somatique (comparaison de la rentabilité de différents itinéraires sylvicoles…).

Tableau 12 : Valeurs utilisées pour le calcul des recettes selon l'itinéraire sylvicole classique (d'après Cotten, 1997). BI : bois d'industrie; BO: bois d'œuvre. Une proportion de la production en coupe rase de 15% de BI / 85% BO a été prise en compte.

	Prix		
Semis	FF/m^3	Volume	m^3/ha
BI 1ère éclaircie	54	Eclaircie 1	27
BI 2ème éclaircie	71	Eclaircie 2	31.5
BI 3ème éclaircie	101	Eclaircie 3	46
BI 4ème éclaircie	131	Eclaircie 4	63
BI 5ème éclaircie	168	Eclaircie 5	63
BI Coupe rase	168	Coupe rase	253
BO coupe rase	200	Total:	483.5

Plantations	FF/m^3	Volume	m^3/ha
BI 1ère éclaircie	58	Eclaircie 1	47
BI 2ème éclaircie	79	Eclaircie 2	57.5
BI 3ème éclaircie	109	Eclaircie 3	78.5
BI 4ème éclaircie	138	Eclaircie 4	56.5
BI Coupe rase	138	Coupe rase	402
BO coupe rase	200	Total	641.5

Tableau 13: Volumes utilisés pour le calcul des recettes des itinéraires sylvicoles les plus intensifs (valeurs tirées d'un modèle de croissance à l'échelle du peuplement construit par M Najar, AFOCEL)

Volume (m3/ha)	3 éclaircies	2 éclaircies
Eclaircie 1	40	43
Eclaircie 2	50	63
Eclaircie 3	60	0
Coupe rase	150	308
Total	300	414

2.3.5.1. Prix des plants en sortie de pépinière

Pour un taux d'actualisation de 4 %, les résultats sont les suivants :

Tableau 14 : Estimations des prix de vente des plants produits selon différentes voies de multiplication

en EUROS		**Embryogenèse Somatique**		**Verger**		
Coût du plant		Production	Avec bouturage	Pollinisation contrôlée	Multiplication végétative croisement performant	Classique
Non-actualisé	Moyen					
	Optimiste					
Actualisé	Moyen					
	Optimiste					

Surcoût (base: plant de verger à graines Classique)

Non-actualisé	Moyen				
	Optimiste				
Actualisé	Moyen				
	Optimiste				

en FF		**Embryogenèse Somatique**		**Verger**		
Coût du plant		Production	Avec bouturage	Pollinisation contrôlée	Multiplication végétative croisement performant	Classique
Non-actualisé	Moyen	41,85	3,80	1,38	1,77	1,12
	Optimiste	21,58	2,82			
Actualisé	Moyen	41,72	3,61			
	Optimiste	21,58	2,62			

Surcoût (base: plant de verger à graines Classique)

Non-actualisé	Moyen	40,73	2,69		
	Optimiste	20,47	1,71		
Actualisé	Moyen	41,13	3,02	0,39	0,92
	Optimiste	20,93	1,97		

2.3.5.2. Rentabilité des plantations

Les valeurs de bénéfice actualisés net par hectare selon le gain génétique (en valeur du bois produit), la voie de propagation et le schéma sylvicole utilisés ont été calculées (en euros et en FF). Le graphique construit avec les valeurs non actualisées est quasi-identique (non présenté). Les valeurs seuils des prix du MFR annulant ces bénéfices en ont été déduites (tableau 15)

Dans le cadre des hypothèses examinées pour nos calculs, l'embryogenèse somatique utilisée autrement qu'en combinaison avec le bouturage des embryons présente toujours un bilan financier négatif excepté dans le cas de gains génétiques très importants (+40% de valeur produite par ha avec une gestion sylvicole intensive soit une rotation de 30 ans avec 2

éclaircies, par rapport à du matériel non amélioré cultivé avec une sylviculture traditionnelle soit une durée de rotation de 45 ans avec 4 éclaircies). L'amélioration du rendement *in vitro* (production d'un nombre supérieur d'embryons à coût de main d'œuvre constant) n'améliore la rentabilité de façon notable que pour les situations où l'embryogenèse somatique est utilisée seule.
Néanmoins, la plantation de boutures d'embryons somatiques (gain +40%) conduite selon un schéma sylvicole optimisé à 2 éclaircies permet une rentabilité deux à trois fois supérieure à celle d'un matériel végétal classique (effet de multiplication végétative *in vitro* + bouturage). Pour un gain génétique raisonnablement plus élevé (Chaperon, 1986 envisage des gains énormes pour la multiplication végétative: jusqu'à 90% en volume avec +70% en rectitude ET une branchaison améliorée), le gain atteint un facteur quatre.

L'utilisation de boutures d'embryons dans un schéma sylvicole classique devient compétitive avec les solutions classiques à partir d'un différentiel de gain génétique de 10% (ex.: gain de 30% pour du semis amélioré et 40% pour les boutures d'embryons). Dans la situation actuelle, 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 l'industriel. Cette prime pourrait l'amener à privilégier ce type d'approvisionnement et, en retour, à l'encourager financièrement. Cela commence à être le cas pour l'eucalyptus Français dont la disponibilité trop faible oblige à importer du bois des tropiques à un prix très supérieur, ce qui justifie une démarche d'encouragement de nouvelles plantations par une subvention de l'industriel aux planteurs via une participation à la mise à disposition de plants à prix réduit.

Remarquons par ailleurs que l'embryogenèse somatique (seule ou couplée au bouturage) permet une diffusion plus rapide de 3 à 8 ans par rapport aux techniques traditionnelles (vergers ou bouturage).Elle permet de plus un gain de temps de quelques années également dans la mise en place des tests clonaux permettant de déterminer le matériel à diffuser aux reboiseurs.

Le bouturage lisse fortement l'effet du rendement *in vitro* (variantes "moyenne" et "optimiste" de chaque situation) au point de le rendre peu significatif.

Une production par une structure adaptée devrait permettre de réduire le prix de revient des plants en sortie de laboratoire d'un facteur deux, rendant compétitives les options de bouturage d'embryons quel que soit le schéma sylvicole et l'option de plantation en mélange d'embryons (non bouturés) avec des semis améliorés ou non pour un schéma sylvicole optimisé.

La comparaison des tableaux 14 et 15 montre que sur le plan théorique, l'utilisation de matériel produits par embryogenèse somatique est justifiable économiquement pour un niveau de performance élevé.

Tableau 15 : Valeur limite de prix des plants annulant le bénéfice actualisé net pour l'itinéraire classique (4 éclaircies) et pour l'itinéraire de culture le plus rentable avec du matériel amélioré (2 éclaircies)

	Prix maximum du plant (annulant le bénéfice)			
	€		FF	
Itinéraire Sylvicole	classique (IS2)	2 éclaircies	classique (IS2)	2 éclaircies
Densité (plants/ha)	1666	1000	1666	1000
Gain en valeur produite/ha				
0%	0.51	1.43	3.34	9.41
10%	0.70	1.78	4.57	11.65
20%	0.88	2.12	5.79	13.90
30%	1.07	2.46	7.02	16.14
40%	1.26	2.80	8.24	18.38
50%	1.44	3.14	9.47	20.62
60%	1.63	3.49	10.69	22.87
70%	1.82	3.83	11.92	25.11
80%	2.00	4.17	13.14	27.35
90%	2.19	4.51	14.37	29.60
100%	2.38	4.85	15.59	31.84

3 - Bilan des programmes d'embryogenèse somatique à l'AFOCEL et à l'INRA

Chaque organisme présentera les espèces travaillées (justification), les résultats obtenus et les perspectives.

3.1. Programmes développés à l'AFOCEL

Alors que plusieurs dizaines d'espèces ont été concernées par ses travaux en micropropagation, l'AFOCEL n'a travaillé intensivement en embryogenèse somatique que sur deux espèces: l'épicéa (1985-1998) et le pin maritime (depuis 1986).

Quelques travaux ont également été effectués sur le *Sequoia sempervirens* et l'*Eucalyptus gunnii* (Bourgkard et Favre, 1989; Boulay, 1987) mais le faible intérêt pour le déploiement et l'amélioration de ces espèces au niveau national ne justifiait pas le maintien d'un effort de recherche en la matière. Par la suite, l'épicéa a été travaillé intensivement puis, victime à son tour d'un désintérêt pour son programme d'amélioration génétique, il a été progressivement relégué au rang d'espèce modèle. L'AFOCEL considère que la technique de culture des embryons sur milieu solide est maîtrisée chez l'épicéa mais la validation définitive ne pourra toutefois intervenir qu'à l'échéance des premiers tests de démonstrations sur le terrain (dans environ 15 ans). Seule la culture des embryons en milieu liquide, qui devrait permettre de diminuer fortement le coût de production, doit encore faire l'objet d'importantes mises au point.

La situation est en revanche complètement différente pour le pin maritime pour lequel seules les premières étapes (initiation – stabilisation – multiplication et cryoconservation des masses embryonnaires) sont actuellement franchies en routine. La régénération de plantes à partir des masses embryonnaires en multiplication est en effet encore trop sporadique. Les résultats de nos recherches ont été synthétisés sous forme de fiches techniques de production (épicéa) ou de culture (pin maritime) reprenant tous les détails techniques et les recommandations nécessaires (documents internes)..

L'AFOCEL consacre actuellement l'équivalent de 0.1 équivalent temps plein à la recherche sur l'embryogenèse somatique (*sensu largo*) de l'épicéa contre 8 pour le pin maritime.

Références citées

Boulay M (1987) Recherches préliminaires sur l'embryogenèse somatique d'*Eucalyptus gunnii*. Annales de Recherches Sylvicoles 1986, pp 23-37.

Bourgkard F et Favre JM (1989) L'embryogenèse somatique chez *Sequoia sempervirens*. Annales de Recherches Sylvicoles 1988, pp 83-95.

Bourgkard F et Favre JM (1992). Essai d'induction de l'embryogenèse somatique chez Sequoia sempervirens. Complément des Annales de Recherches Sylvicoles 1991, Biotechnologies appliquées aux arbres forestiers, pp. 25-46.

3.1.1. Epicéa

Le schéma général du procédé utilisé à l'AFOCEL et ses performances sont présentés à la figure 1. Alors que l'explant standard est la graine immature, nous utilisons en routine la graine mature après germination (en fait l'embryon zygotique extrait de cette graine) comme point de départ à l'**initiation** de nouvelles cultures embryonnaires. Ceci nous permet d'utiliser les lots de graines commerciaux ou autres lots conservés à long terme. Nous pouvons également ainsi maintenir en vie le semis utilisé et comparer par la suite les plants issus d'embryons

somatiques à leur "ortet". Le taux moyen d'initiation est alors de 20% (taux stabilisé, la formation transitoire d'embryons somatiques sur les explants n'est pas considérée.

Tous les clones produits peuvent être **cryoconservés** sans difficulté particulière. Les plus vieilles cultures testées à ce jour ont pu être réactivées après 8 ans de congélation dans l'azote liquide.

La **multiplication** des masses embryonnaires ne pose pas de problème en milieu solide. En revanche, la culture en milieu liquide, qui permet d'atteindre des taux de multiplication 2 à 5 fois plus importants, n'est pas tolérée par certains clones (30 à 50 %) qui arrêtent de pousser, dégénèrent ou meurent en quelques semaines (Figure 5). Exigeante en quantité et en qualité de la main d'œuvre (sensibilité exacerbée au suivi sanitaire), elle ne se justifie que pour certains clones pour lesquels on désire une production de matériel végétal à plus grande échelle. Encore faut-il que ces clones soient parmi ceux qui tolèrent bien la culture liquide.

Les étapes de maturation, de germination puis de conversion des embryons en plantes somatiques sont bien maîtrisées pour les clones réceptifs. L'étape de **maturation** est la plus coûteuse en consommables tandis que la mise en **germination** est particulièrement gourmande en main d'œuvre. En moyenne, seuls 40 % des clones initiés répondent suffisamment bien au traitement de maturation pour permettre une production régulière de plants de qualité. Le potentiel réel de maturation de chaque lignée embryonnaire doit nécessairement être évalué au cours d'une période suffisamment longue (au minimum 5 maturations réparties sur 6 mois) qui permet de prendre en compte les variations d'origine expérimentale (répétition) ou physiologique (variation du potentiel des lignées au cours du temps). Pour ce faire, nous procédons par deux méthodes différentes qui donnent des résultats assez contrastés en termes de rendements de maturation.

La première méthode consiste à faire maturer les embryons somatiques à partir d'amas de masses embryonnaires (" cals ") déposées à la surface du milieu de maturation. Cette méthode fonctionne bien pour le plus large éventail de clones mais ses performances maximales sont nettement plus réduites que celles de la maturation réalisée à partir de suspensions de masses embryonnaires étalées en couche fine à la surface du milieu de culture.

Cette seconde méthode est en revanche applicable à un nombre plus restreint de clones. **L'exemple ci-dessous illustre bien les performances du système qui a été développé pour l'épicéa**. Il s'agit d'un essai qui a eu lieu immédiatement avant la mise " en sommeil " de l'épicéa à l'AFOCEL. L'objectif était de tester les performances du protocole standard en y consacrant un effort minimum. 175 graines issues d'un lot commercial (Vilmorin) récolté en 1991 a été utilisé pour une campagne d'initiation réalisée en 1998. Un total de 35 nouveaux clones stabilisés en a été obtenu, soit 21% (8 graines perdues). La capacité de maturation de ces 35 clones a été testée, mettant en évidence une dizaine de clones intéressants atteignant les 50 embryons cotylédonnaires morphologiquement normaux par gramme de matière fraîche mise en maturation. Les embryons récoltés ont été mis en germination et les plants obtenus ont été transférés en serre. Le taux de survie moyen (résultant de la mortalité directe ainsi que de l'élimination par l'opérateur de plants jugés non conformes au standard morphologique de plants évoluant favorablement) n'a été en moyenne que légèrement supérieur à 50 % (de 35 à 100% selon le clone). Ce chiffre est relativement bas comparé au taux de survie moyen observé pour des échelles de production normalisées (70-85%).

Cela est en partie la conséquence de difficultés de gestion des opérations liées au déséquilibre des effectifs et à un rythme irrégulier (entre clones) de croissance *in vitro* des plants. Au total (sur 35), les 10 clones les plus performants en maturation représentent plus

des deux tiers des plants qui ont survécu à l'acclimatation. 20 clones ont produit au moins 50 plantes correctes aptes à pousser en pleine terre en pépinière.

Plantation

Nous avons réalisé des plantations d'essai en forêt sur 4 sites. Nos plants les plus âgés sont installés sur le terrain de notre pépinière expérimentale (cinquième site). Ils ont maintenant 9 ans et présentent une morphologie comparable à celle des semis témoins. Par contre, l'homogénéité clonale se manifeste bien. En particulier, les plantes issues d'embryons somatiques débourrent de manière très synchrone au contraire des semis. Si un retard de croissance initial important est constaté par rapport à des semis témoins, ce retard est progressivement résorbé au fil des années (Figures 6, 7), ce qui est conforme aux résultats rapportés dans la littérature (Grossnickle et Major, 1994 a et b, Grossnickle *et al.,*1994).

Enfin, nous avons pu démontrer à l'aide de marqueurs moléculaires (RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA) que l'utilisation de l'embryogenèse somatique n'entraîne pas de biais génétiques (Passerieux *et al .,* 1998). Un taux d'initiation de seulement 20 % apparaît en effet suffisant pour maintenir la diversité génétique initiale du lot de graines utilisé (maintien des allèles dont la fréquence dépasse 5 %).

Nous avons par ailleurs mis au point sur l'épicéa un système de culture permettant l'initiation de masses embryonnaires à partir d'individus d'âge croissant (jusqu'à 22 ans). **Ce système très original a été breveté et a fait l'objet de contrats privés confidentiels**. C'est dans ce cadre que nous avons également mis en place une procédure routinière d'identification et de certification de l'origine du matériel végétal produit (traçabilité génétique) qui est basée sur l'utilisation de microsatellites nucléaires (exemple Figure 8).

Des résultats partiels concernant la multiplication conforme de plantes somatiques à partir d'individus âgés de 3 ans ont été récemment publiés (Harvengt *et al*., 2001).

A noter en matière de publication/valorisation: la publication d'articles par d'autres équipes de résultats obtenus exclusivement sur notre clone modèle 541 (parfois dénommé AFO541: Svobodova *et al*., 1999; Kondarova *et al*., 2002).

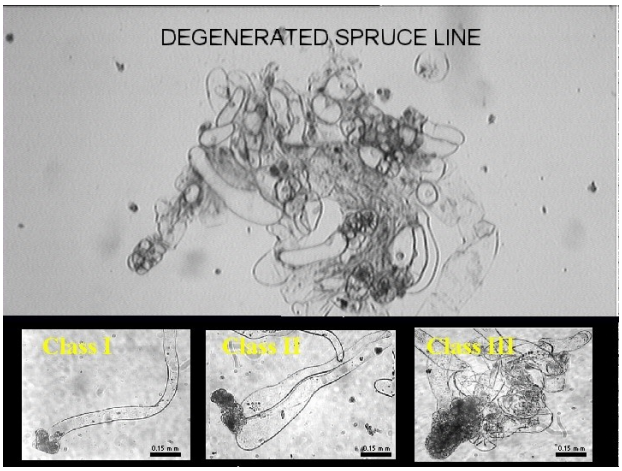


Figure 5 :
Certains clones d'embryons somatiques d'épicéa ne supportent pas le passage en milieu liquide. Quelques autres (dont le clone 611 illustré ici, grande photo centrale) subissent une modification de leur morphologie et perdent leur capacité de régénération (maturation) malgré un taux de multiplication très élevé et très régulier. Ce comportement très variable des clones en milieux liquide et la nécessité de trier manuellement le matériel végétal pour en éliminer les parties nécrotiques (têtes d'embryons tendant à produire du cal non embryogène envahissant complètement les cultures) n'a pas permis l'automatisation de la culture dans nos conditions. Les 3 photographie du bas montrent les morphologies de référence d'embryons se développant correctement.

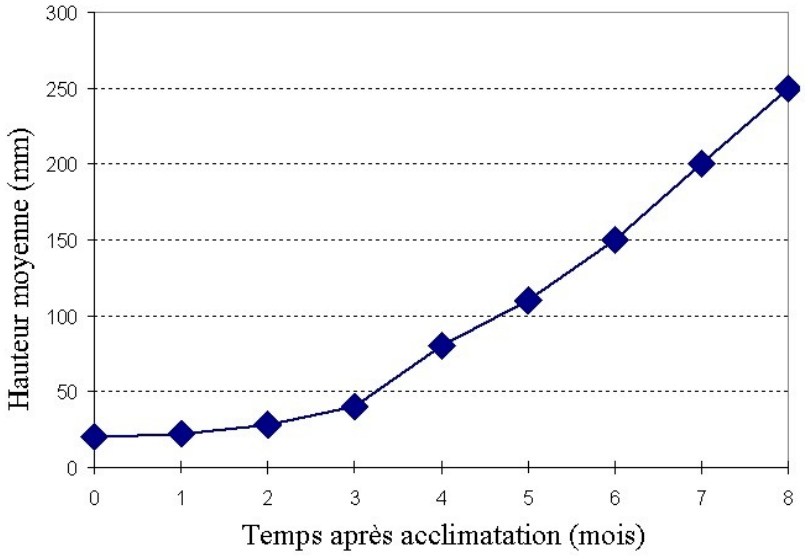


Figure 6 : Croissance moyenne en serre des plantes régénérées à partir d'embryons somatiques du clone 541. Le temps zéro correspond au transfert du laboratoire vers la serre (acclimatation réalisée en novembre). Le stress subit explique la faible croissance des premiers mois.

Figure 7 : Aspect d'une plantation expérimentale d'embryons somatiques d'épicéa en comparaison avec des semis après 8 saisons de végétation (site expérimental de l'Etançon, Nangis, Seine-et-Marne ; cette station est très défavorable car elle présente un sol calcaire et hydromorphe). La croissance d'un semis témoin (à gauche) peut être comparée à celle d'un plant issu d'embryon somatique (à droite, clone 10, essai 99192).

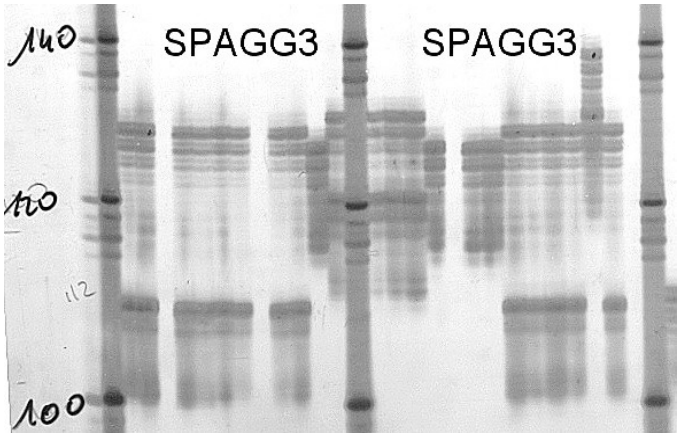


Figure 8 :
Empreintes génétiques (microsatellites nucléaires) d'embryons somatiques d'épicéa permettant de vérifier la conformité génétique et l'absence de mélange ou erreur d'étiquetage.

3.1.2. Le pin maritime

Cette espèce présente l'avantage de faire l'objet d'un programme d'amélioration génétique bien actif au niveau national tout en présentant un intérêt réel à l'étranger (autres pays méditerranéens comme l'Espagne, le Portugal et l'Italie et développement notable en Australie). Les recherches relatives au développement des biotechnologies (culture *in vitro* et biologie moléculaire) pour une intégration future dans le schéma d'amélioration du pin maritime sont donc particulièrement actives. En particulier, l'embryogenèse somatique constitue la voie la plus prometteuse en matière de multiplication végétative de cette espèce.

L'initiation de clones à partir de graines immatures (Figure 9) est maîtrisée. Une de nos particularités en la matière est de séparer les embryons zygotiques (utilisés pour l'initiation) de l'endosperme de la graine qui les contient. Ceci nous permet de nous assurer du stade de développement de chaque explant ainsi que de son état sanitaire. En effet, la présence de champignons et/ou bactéries dans certaines graines (situation analogue au cas de certaines maladies des céréales telles que l'ergot du seigle ou la carie du blé) est une cause majeure de perte de matériel et de faibles taux de réussite en initiation. Ce facteur peut faire la différence entre initiation observée ponctuellement sur quelques mm^3 de matériel végétal (détectable visuellement mais sans aucune signification en termes de culture ultérieure) et initiation stable à long terme (au minimum une dizaine de grammes de matériel végétal et une possibilité de régénération). La dissection complète des graines permet également la production de certains types de matériel végétal à des fins expérimentales (mégagamétophytes pour les études de diversité génétique, clones différents issus d'une même graine pour les études d'identité et des phénomènes de pollinisation multiple) et évite tout risque de propagation de mosaïques (mélange de clones différents issus d'une même graine avec variabilité incontrôlée et inconnue de la représentation de chaque clone au cours du temps). L'hétérogénéité génétique des cultures embryonnaires résultant du développement d'embryons à partir de plusieurs œufs (plusieurs génotypes) au sein d'une même graine a été peu étudiée jusqu'ici. Une seule étude signale ce point important (Becwar *et al.*, 1991).

Depuis 6 ans, seuls sont utilisés des cônes issus de croisements contrôlés correspondant à des familles élites choisis par les améliorateurs. Les taux d'initiation stabilisée (% de graines immatures utilisées produisant un clone d'embryons somatiques cultivable à long terme) varient de 0 à 80 % selon le stade physiologique des explants et l'année (Tableau 16). Une variabilité aussi large peut être retrouvée pour un même croisement contrôlé suivant la localisation du verger et l'année considérée. Cela traduit probablement l'influence de la physiologie de l'arbre mère, elle-même liée au climat, et la difficulté de distinguer morphologiquement (de manière non destructive) et de prélever des embryons au stade de développement approprié (l'évolution des embryons d'un stade trop précoce au stade requis peut prendre moins de 48 heures). De plus, 2 graines voisines dans un cône n'ont vraisemblablement pas subi exactement les mêmes influences du milieu et de l'arbre et peuvent donc se trouver dans des stades différents à l'ouverture du cône. Malgré ces multiples aléas, le taux d'initiation est cependant proche de 20 % en moyenne.

Tableau 16 : Exemples de variabilité annuelle du taux d'initiation obtenu à partir de graines issues de croisements contrôlés particulièrement intéressants pour les améliorateurs. Remarquez le succès relativement bon des croisements 0060 x 0123 et 0022 x 0041 en 2001, contrairement au croisement 4301 x 3110.

	Croisement 0022 x 0041		Croisement 0060 x 0123		Croisement 4301 x 3110	
Année	Effectif	Taux (%)	Effectif	Taux (%)	Effectif	Taux (%)
1995	>200	36.7	>200	6.1	>200	3
1997	-	-	-	-	110	41.8
1998	-	-	19	10.5	-	-
1999	227	12.8	-	-	69	0
2000	442	10.6	367	7.6	269	2.2
2001	634	36.8	479	22.8	661	7.9

Contrairement aux résultats rapportés par nos collègues scandinaves pour le pin sylvestre, aucune corrélation avec les paramètres climatiques permettant de prédire le moment optimum de prélèvement des graines immatures n'a pu être mise en évidence (étude des sommes de températures seules ou en combinaison avec d'autres paramètres, selon notamment les modes de calculs utilisés pour le suivi de la maturation des graines de pin sylvestre ou de la phénologie du maïs). Cette variabilité se traduit également par l'absence de corrélation entre le succès relatif aux croisements individuels et le taux d'initiation global annuel (Tableau 17). L'échec ou le faible succès d'un croisement donné une année donnée ne s'explique en fait que très rarement par un taux de succès global également faible qui traduirait, par exemple, un problème ponctuel d'état sanitaire (année 2000 par exemple) ou éventuellement une erreur humaine.

Tableau 17 : Illustration de l'absence de corrélation entre performances maximales (calculées sur 100 à 400 embryons) et performances moyennes (calculées sur l'effectif total mentionné dans le tableau) en termes de taux d'initiation au cours de 8 campagnes successives (1994-2001)

		Taux d'initiation	
Année	Effectif	Moyen pondéré	Maximum observé
1994	1500	31.6	50.6
1995	3000	6.3	51.3
1996	3000	42.7	72.5
1997	1075	39.3	68.8
1998	325	22.8	31.5
1999	2403	6.3	32.7
2000	3899	10	44.1
2001	3965	22.2	46.2
Total	19167	22.3	

Des résultats préliminaires très encourageants obtenus sur des pins maritimes de plusieurs années montrent la possibilité d'initier des cultures embryonnaires à partir d'arbres en âge d'être bien caractérisés chez cette espèce (problème rencontré pour le pin maritime par rapport à l'épicéa : faible régénération de plantes; technique peu transposable mise au point sur l'épicéa et d'autres espèces de résineux qui ont fait l'objet de contrats privés).

Ces expérimentations nous ont notamment permis d'appuyer les soupçons (récemment traduits par une publication d'une autre équipe, Klimaszewska *et al.,* 2001) d'une interaction entre les conditions d'initiation et les performances ultérieures en termes de régénération de plantes (maturation et germination).

Nous avons montré la possibilité d'obtenir de l'initiation avec la composition minérale standard de notre milieu de culture quelles que soient les hormones ajoutées, en particulier en présence d'hormones favorisant la maturation (ABA) ou en **absence totale** d'hormones ajoutées. Dans ces dernières conditions, le taux d'initiation stable est toutefois fortement réduit.

Malgré la mise en place d'un plan factoriel en diallèle depuis 1994, nous n'avons pas pu obtenir une gamme de résultats suffisamment complète pour conclure quant à l'existence d'un éventuel effet génétique, uniparental en particulier (hérédité strictement maternelle ou strictement paternelle), sur le taux d'initiation obtenu. Le principal facteur limitant qui a été identifié est l'irrégularité de production de cônes en nombre suffisant chaque année. Ainsi, par exemple, un croisement nous ayant donné près de 45 % d'initiation stabilisée en 2000 n'a pu être testé à nouveau en 2001 faute de floraison femelle suffisante. Les dégâts occasionnés par le gel et les insectes posent aussi régulièrement des problèmes.

Nous avons vérifié par ailleurs que le pré-traitement par le froid n'améliorait pas le taux d'initiation contrairement à certains résultats publiés chez d'autres espèces (notamment Haggman *et al.*, 1999 pour le pin sylvestre).

La **multiplication** des cultures embryonnaires ne pose aucun problème, y compris lors des phases un peu plus délicates de stabilisation immédiatement après l'initiation ou la réactivation d'un stock cryoconservé. Nous avons obtenu la multiplication stable sur le long terme en **absence de toute hormone** dès 1997, et ce sans aucun impact négatif. Ainsi, les productions d'embryons matures et de plantes les plus importantes à ce jour ont été obtenues sur le clone T325 (Ramarosandratana et al., 2001a et b) après plus de deux ans de multiplication continue sans hormone. Nous avons montré que la morphologie en multiplication est clairement corrélée au succès en maturation. Ces dernières années, nous avons optimisé les conditions de multiplication sur base de critères morphologiques (Figure 10) et de croissance en biomasse. Nous avons ainsi modifié les teneurs en agent gélifiant et la nature du sucre utilisé. Diverses hormones non conventionnelles à cette étape ont été testées. Cette étude est toujours en cours dans le cadre du projet européen SEP (QLK5-CT-1999-00679, Propagation of European Pines via Somatic Embryogenesis).

La maîtrise de la multiplication des masses embryonnaires nous a permis d'explorer avec succès les possibilités de **transformation génétique** (dans le cadre de l'autorisation ministérielle n°3447) du pin maritime par biolistique ou en utilisant la bactérie *Agrobacterium tumefaciens*. Nous avons ainsi obtenu des embryons transgéniques en laboratoire pour plusieurs clones de 9 familles élites. Des plantes transgéniques ont pu être régénérées à partir de plusieurs de ces lignées transformées. Ces résultats sont le fruit d'efforts assez limités (1 ETP) au regard du niveau d'activité déployé de part le monde en la matière (exemple : New Zealand Forest Research Institute : une dizaine de temps pleins actifs en transgenèse du pin

radiata). Ces expérimentations de transgenèse ont été l'occasion de mettre en place une **traçabilité moléculaire** minimale du matériel multiplié (transgénique ou non) à l'aide des outils moléculaires disponibles (microsatellites) mais encore insuffisants pour pouvoir distinguer avec certitude tous les génotypes manipulés (Mariette *et al*., 2001). Cet aspect est important au regard de l'ampleur, encore trop confidentielle, des mélanges et contaminations de matériel végétal constatés au cours des rares tests effectués sur le MFR produit sans système de traçabilité par les voies traditionnelles ou biotechnologiques (exemple des vergers à graines open : Plomion *et al.*, 2001 ; ES et boutures en pin radiata : Aitken 2001).

La **cryoconservation** est réalisée suivant un protocole propre à l'AFOCEL, intermédiaire entre les techniques de multiplication standard faisant appel au saccharose et la technique de cryoconservation la plus répandue au niveau international qui a recours au sorbitol. Notre technique offre un taux de survie (98%) et une vitesse de réactivation comparables aux autres (reprise d'une croissance normale en moins de deux mois pour 80% des clones) mais avec des avantages certains en termes de facilité de manipulation qui se traduisent par une meilleure sécurité sanitaire et une exigence en main d'œuvre plus réduite (Lagrange, 2001). Les récentes évolutions de nos procédures garantissent un suivi minutieux de la conservation des cultures : un système de base de données spécialisé est utilisé, les courbes de températures appliquées au cours de la procédure de mise en cryoconservation sont systématiquement enregistrées (garantie que la procédure a été accomplie avec succès) et l'alimentation en azote liquide des cryoconservateurs est gérée automatiquement (un système d'alarme averti de tout dysfonctionnement éventuel). Nous avons actuellement (au 01/05/02) un stock de plus de 1200 clones d'embryons somatiques issus de croisements contrôlés en collection dans l'azote liquide. 5 familles élites choisies en concertation avec les améliorateurs de l'AFOCEL atteignent ou dépassent la centaine de clones. Des QTL de diverses propriétés du bois (teneur en lignine et alpha-cellulose, rendement en pâte, facilité de blanchissement, extractifs totaux, paramètres de micro-densité) et de croissance en diamètre et hauteur ont été cartographiés récemment (projet européen QLK5-CT1999-01159 UHD map) pour une des familles en collection.

Le passage des cultures embryonnaire immatures au stade embryon cotylédonnaire prêt à germer (la **maturation**) est l'étape qui pose de loin le plus de problèmes. Un protocole simple très proche des techniques connues chez les épicéas nous a permis de produire les premières plantes dès 1995 (18 plantes de 12 clones) puis en 1997 (150 plantes de 25 clones, protocole amélioré). La première série de plantes a été utilisée à des fins expérimentales (analyses destructives ou traitements altérant la morphologie). La seconde série (germination en 1998) a fait l'objet d'une plantation en 1999. Une petite partie des plants a été installée en bacs extérieurs à Nangis. L'autre partie de ces plants (la plus grande) a été plantée en comparaison avec des semis témoins en pépinière de démonstration sur deux sites (AFOCEL Nangis et AFOCEL Sud Ouest). Les plus beaux plants atteignent maintenant les 4 mètres de haut.

Par la suite, nous avons montré l'importance des modalités de prélèvement du matériel végétal lors du passage en maturation. De profondes modifications des techniques portant sur l'utilisation de fortes teneurs en PEG et/ou en gélifiant ainsi qu'en l'utilisation de maltose nous ont permis d'atteindre des rendements élevés en embryons cotylédonnaires (jusqu'à 1000 par gramme; résultats partiellement publiés: Ramarosandratana *et al*., 2001a et b). Cependant, les rendements en embryons de bonne qualité obtenus pour la majorité des clones sont plutôt de l'ordre de 1 à 10 embryons par gramme tandis qu'un faible nombre de clones atteignent les 50 embryons par gramme. Il semblerait que les embryons produits depuis 2 ans par cette procédure améliorée au cours de la thèse de A. Ramarosandratana soient néanmoins peu aptes à la germination. Ainsi, environ 600 plants somatiques seulement sont actuellement acclimatés en serre par an (2001). Les pertes au cours de l'élevage et les destructions volontaires de plantes fortement affectées dans leur croissance nous a conduit à ne maintenir

à ce jour en élevage qu'un total d'environ 1 millier de plants. Cependant, nos résultats pratiques viennent de connaître une accélération soudaine (4 000 embryons ont été mis en germination au troisième trimestre 2002) suite à l'effort de mise au point réalisé ces dernières années.

La **germination** pose principalement des problèmes qualitatifs. Il s'agit d'une part de la reprise de prolifération des cultures embryonnaires immatures subsistant à l'état de "traces" au pied des embryons cotylédonnaires mis à germer. L'important pouvoir de multiplication de ce type de matériel modifie fortement les paramètres physiques et chimiques du milieu de culture au voisinage du plant, ce qui détériore fortement sa morphologie (hyperhydrie, déformations, anémie par compétition) et impose une surveillance attentive et des interventions manuelles fréquentes pour nettoyer les jeunes plants. En dehors de cet aspect, la germination pose également des problèmes de qualité morphologique des plants. La mise en culture quasi-systématique d'embryons zygotiques excisés (issus de graines, témoin le plus approprié pour une comparaison avec des embryons somatiques) démontre bien que ce sont les conditions de culture en elles-mêmes et pas seulement le caractère "somatique" ou éventuellement les traitements subis antérieurement qui causent ces problèmes morphologiques (crosse du collet, fourchaison très précoce).

Transfert en extérieur (acclimatation) et élevage des plants

Le taux de survie des plants au cours du transfert des conditions stériles du laboratoire aux conditions de culture horticole en serre est très élevé (90 % de succès moyen en acclimatation). La plupart des plants perdus à cette occasion le sont par le tri sur la morphologie . Les techniques d'élevage des embryons somatiques sont en adaptation constante pour les concilier avec les contraintes des systèmes optimaux développés pour la production commerciale de plants de pin maritime (domaine dans lequel nous bénéficions de l'expertise de l'AFOCEL Sud-Ouest qui participe en tant que consultant à la gestion des pépinières Forelite produisant une dizaine de millions de plants de pin maritime chaque année). Nous avons identifié quelques paramètres clés (contrôle précis de la fertilisation et du pH de l'eau d'arrosage, modalités de manipulation des très petits plants sortant du laboratoire, etc.) et erreurs à éviter (ne pas planter en pleine terre, même avec d'infinies précautions, des plants trop petits mais théoriquement assez âgés; ne pas faire de plantation d'automne pour des essais hors Aquitaine, etc.). Nous avons d'ores et déjà démontré, bien qu'à une échelle encore trop modeste, que des plants produits par embryogenèse somatique peuvent se développer normalement (morphologie, vitesse de croissance, âge à la première floraison) mais que, par contre, certains facteurs encore mal identifiés peuvent avoir une influence très nette. Ainsi, nous avons quelques exemples de plants magnifiques accompagnés par des plants anormaux (plants buissonnants, chétifs, port retombant, etc.) bien qu'appartenant au même clone (ce qui a été vérifié par analyse de l'ADN) et cultivés en même temps par les mêmes personnes tout au long du processus, parfois dans le même récipient. Cela constitue un matériel de choix pour nos collègues chercheurs fondamentaux qui s'intéressent aux déterminismes (génétique et épigénétique) de la morphologie des arbres.

Transformation génétique

Nous avons obtenu assez facilement la transformation génétique de deux clones de pin maritime par la méthode biolistique dès 1993. Les méthodes de régénération d'embryons somatiques étant trop sommaires à l'époque, la totalité du matériel a été cryoconservé. Il a été réactivé en 2000 et son caractère transgénique a pu être mis en évidence sur des embryons *in vitro* et des plantules *in* et *ex vitro* d'âge croissant. A la même époque, nous avons développé en un an un protocole original de transformation par *Agrobacterium tumefaciens*. Ce protocole a depuis été optimisé et a permis la régénération de plantes. L'expression stable du gène rapporteur (activité GUS codée par le gène *uidA*) à un niveau élevé a pu être révélée chez la

plupart des lignées ayant intégré le gène de sélection (gène *hpt* de résistance à l'antibiotique hygromycine B) ainsi que chez l'ensemble des plantules. Les rendements de transformation par la méthode de biolistique s'établissent ainsi entre 7,0 et 8,5 lignées résistantes à l'hygromycine exprimant le gène rapporteur par gramme de matière fraîche (deux génotypes testés et transformés). Dans le cas de la méthode utilisant *Agrobacterium tumefaciens*, les rendements sont plus variables et s'établissent entre 0 et environ 74 lignées par gramme de matière fraîche (8 génotypes transformés sur 11 testés). Les méthodes de biologie moléculaire (PCR et Southern blot) nous ont permis de démontrer l'intégration des transgènes dans le génome de la plupart des lignées et plantules testées. Les résultats suggèrent par ailleurs l'existence d'un faible nombre de copies (1-2) des transgènes chez la plupart des lignées transgèniques, caractère considéré comme un bon garant de du fonctionnement correct et stable à long terme des transgènes.

Notre activité pendant ces quelques années nous a permis d'acquérir des connaissances et l'expertise nécessaires pour transformer avec efficacité des masses embryonnaires de pin maritime par 2 méthodes distinctes Nous pouvons donc d'ors et déjà tenter d'introduire des gènes d'intérêt agronomique chez cette espèce. Il faut maintenant terminer la comparaison du matériel obtenu par les 2 méthodes (la comparaison est actuellement partielle car les clones testés sont différents) puis les développer. Il s'agit de transformer les mêmes clones pour une comparaison rigoureuse (résultat scientifique original et de très haute valeur pour lequel les offres de collaborations sont réelles) afin de formuler un choix méthodologique pertinent. Ces travaux tiendront compte en particulier des contraintes actuelles et futures de la certification forestière (importance des thèmes de recherche portant sur la traçabilité des transgènes, le contrôle de la floraison, la maîtrise de l'intégration des transgènes, *etc.*).

3.1.3. Synthèse des perspectives.

La masse critique et les interactions avec les spécialistes d'autres disciplines (biochimistes, physiologistes) nécessaires pour l'amélioration des procédés pour une efficacité maximale de la recherche ne peut être obtenue que par une mise en commun de nos moyens et de nos expériences avec ceux de l'INRA.

Il nous faut absolument améliorer le rendement qualitatif et quantitatif de la maturation afin de réussir à produire au moins quelques plants pour une majorité de clones. Plusieurs pistes prometteuses sont en train d'être explorées dans le cadre du projet européen SEP (http://www.sgen.slu.se/sep/index.html). Nous pourrons alors étendre les essais au champs puis réaliser des démonstrations. Nous testerons l'existence de biais de sélection pouvant être liés à l'embryogenèse somatique des pins (lien entre aptitude à l'embryogenèse somatique et comportement en forêt, diversité génétique du matériel multiplié).

Nous devrons renforcer les interactions avec les améliorateurs dans un premier temps, puis avec les sylviculteurs afin d'intégrer au mieux leurs besoins et leurs contraintes. Nous proposerons également notre aide aux chercheurs plus fondamentaux intéressés par le matériel végétal que nous pouvons produire. Nous participerons par ailleurs à la réflexion sur la mise en place d'outils moléculaires de sélection assistée (QTL) et de traçabilité (microsatellites nucléaires) ainsi qu'à l'information et au débat sur les OGM forestiers.

Figure 9 :
Initiation d'embryons somatiques à partir d'une graine (embryon zygotique) immature. Les parties blanches / translucides constituent un début de prolifération d'embryons somatiques.

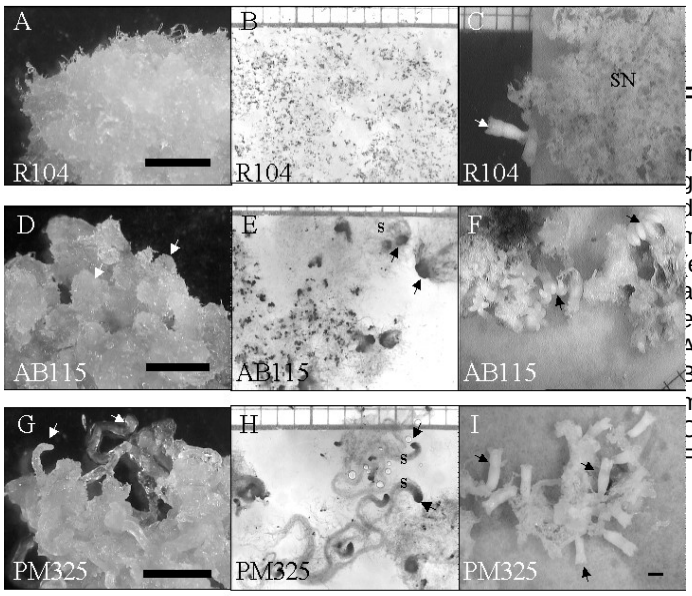


Figure 10 :
Typologie des morphologies d'embryons somatiques. En haut, morphologie "lisse" (embryons immatures petits et peu structurés) généralement associée à un faible potentiel de production d'embryons cotylédonaires (rendement de maturation faible). Au milieu, morphologie intermédiaire. En bas, morphologie hérissée (embryons immatures bien structurés, de grande dimension) associée à un potentiel de maturation élevé (Ramarosandratana *et al.,* 2001 a, b).
A, D et G : macromorphologie et
B, E et H : micromorphologie des embryons en phase de multiplication.
C, F et I : vue macroscopique des cultures en fin de maturation.
Flèches blanches: embryons récoltables prêts à germer

Pour en savoir plus:

Projet SEP: http://www.sgen.slu.se/sep/index.html
Projet UHD map: http://www.neiker.net/UHDfor/

3.1.4. Liste des publications et documents réalisés.

1. Epicéa

Publications principales des dix dernières années (articles)

Bercetche J 1990. Optimisation des conditions d'obtention de plantules à partir de cals embryogènes de *Picea abies*. Annales de Recherches Sylvicoles AFOCEL 1988:97-118.

Bercetche J, Galerne M et Dereuddre J 1990. Augmentation des capacités de régénération de cals embryogènes de *Picea abies* après congélation dans l'azote liquide. C.R. Acad. Sci., T 310 (III), 357-363.

Bercetche J, Galerne M et Dereuddre J 1990. Enhancement regeneration from embryogenic callus of *Picea abies* L. karst after freezing in liquid nitrogen. 137:3; 4:136-137.

Bercetche J, Lelu MA et Galerne M 1992. Embryogenèse somatique chez *Picea abies* et cryoconservation des souches embryogènes. Complément des Annales de Recherches Sylvicoles AFOCEL 1991, 5-24.

Bercetche J, Dinant M, Coosemans N, Pâques M et Matagne RF 1993. Canon à particules : nouvelle possibilité de transformation chez *Picea abies*. Annales de Recherches Sylvicoles AFOCEL 1992:29-48.

Bercetche J, Reymond I et Pâques M 1993. Conversion des embryons de *Picea abies* en plantes : influence du support de culture. Annales de Recherches Sylvicoles AFOCEL 1992, 5-28.

Chandelier A., du Jardin P., Avril C. et Pâques M. 1999. Identification of mitochondrial plasmid-like DNAs in *Picea abies* (L.) Karst. Plant Cell Reports 18, p 841-847.

Chauveau F, Brachon N et Pâques M 1995. Marqueurs protéiques associés à l'état embryogène des cultures cellulaires de *Picea abies.* Annales de Recherches Sylvicoles AFOCEL 93-94, 5-22.

Harvengt L, Trontin J, Reymond I, Canlet F et Pâques M 2001. Molecular evidence of true-to-type propagation of a 3-year-old Norway spruce through somatic embryogenesis. Planta 213, 828-832.

Pâques M, Bercetche J et Palada M 1995. Prospects and limits of somatic embryogenesis of *Picea abies*. in Jain S, Gupta P and Newton R (eds), Somatic embryogenesis in woody plants, Vol 1, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp 399-414

Passerieux E, Baud S, Dulieu H et Pâques M 1999. RAPD.Variation in a Norway Spruce Seedlot: Consequences of Somatic Embryogenesis. The Journal of Heredity 90, 6, 662-667.

Ruaud JN 1993. Maturation and conversion into plantlets of somatic embryos derived from needles and cotyledons of 7 to 56 day-old *Picea abies*. Plant Science 92/2, 213-220.

Ruaud JN et Pâques M 1995. Somatic embryogenesis and rejuvenation of trees. In: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (Eds) - Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. Somatic embryogenesis in woody plants. History, molecular and biochemical aspects, and applications. 1, 99-118.

Ruaud JN, Bercetche J et Pâques M 1992. First evidence of somatic embryogenesis from needles of 1-year-old *Picea abies* plants. Plant Cell Reports 11, 563-566.

- ainsi que plusieurs dizaines de communications et posters présentés lors de congrès internationaux.

Mémoires

Deloron H. 1998. Etude des interactions entre des amas cellulaires embryogènes et non-embryogènes de *Picea* sp. et de *Pinus* sp. Mémoire de fin d'études présenté devant l'Université d'Angers en vue de l'obtention du Diplôme d'Etudes Supérieures Spécialisées (DESS).

Le Turdu J 1999. Mise au point d'une technique d'analyse, à l'aide de microsatellites, de la qualité d'embryons somatiques d'épicéa. Mémoire de fin d'études DESS de Productivité Végétale.

Lebascle K 1995. Embryogenèse somatique chez *Picea abies* : optimisation de la phase de maturation en milieu liquide. Université Denis Diderot, DESS de Productivité végétale.

Poirson M 1998. Amélioration qualitative et quantitative de la production d'embryons somatiques en milieu liquide et sur milieu solide chez *Picea abies* (L.) Karst. Mémoire de fin d'études présenté devant l'Ecole de Biologie Industrielle de Cergy-Pontoise (Ingénieur).

Saunier I. 1993. Recherche de marqueurs protéiques de l'embryogenèse somatique chez Picea abies.Mémoire présenté devant l'Université de Nancy I en vue de l'obtention du Magistère de Microbiologie-Enzymologie.

Thèses

Chandelier A 1995. Structure du génome mitochondrial de l'épicéa commun (*Picea abies* (L.) Karst.) lors de l'embryogenèse somatique in vitro. Dissertation originale présentée à la Facultée Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique) en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Agronomiques. 240 p.

Chauveau F 1995. Recherche de marqueurs protéiques associés à l'embryogenèse somatique chez l'épicéa Commun (*Picea Abies* L. Karst.). Doctorat de l'Université de Picardie Jules Verne Spécialité Physiologie Végétale et Développement 128 p.

Galerne M. 1990. Cryoconservation de cals embryogènes d'Epicéa (*Picea abies* (L.) Karst). Influence de différents facteurs sur la reprise de croissance. Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie (Paris 6).

Lelu MA 1987. Embryogenèse somatique chez *Picea abies* (L.) Karst. à partir de cotylédons de jeunes plantes. Doctorat de l'Université de Paris VI, 126p.

Ruaud JN 1992. Embryogenèse somatique chez *Picea abies* (L.) Karst : Obtention de cals embryogènes à partir de cotylédons et d'aiguilles de jeunes semis, Régénération et acclimatation de plantes. Doctorat de l'Université de Bordeaux II.

Passerieux E 1998. Evaluation de la diversité génétique des sous-populations embryogènes issues de deux lots de semences de *Picea abies* (L.) Karst. Doctorat de Université de Bourgogne, UFR des Sciences de la Vie.

2. Pin maritime

Publications principales des dix dernières années (articles)

Bercetche J, Pâques M, Jain SM, Gupta PK et Newton RJ 1995. Somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster*) Somatic embryogenesis in woody plants. Volume 3-Gymnosperms. 221-242.

Harvengt L, Pâques M et Philipon P 2000. La multiplication des pins. Biofutur 1999, 22-25.

Ramarosandratana A, Harvengt L, Bouvet A, Calvayrac R et Pâques M 2001. Effects of carbohydrate source, polyethylene glycol and gellan gum concentration on embryonal-suspensor mass (ESM) proliferation and maturation of maritime pine somatic embryos. *In vitro* Cellular and Developmental Biology - Plant 37, 29-34.

Ramarosandratana A, Harvengt L, Bouvet A, Calvayrac R et Pâques M 2001. Influence of the embryonal-suspensor mass (ESM) sampling on development and proliferation of maritime pine somatic embryos. Plant Science 160, 473-479.

Trontin JF, Harvengt L, Garin E, Lopez-Vernaza M, Arancio L, Hoebeke J, Canlet F et Pâques M (2002).Towards genetic engineering of maritime pine *(Pinus pinaster* Ait.). Annals of Forest Science 5/6 (sous presse).

Rapports de stage de DEA , DESS, ingéniorat

Daudin D. 2002. Contribution à l'étude des aspects morphologiques et physiologiques comparés de la germination *in vitro* d'embryons zygotiques et somatiques de pin maritime. DEA, Université Henri Poincaré, Nancy.

Lagrange A 2001. Détermination et validation de la meilleure procédure de cryoconservation d'embryons somatiques immatures de pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.). DEA, Université Henri Poincaré, Nancy.

Lavandier V. 1996. Embryogenèse somatique de *Pinus pinaster* : caractérisation des tissus embryogènes de *Pinus pinaster* en phase de prolifération, en comparaison avec *Picea abies* (L.) Karst. DESS, Université Denis Diderot Paris 7.

Lopez-Vernaza M 2000. Essai de transformation génétique de lignées embryogènes de pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.) via *Agrobacterium tumefaciens*. DESS, Université Denis Diderot Paris 7.

Michel R. 2002. Construction moléculaire d'un vecteur porteur de gènes d'intérêt et essai de transformation génétique de génotypes sélectionnés de pin maritime. DEA, Université Henri Poincaré, Nancy.

Plasson C 2000. Contribution à l'amélioration de la maturation des embryons somatiques de pin maritime. DESS, Université d'Angers.

- ainsi que plusieurs dizaines de communications et posters présentés lors de congrès internationaux.

Thèses

Breton D. (en cours). Maîtrise et compréhension de la physiologie de la maturation et de la germination des embryons somatiques/zygotiques de pin maritime. Doctorat, Université Henri Poincaré, Nancy.

Jarlet-Hugues E. 1989. Recherches sur l'aptitude à l'embryogenèse somatique de matériel juvénile et de matériel issu d'arbres adultes de *Pinus pinaster*. Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris 6.

Ramarosandratana A 2000. Modulation du développement des embryons somatiques de pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.) en fonction des conditions de culture. Doctorat Université Denis Diderot Paris 7.

Brevet

Pâques M. et Bercetche J. 1998. Procédé de rajeunissement de gymnospermes par embryogenèse somatique - No de publication : FR2770745 (WO9923874). Brevet n° 9714105 – 21 p.

3.2. Programmes développés à l'INRA

A l'INRA d'Orléans, les recherches en embryogenèse somatique ont été initiées sur le mélèze d'Europe en 1988 par D. Cornu (Cornu et Geoffrion 1990). Suite au recrutement fin 1989 de MA Lelu, elles se sont principalement développées sur le mélèze hybride jusqu'en 1995, conduisant à la mise au point d'une méthode performante et reproductible. Plus récemment, il est apparu important de développer cet outil pour des espèces d'intérêt majeur, notamment les pins. C'est pourquoi une activité de recherche sur l'embryogenèse somatique chez le pin sylvestre et le pin maritime a été initiée en 1996,. Par ailleurs, pour toutes ces espèces (mélèzes et pins), il s'avérait que disposer de l'outil de transformation génétique devenait nécessaire au développement de différents programmes. La démarche adoptée était alors de disposer : (1) d'un système efficace de régénération, (2) d'un système de transformation.

Nous présenterons successivement le bilan des travaux en embryogenèse somatique des mélèzes et des pins puis les applications qui en découlent et qui justifient la nécessité de disposer de cette biotechnologie.

3.2.1. Embryogenèse somatique du mélèze hybride

La diffusion de ce matériel végétal est lente en raison des difficultés de production de graines. Cette situation a contraint les améliorateurs à envisager sa propagation par voie végétative, notamment par embryogenèse somatique. Les recherches entreprises à l'INRA d'Orléans concernent le mélèze d'Europe (*L. decidua*), le mélèze japonais (*L. kaempferi*) et le mélèze hybride *Larix* x *eurolepis (L. decidua* x *L. kaempferi,* Lelu *et al.* 1994c). Cependant, du fait de la disponibilité de matériel, les principaux résultats obtenus concernent l'hybride réciproque *Larix* x *leptoeuropaea* (*L. kaempferi* x *L. decidua,* nommé mélèze hybride par la suite de ce rapport).

Les différentes étapes de l'embryogenèse somatique ont été successivement étudiées. Les principaux résultats concernant les facteurs impliqués au cours de la culture *in vitro* sont présentés. Par ailleurs, afin de mieux contrôler cette embryogenèse somatique, des études plus explicatives ont été développées comme l'implication des régulateurs de croissance du fait de leur importance dans ce processus.

3.2.1.1. Vers la maîtrise de l'embryogenèse somatique du mélèze hybride

L'obtention de l'embryogenèse somatique dépend de l'explant mis en culture et, généralement, l'induction est d'autant plus efficace que le matériel végétal est juvénile. Chez *Larix* sp., la plus forte induction de l'embryogenèse somatique a été obtenue à partir d'embryons zygotiques immatures (Lelu *et al.* 1994a, Bonga *et al.* 1995) et il semblerait que pour le mélèze hybride, il y ait un effet de la combinaison parentale du croisement (Lelu *et al.* 1994c). Des travaux montrent le rôle inhibiteur de l'éthylène sur l'induction de l'embryogenèse somatique qui a pu être obtenue à partir de graines hybrides de mélèze (Saly *et al*. 2002). Ces résultats encourageants restent cependant à être améliorés, l'objectif final étant d'obtenir l'embryogenèse somatique à partir du matériel sélectionné, si possible à partir d'arbres adultes.

A ce jour *nous disposons d'une méthode efficace d'induction de l'embryogenèse somatique à partir d'embryons zygotiques immatures de mélèze hybride.*

Les masses embryogènes obtenues sont cultivées sur un milieu de prolifération, leur multiplication nécessitant un repiquage régulier (tous les quinze jours) en présence d'auxine (2,4-D). Ces masses peuvent aussi facilement être multipliées en milieu liquide agité (Kumar *et al.* 1995). Les risques encourus (perte de matériel, variations génétiques, diminution des

capacités de régénération) ont très vite nécessité de développer leur cryoconservation dans l'azote liquide. Une méthode de cryoconservation simplifiée ne nécessitant pas de congélateur programmable (Dannoux 1998) a été mise au point, ce qui était jusqu'alors nécessaire pour les conifères (Lelu *et al.* 1993).

A ce jour *nous disposons d'une méthode simple, rapide et performante (100% de survie après congélation) de cryoconservation de masses embryogènes de mélèze sp.*

Le développement des embryons somatiques est initié dès le transfert des masses embryogènes sur un milieu dépourvu de 2,4-D. Chez les mélèzes, un apport exogène d'acide abscissique (ABA) favorise un développement synchrone des embryons somatiques cotylédonaires, l'absence de germination précoce (Lelu *et al*. 1994a) et l'accumulation de réserves (Gutmann *et al.* 1996, von Aderkas *et al.* 2002b). Cependant, le rendement, c'est-à-dire le nombre d'embryons obtenus, est dépendant de la lignée embryogène donc du génotype. Le développement des embryons somatiques cotylédonaires de mélèze hybride est rapide puisque obtenu en quatre semaines (Lelu *et al.* 1994a).

Le transfert de ces embryons somatiques sur milieu sans régulateur de croissance permet leur germination (95-100%) puis le développement de leurs parties aériennes (85-100 %, Lelu *et al.* 1994b). La déshydratation des embryons somatiques permet d'obtenir une germination de qualité : rapide (en 5 à 7 jours) et synchrone. De plus, certains traitements de déshydratation permettent d'amener la teneur en eau des embryons déshydratés à une valeur proche de celle des semences. Cela laisse entrevoir la possibilité d'une conservation des embryons qui est nécessaire dans le cas d'une manipulation en grande quantité (Lelu *et al.* 1995).

Enfin, l'acclimatation des plantes, facile et rapide, donne lieu à une survie en serre de 95-100% (Lelu *et al.* 1994b) : les plantes obtenues *in vitro* sont transférées directement de la boîte de Petri en conditions non stériles.

Le contrôle de la stabilité du matériel végétal produit au cours de l'embryogenèse somatique (embryons somatiques, plantes) a été abordé par une simple analyse en cytométrie de flux (dosage de la quantité totale d'ADN nucléaire) et n'a pas permis de révéler de variations (Lelu non publié).

La présence d'acide abscissique (ABA) dans le milieu de culture favorise le développement d'embryons somatiques de mélèze hybride en grande quantité et de manière synchrone, embryons qui germent rapidement et se développent en plantes (6 semaines).

A ce jour *nous disposons d'une méthode performante et rapide d'embryogenèse somatique du mélèze en particulier du mélèze hybride :* ***à partir des masses embryogènes en multiplication, 2 mois et demi sont en moyenne nécessaires pour obtenir des plantes acclimatées et 100 embryons cotylédonaires régénèrent en moyenne 85 à 90 plantes en serre****. La maîtrise de l'embryogenèse somatique permet d'obtenir d'une façon courante et en quantité non limitée des plants issus d'embryons somatiques.*

3.2.1.2. Étude de l'implication des régulateurs de croissance au cours de l'embryogenèse somatique

L'étude de ***la régulation hormonale****, du développement des embryons somatiques de mélèze hybride, a été particulièrement* ***bien décrite et constitue une originalité internationale et est unique chez les conifères*** *(7 publications majeures, 2 à soumettre).*

Une première étude a consisté à décrire les équilibres hormonaux de cultures embryogènes et non embryogènes. L'objectif était d'une part de rechercher une éventuelle utilisation différentielle des hormones exogènes et, d'autre part, de déterminer le profil hormonal endogène typique d'un tissu embryogène par rapport à un tissu non embryogène. Il en ressort que par rapport au tissu non embryogène, la masse embryogène contient 3 à 4 fois plus de 2,4-D mais 10 à 20 fois moins de BAP (Benzyl Amino Purine, hormone favorisant la prolifération cellulaire) ; en outre, le profil hormonal endogène d'une masse embryogène est caractérisé par relativement peu de cytokinines naturelles (Jourdain *et al.* 1997). Cet excès de 2,4-D des masses embryogènes est éliminé à 95% lors du transfert de ces masses pendant une semaine sur un milieu renfermant du charbon actif (von Aderkas *et al*. 2002a).

Les autres études menées sur la régulation hormonale portent sur le développement des embryons somatiques. Celui-ci est conditionné par la durée de culture en présence d'ABA (Lelu et Label 1994). Les plus forts taux de germination (95-100%) et de développement en plantes (85-100 %) sont obtenus pour des embryons âgés de 3 semaines ; leur maintien 4, 5, voire 6 semaines sur le milieu avec ABA entraîne une inhibition de leur germination et de leur développement en plantes. Une corrélation a été mise en évidence entre ces inhibitions et la teneur élevée en ABA qui s'accumule dans les embryons à partir de la troisième semaine de culture (Lelu et Label 1994). Un traitement de déshydratation de ces embryons somatiques entraîne une diminution significative de leur teneur en ABA (Dronne *et al*. 1997). Par ailleurs, la teneur en ABA des embryons somatiques est proportionnelle à la concentration en ABA du milieu de culture (Label et Lelu 1994). L'incorporation d'ABA radioactif dans le milieu de maturation a montré que les fortes teneurs en ABA des embryons somatiques étaient bien d'origine exogène et que l'ABA est relativement peu métabolisé par les cellules à l'exception de la synthèse d'ABA-GE, un métabolite de l'ABA (Label et Lelu, 2000). Enfin, le profil hormonal des embryons somatiques diffère de celui d'embryons zygotiques surtout par leurs teneurs en ABA et cytokinines endogènes (von Aderkas *et al.* 2001).

Les études de l'implication des régulateurs de croissance en particulier de l'ABA, au cours de l'embryogenèse somatique du mélèze hybride, ont permis de mieux comprendre certaines étapes-clé de l'embryogenèse somatique et par conséquent de mieux les contrôler. Cela a contribué à améliorer le protocole, celui-ci devenant alors moins empirique. Toutes les connaissances acquises nous sont très utiles au développement de l'embryogenèse somatique d'autres espèces comme les pins.

3.2.2. Embryogenèse somatique du pin sylvestre et du pin maritime.

En France, les pins constituent des espèces d'intérêt majeur. Ainsi le pin sylvestre représente la première espèce de reboisement de conifère pour la région Centre. Quant au pin maritime, son importance économique en a fait une des espèces prioritaires pour l'INRA et l'AFOCEL. Pour ces deux espèces, disposer de l'embryogenèse somatique laisse entrevoir de nombreuses retombées et applications. En effet, cette méthode très performante de régénération s'avère aujourd'hui *indispensable car elle constitue à la fois un outil de recherche (étude fonctionnelle des gènes) et d'amélioration des espèces.* Ainsi, des recherches en embryogenèse somatique ont été entreprises chez le pin sylvestre et le pin maritime à l'INRA d'Orléans.

Les recherches menées en embryogenèse somatique des épicéas et mélèzes ont abouti à l'obtention de protocoles efficaces en termes de répétitivité et facilité de régénération de plantes. Si les verrous furent rapidement levés chez ces espèces, il n'en était rien chez les pins pour lesquels seuls quelques résultats étaient publiés. Ce n'est que récemment, en 1997, qu'une avancée significative a été obtenue par Klimaszewska et Smith sur *Pinus strobus* qui démontrèrent pour la première fois la faisabilité en routine de l'embryogenèse somatique chez un pin. En effet, jusqu'alors la régénération de plants par embryogenèse somatique était

sporadique. Cela venait du fait que l'on s'appuyait sur les systèmes modèles établis chez *Picea* sp. et *Larix* sp, systèmes qui n'étaient pas adaptés au genre *Pinus*.

Le système idéal de multiplication végétative est celui qui en premier lieu réussirait pour tout génotype. Tout naturellement se pose la question de savoir quel peut être le contrôle génétique de l'induction à l'embryogenèse somatique. Nous avions commencé à aborder cette question chez le mélèze hybride, mais cela s'est très vite révélé difficilement réalisable devant la difficulté d'obtenir des graines hybrides. Ces difficultés ne se rencontrant pas chez les pins, nous avons choisi d'étudier cette question avec le pin sylvestre du fait de la facilité à disposer rapidement du matériel végétal nécessaire (parcs à clones à l'INRA d'Orléans). Avec l'améliorateur C. Bastien, un plan de croisement diallèle 4x4 a été mis en place afin d'estimer l'importance des effets d'aptitude générale et spécifique à la combinaison et des effets réciproques pour l'aptitude à l'embryogenèse somatique, étude répétée 2 fois. Les résultats en cours d'analyse montrent *a priori* un effet maternel (Lelu et Bastien non publié).

L'embryogenèse somatique est initiée à partir d'embryons zygotiques. Le stade de développement optimal des embryons est différent entre pin sylvestre et pin maritime: pour le premier, la meilleure induction est obtenue avec des embryons très immatures (1 à 2 semaines après fécondation) alors que pour le pin maritime, elle est meilleure avec les stades pré cotylédonaire voire cotylédonaire.

Pour le pin sylvestre, des masses embryogènes ont été obtenues en l'absence de régulateurs de croissance, masses qui ensuite se multiplient, régénèrent des embryons somatiques et des plantes. C'est la première fois chez un conifère que toutes les étapes de l'embryogenèse somatique sont réalisées sans régulateur de croissance (Lelu *et al*. 1999).

Les résultats, quant à l'obtention de l'embryogenèse somatique, bien que prometteurs, sont à confirmer pour le pin maritime, notamment en ce qui concerne l'effet des régulateurs de croissance. Il faut aussi tester l'existence ou non d'un déterminisme génétique de l'aptitude à la multiplication (initiation) de l'embryogenèse somatique.

Les masses embryogènes obtenues sont ensuite cultivées sur un milieu de prolifération, leur multiplication nécessitant un repiquage régulier (tous les quinze jours). Comme pour le mélèze, une méthode de cryoconservation simplifiée ne nécessitant pas de congélateur programmable a été mise au point à l'INRA d'Orléans (Lelu non publié).

A ce jour *nous disposons d'une méthode simple, rapide et performante de cryoconservation de masses embryogènes de Pinus sp.*

Chez ces pins, le développement d'embryons somatiques cotylédonaires est long nécessitant de 8 à 12 semaines. Les facteurs impliqués diffèrent parfois de ceux mis en évidence chez le mélèze (Lelu *et al*. 1999). Pour la maturation, outre l'ABA, l'un des facteurs clé est la disponibilité en eau du milieu de culture (Klimaszewska et Smith 1997). Cela revient à faire varier la concentration en gélifiant du milieu de culture, en l'augmentant jusqu'à 12 gl^{-1} pour le pin maritime. Néanmoins, le développement des embryons reste difficile, voire aléatoire, et surtout *non synchronisé*, les cultures embryogènes continuant à proliférer aux dépens du développement des embryons. La conséquence est l'obtention d'un matériel hétérogène, rendant difficile les manipulations et l'obtention de plants de qualité.

Si la maturation des embryons somatiques est satisfaisante pour le pin sylvestre, elle reste encore difficile pour le pin maritime. Des problèmes persistent : prolifération excessive des masses embryogènes, développement asynchrone des embryons somatiques, difficulté de régénération de plantes. Il nous faut donc l'améliorer pour disposer d'un système performant de régénération.

Des résultats obtenus, il ressort que la germination et développement en plantes sont plus "faciles" pour le pin sylvestre que pour le pin maritime, car peut-être plus rapides (Drugeault 1997). Pour l'acclimatation, nous n'avons pas observé de problème particulier mais le trop faible nombre de plants acclimatés (300 à 400 plants) n,e permet pas de conclure définitivement.

Pour avoir travaillé de par le passé jusqu'à aujourd'hui un certain nombre d'espèces (Picea abies, P. mariana, P. glauca, Pinus sylvestris, Pinus pinaster et Larix sp, nous (INRA) considérons que ***l'embryogenèse somatique du mélèze hybride peut être considérée comme un modèle chez les conifères****. Ce système remarquable de régénération, représente un outil précieux et indispensable notamment au développement d'autres programmes faisant appel à la transformation génétique*

3.2.3. Applications de l'embryogenèse somatique

Dans le cadre de collaborations, l'embryogenèse somatique du **mélèze sp**. a été transférée avec succès à de nombreux partenaires comme la Pologne (K. Szczgiel, Varsovie) et le Canada (P. von Aderkas, Université Victoria ; S. Laliberté, Université Montréal).

Des essais scientifiques et de démonstration avec du matériel amélioré restent à installer. Des essais scientifiques sont nécessaires pour obtenir des données exploitables statistiquement. Des essais de démonstration sont importants car il est nécessaire de montrer le comportement de ce matériel aux utilisateurs potentiels. Cet aspect fut abordé lors du projet européen "Northern conifers in fast growing conditions" où a été mis en place à Orléans (1995) le premier essai en pépinière de plants de mélèze hybride issus d'embryons somatiques (un millier) démontrant la possibilité de transférer et d'élever en conditions de terrain ce type de matériel. Plus récemment (2002) dans le projet FAIR "Towards a European larch wood chain", l'objectif est de mettre en place des tests comparatifs entre des plants issus d'embryons somatiques et des semis de mélèze hybride. L'embryogenèse somatique a été initiée à partir d'embryons prélevés en open chez la famille FP 201DK, famille qui s'est révélée très peu réactive à l'embryogenèse somatique (7%, résultats constants sur 3 ans). Par ailleurs, le choix de travailler avec du matériel obtenu en open ne s'est pas révélé judicieux, puisque après contrôle moléculaire, 50% des cultures embryogènes se sont révélées être européennes pures et non pas hybrides.

<u>Embryogenèse somatique et transformation génétique</u>

Depuis 4 ans maintenant, l'axe principal de recherche du laboratoire de physiologie du développement de l'INRA d'Orléans est l'étude des mécanismes physiologiques impliqués dans l'élaboration du bois. Ces travaux, réalisés pour partie sur les conifères (mélèze, pins), concernent l'identification des gènes responsables des propriétés du bois via la transformation génétique. Le succès de ces travaux repose en partie sur la *disponibilité d'un système très efficace de régénération de plants*. Pour les conifères, l'embryogenèse somatique constitue la seule technique de régénération disponible à ce jour.

La transformation génétique constitue un outil précieux pour l'étude, entre autres, de la régulation de l'expression des gènes et de leur fonction. Chez les conifères, le matériel de choix pour réaliser la transformation génétique, sont les masses embryogènes du fait de leur forte capacité de régénération.

A l'I.N.R.A. d'Orléans, les travaux en transformation génétique du mélèze hybride ont été initiés en 1993 (DEA, F. Laurans). Cependant la transformation génétique par biolistique donnait lieu à une expression transitoire (Laurans, 1993, Duchesne *et al.* 1993) et les taux de transformation restaient faibles (2 évènements/ g de masse embryogène, Klimaszewska *et al.*

1997). C'est pourquoi nous nous sommes intéressés au développement de la transformation à l'aide d'*Agrobacterium tumefaciens*, méthode bien maîtrisée et développée au laboratoire pour le peuplier. Ce thème de recherche a fait l'objet du travail de thèse de Valérie Levée (1996). Son travail a permis la mise au point d'une procédure de transformation du mélèze hybride par *A. tumefaciens* aboutissant à l'obtention de plants transgéniques en serre : leur caractérisation moléculaire (PCR, Southern blot) réalisée à partir des aiguilles a permis de vérifier l'intégration **stable** du T-DNA (ou ADN-T) dans le génome du mélèze.

Pour les conifères, la ***transformation stable*** *du mélèze hybride par* ***Agrobacterium tumefaciens*** *a constitué à cette époque une* ***avancée internationale*** *(Levée et al. 1997).*

Ces premiers résultats restaient à être améliorés quant au rendement de transformation (1 événement /g de masse embryogène). Ce travail a été poursuivi aboutissant récemment au développement d'une nouvelle méthode de transformation avec un rendement moyen de transformation de 50 à 100 événements/ g de masse embryogène (Lelu et Pilate 2000). Cette méthode a été transférée avec succès à différentes espèces d'épicéas (Klimaszewska *et al.* 2001). Ce protocole amélioré de transformation génétique a été transmis à l'AFOCEL comme base de réflexion pour des recherches communes.

Nous disposons à ce jour *d'une méthode de transformation génétique du mélèze hybride par A. tumefaciens d'une remarquable efficacité :* ***taux de transformation très élevés et constants, régénération sans difficulté, rapide*** *(6 mois) et* ***en grande quantité*** *de plants transgéniques par embryogenèse somatique. Par conséquent, pour l'INRA d'Orléans, le mélèze hybride représente une espèce modèle en embryogenèse somatique et transformation génétique.*

Disposant une méthode efficace de transformation et de régénération, nous nous sommes intéressés à l'étude des gènes codant pour des enzymes clé de la biosynthèse des lignines. Nous avons choisi de sur-exprimer des gènes de peuplier codant pour des enzymes de la voie de biosynthèse des lignines (COMT: O-méthyltransférase, CCR: Cinnamoyl Coenzyme A reductase) et d'étudier l'effet de la sur-expression sur la composition en lignine (Lelu et Pilate 2000). Ces plants ont servi de matériel d'étude à un DEA dont les premières analyses mettent en évidence, pour certains transformants, une augmentation de l'activité enzymatique de type OMT (DEA, Tamasloukht, 1998) ; cependant, le contenu et la composition en lignine des tiges ne sont pas modifiés. Ces recherches se sont poursuivies par la thèse de Mélinda Gatineau : de nouvelles transformations ont été réalisées notamment avec le gène codant pour l'enzyme ferrulate-5-hydroxylase (F5H) contrôlant la voie de synthèse des unités S, enzyme absente chez les conifères (Thèse de M. Gatineau-Poisson). Les nouvelles analyses réalisées sur les plants transgéniques ne révèlent pas de modification de la lignine.

Concernant le pin maritime, la transformation génétique a été initiée en s'appuyant sur notre expérience acquise avec le mélèze hybride (Bricon, 2000). Actuellement, les taux de transformation sont de l'ordre de ceux obtenus à nos débuts avec le mélèze à savoir 5-10 évènements/ g de masse embryogène (Lelu non publié). Ce travail s'inscrit dans le cadre du Projet européen GEMINI (coordinateur C. Plomion). L'objectif de ce projet est de développer chez le pin maritime, des critères de sélection sûrs, rapides, non destructifs, peu onéreux pour l'identification de génotypes élites pour les propriétés de leurs fibres ligno-cellulosiques (pâtes et papier). Il consiste aussi en l'identification et la caractérisation des gènes impliqués dans les propriétés du bois. Cela devrait aboutir à des marqueurs moléculaires pour la sélection précoce de génotypes élites dans un programme d'amélioration. Les gènes candidats, impliqués dans le contrôle génétique des caractères liés aux propriétés des pâtes et papier, seront identifiés, caractérisés et validés. L'étude de leur fonctionnalité sera réalisée *in fine* chez le pin maritime via la transformation génétique (INRA d'Orléans).

3.2.4. Perspectives

Concernant le mélèze hybride, à ce jour les recherches ne sont pas poursuivies quant au processus d'embryogenèse somatique lui-même. Il n'en reste pas moins que l'embryogenèse somatique du mélèze hybride est le modèle d'étude qui nous sert et servira aux études de différenciation cellulaire. En effet, son synchronisme et sa rapidité de développement sont ses atouts majeurs. Il constitue par ailleurs un excellent modèle en transformation génétique. Quant à une éventuelle intégration de l'embryogenèse somatique au programme d'amélioration, tout reste à faire. Il faudrait disposer de matériel amélioré obtenu à partir des croisements contrôlés les plus intéressants, ce dont nous ne disposons pas encore à ce jour. Cependant nous allons mettre en place, dans le cadre du projet Larch (coordonné par L. Pâques, INRA Orléans), un essai de démonstration à l'aide de nos propres cultures embryogènes obtenues dans le cadre de précédentes recherches (mais matériel non amélioré). Cet essai permettra d'évaluer le comportement au champ de ce matériel issu d'embryons somatiques avec des semis.

Concernant les pins et en particulier le pin maritime, l'embryogenèse somatique n'est pas encore maîtrisée contrairement au mélèze hybride. Le développement des embryons somatiques reste à être amélioré en termes de synchronisme, rendement (nombre d'embryons matures prés à germer) et définition de la qualité des embryons. La collaboration qui s'est engagée entre l'AFOCEL et notre laboratoire devrait permettre de résoudre rapidement cette problématique (échange des protocoles, de matériel…) en alliant nos compétences respectives,. Cette collaboration entre l'AFOCEL et l'INRA dans le domaine des biotechnologies passera aussi par la mise en place d'expérimentations communes, permettant l'accès à une échelle (nombre de répétitions) autorisant une analyse statistique rigoureuse et puissante. Enfin, comme pour le mélèze, les interactions avec les améliorateurs devront être renforcées, notamment au travers du Groupe d'Intérêt Scientifique Pin Maritime du Futur (GIS PMF, coopérative d'amélioration regroupant l'AFOCEL, l'INRA, l'ONF et le CPFA).

3.2.5. Liste des publications et documents réalisés

Ne sont présentés que les articles parus dans des revues à comité de lecture.

<u>Vers la maîtrise de l'embryogenèse somatique du mélèze hybride</u>

Bonga J.M., Klimaszewska K., Lelu M.A., von Aderkas P. 1995. Somatic embryogenesis in *Larix*. Dans : Somatic embryogenesis in Woody plants. Eds : Jain (M), Gupta (PK) et Newton (RJ) ; Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Nederlands, 315-339.

Cornu D. et Geoffrion C. 1990. Aspects de l'embryogenèse somatique chez le mélèze. Bull. Soc. Bot. Fr., Actual. Bot., 137, 25-34.

Dannoux S. 1998. Mise au point d'une méthode de cryoconservation simplifiée sur des masses embryogènes de mélèze hybride (*Larix leptoeuropaea*). Diplôme d'Ingénieur maître, Université P. Sabatier Toulouse, 28p.

Gutmann M., P. von Aderkas, P. Label et M.A. Lelu, 1996. Effects of abscisic acid on somatic embryo maturation of hybrid larch. J. Exp. Bot., 47, 1905-1917.

Kumar R., Lelu MA et Small I. 1995. Isolation of mitochondria and mitochondrial nucleic acids from embryogenic suspension cultures of a gymnosperm, *Larix* x *leptoeuropaea*. Plant Cell Reports, 14, 534-538.

Lelu M-A., Klimaszewska K.,Jones C., Ward C., von Aderkas et P., Charest P.J. 1993. A laboratory guide to somatic embryogenesis in spruce and larch. Petawawa National Forestry Institute, Forestry Canada Information Report PI-S-III. 80 p.

Lelu M.A., Bastien C., Klimaszewska K., Ward C. et Charest P. 1994a. An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix* x *leptoeuropaea)*: Part 1. Somatic embryo maturation. Plant Cell Tissue Org. Cult., 36, 107-115.

Lelu M.A., Bastien C., Klimaszewska K. et Charest P. 1994b. An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix* x *leptoeuropaea)*: Part 2. Control of germination and plantlet development. Plant Cell Tissue Org. Cult., 36, 117-127.
Lelu M.A., Klimaszewska K. et Charest P. 1994c. Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos and from cotyledons and needles of somatic plantlets of *Larix*. Can. J. For. Res. 24, 100-106.
Lelu M.A., Klimaszewska K., Pflaum G. et Bastien C. 1995. Effect of maturation duration on desiccation tolerance in hybrid larch (*Larix* x *leptoeuropaea* Dengler) somatic embryos. In Vitro Cell. Dev. Biol. 31, 15-20.
Saly S., C. Joseph, F. Corbineau., M.A Lelu. et D. Côme 2002. Induction of secondary somatic embryogenesis in hybrid larch (*Larix* x *leptoeuropaea*) as related to ethylene. Plant Growth Regulation (sous presse).
von Aderkas P., Rhor R., Sunberg B., Gutmann M., Dumont-Beboux N. et Lelu M.A. 2002b. ABA and its influence on development of the embryonal root cap, storage product and secondary metabolite accumulation in hybrid larch somatic embryos. Plant Cell Tissue Org. Cult. 69, 111-120.

Étude de l'implication des régulateurs de croissance au cours de l'embryogenèse somatique
Dronne S., P. Label et M.A. Lelu, 1997. Desiccation decreases abscisic acid content in hybrid larch (*Larix* x *leptoeuropaea)* somatic embryos. Physiol. Plant. 99, 433-438.
Jourdain I., M.A. Lelu et P. Label, 1997. Hormonal changes during growth of somatic embryogenic masses in hybrid larch. Plant Physiol. Bioch., 35, 741-749.
Label P. et M.A. Lelu, 1994. Influence of exogenous abscisic acid on germination and plantlet frequencies of hybrid larch somatic embryos (*Larix* x *leptoeuropaea)*. Relation with *in planta* abscisic acid and abscisic acid glucose ester levels. Plant Growth regulation, 15, 175-182.
Label P. et Lelu M. A. 2000. Exogenous abscisic acid fate during maturation of hybrid larch (*Larix* x *leptoeuropaea*) somatic embryos. Physiol. Plant. 109,456-462.
Lelu M.A. et Label P. 1994. Changes in the levels of abscisic acid and its glucose ester conjugate during maturation of hybrid larch (*Larix* x *leptoeuropaea*) somatic embryos, in relation to germination and plantlet recovery. Physiol. Plant. 92, 53-60.
von Aderkas P, Lelu M. A. et Label P 2001. Plant growth regulator levels during maturation of larch somatic embryos. Plant Physiol. Bioch., 39, 495-502.
von Aderkas P, Label P et Lelu M. A. (2002a). Charcoal effects on early developmental and hormonal levels of somatic embryos of hybrid larch. Tree Physiology, 22, 431-434.

Embryogenèse somatique du pin sylvestre et du pin maritime
Drugeault A. 1997. Étude chez le pin sylvestre de l'obtention d'embryons somatiques, de leur germination et de leur développement en plante. Diplôme d'Assistant Ingénieur E.N.F.A. Toulouse, 24 p.
Klimaszewska K et Smith DR 1997. Maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* is promoted by a high concentration of gellan gum. Physiol. Plant. 100, 949-957.
Lelu M.A., Bastien. C., Drugeault, A, Gouez ML et Klimaszewska K 1999. Somatic embryogenesis and plantet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with and without growth regulators. Physiol. Plant. 105, 719-728.

Embryogenèse somatique et transformation génétique
Bricon E. 2000. Études de la transformation génétique par *Agrobacterium tumefaciens* chez *Pinus pinaster*. DES, Université Paris VI 31p.
Duchesne L., M.A. Lelu, P. von Aderkas et P. Charest, 1993. Microprojection-mediated DNA delivery in embryogenic cells of *Larix* spp. Can. J. For. Res., 23, 312-316.

Klimaszewska K., Y. Devantier, D. Lachance, M.A. Lelu et P.J. Charest, 1997. *Larix laricina* (tamarack) : somatic embryogenesis and genetic transformation. Can. J. For. Res., 27, 538-550.

Klimaszewska K., D. Lachance, G. Pelletier, M.A. Lelu et A. Seguin 2001. Regeneration of transgenic *Picea glauca*, *P. mariana*, and *P. abies* after cocultivation of embryogenic tissue with *Agrobacterium tumefaciens.* In Vitro Cell. Dev. Biol. 37, 748-755.

Laurans F. 1993. Développement d'un système d'expression transitoire par électroporation de protoplastes et microprojection, chez le peuplier (*Populus tremula* x *P. alba)* et le mélèze (*Larix* x *leptoeuropaea*) hybride. DEA, Université Nancy I, 23p.

Lelu M. A**.** et Pilate G. 2000. Transgenics in *Larix*. Dans : Molecular biology of Woody Plants, Vol. 2. Jain, M. and Minocha, S.C. éds. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 119-34.

Levée V. 1996. Transformation *via Agrobacterium tumefaciens* du mélèze hybride (*Larix* x *leptoeuropaea)* et régénération de plants transgéniques. Doctorat Université Orléans, 120p.

Levée V., M.A. Lelu, L Jouanin, D. Cornu et Pilate G. 1997. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of hybrid larch (*Larix kaempferi* x *L. decidua*) and transgenic plant regeneration. Plant Cell Reports, 16, 680-685.

Tamasloukht M'B. 1998. Caractérisations moléculaires de plants de mélèze hybride transgéniques surexprimant un gène de la lignification : effet sur la composition en lignine. DEA Université Nancy I, 26p.

Rapport de stage (Ingénieur, DESS, DEA)

Bricon Evelyne 2000. Études de la transformation génétique par *Agrobacterium tumefaciens* chez *Pinus pinaster*. Diplôme d'Etudes Supérieures, Université Paris VI 31p.

Dannoux Sophie 1998. Mise au point d'une méthode de cryoconservation simplifiée sur des masses embryogènes de mélèze hybride (*Larix leptoeuropaea*). Diplôme d'Ingénieur maître, Université P. Sabatier Toulouse, 28p.

Drugeault Aurélie 1997. Étude chez le pin sylvestre de l'obtention d'embryons somatiques, de leur germination et de leur développement en plante. Diplôme d'Assistant Ingénieur E.N.F.A. Toulouse, 24p.

Henault Benjamin 1996. Étude d'un développement atypique d'embryons somatiques de mélèze hybide (*Larix* x *leptoeuropaea*). DEA, Université de Nancy, 27p.

Jourdain Isabelle 1995. Étude des corrélations entre le caractère embryogène et les concentrations hormonales chez six lignées de mélèze hybide (*Larix* x *leptoeuropaea*). DEA, Université de Nancy, 23p.

Laurans Françoise 1993. Développement d'un système d'expression transitoire par électroporation de protoplastes et microprojection, chez le peulier (*Populus tremula* x *P. alba)* et le mélèze (*Larix* x *leptoeuropaea*) hybrides. DEA, Université de Nancy, 23p.

Lechaudel Dominique 1990. Étude des principales étapes de la régénération de plantules à partir de protoplastes de différentes souches embryogènes de mélèze (*Larix decidua* Mill. et *Larix* x *eurolepis* Henry). DEA, Université de Nancy, 64p.

Pflaum Géraldine 1992. Étude de l'application de traitements de déshydratation sur des embryons somatiques de mélèze hybride (*Larix* x *leptoeuropaea*). DEA Université de Nancy, 46p.

Tamasloukht M'Barek 1998. Caractérisations moléculaires de plants de mélèze hybride transgéniques surexprimants un gène de la lignification : effet sur la composition en lignine. DEA, Université de Nancy, 25p.

Thèse

Levée, Valérie 1996. Transformation *via Agrobacterium tumefaciens* du mélèze hybride (*Larix* x *leptoeuropaea*) et régénération de plants transgéniques. Université d'Orléans 120p.

Saly, Sabine 1997. Etude des effets de l'éthylène sur l'induction de l'embryogenèse somatique du mélèze hybride (*Larix* x *leptoeuropaea*). Université d'Orléans 153p.

Gatineau-Poisson, Mélinda 2002. Vers une meilleure compréhension de l'absence de monomères de type syringyl dans les lignines de conifère : une approche par transformation génétique. Université d'Orléans, 117p.

4 - Conclusions (avant réunion du comité de pilotage)

4.1 Etat et besoins

L'embryogenèse somatique représente une méthode très performante de multiplication végétative. Dans le cadre de la création variétale, elle permet d'accélérer la sélection et elle constitue un moyen de propagation clonale d'individus sélectionnés. Son application immédiate est la mise en collection par cryoconservation d'un grand nombre de clones obtenus à partir des combinaisons biparentales sélectionnées. Par ailleurs, la collection ainsi constituée ("cryobanque") permet une conservation aisée et sûre des ressources génétiques à très long terme (plusieurs milliers de clones sur quelques mètres carrés avec un coût d'entretien très faible).

Pour chaque clone, quelques dizaines de plants sont produits afin de réaliser des tests clonaux multisites qui constituent aussi des outils précieux pour les études génétiques dont la mise au point de la sélection assistée par marqueurs. Une fois ces tests arrivés à maturité, les clones intéressants peuvent être "réactivés" et re-multipliés à une échelle plus importante en vue de la diffusion de variétés améliorées (directe ou en vergers à graines) ou d'une utilisation en amélioration. Certaines équipes intègrent déjà l'embryogenèse somatique à leurs programmes d'amélioration comme en Suède (Skogforsk pour *Picea abies*) et aux USA (Weyerheauser et Westvaco pour *Pinus taeda* et *Pseudostuga menziesii*). La vitesse de multiplication alliée au maintien de la juvénilité du matériel de base permet un raccourcissement des cycles d'amélioration-sélection (Högberg *et al.*, 1998).

Dans le cadre d'un déploiement commercial, l'embryogenèse somatique est appliquée avec succès à plusieurs cultures industrielles tropicales (café, hévéa, palmier à huile, banane, ananas). Chez les conifères, des déploiements commerciaux sont en place et en cours de développement:

- au Canada : Cellfor (tests clonaux au Chili, *Pinus taeda*, *Picea glauca*, *P. glauca engelmannii* , plus autres espèces) et J.D. Irving Ltd (*Picea mariana*, *P. glauca*).
- en Nouvelle-zélande: Carter Holt Harvey Ltd (*Pinus radiata*)
- en Irlande: Coillte Teoranta (*Picea sitchensis*)

Le potentiel économique de l'embryogenèse somatique (couplée au bouturage comme c'est le cas dans au moins deux cas concrets de déploiement commercial de résineux améliorés) est très important, comme nous l'avons démontré (paragraphe 2.3.5). De plus, cette technique permettra la diffusion de nouvelles variétés (clonales ou multiclonales) développées de manière accélérée, répondant précisément aux besoins industriels (en volume et/ou en qualité) et écologiques (adaptations aux conditions climatiques et de fertilité). Le gain de productivité sur les surfaces s'y prêtant au mieux (parcellaire, facilité d'accès…), permettra de mieux répondre à la demande de bois tout en permettant de modérer la pression sur les autres surfaces.

Techniquement, une production en routine à petite échelle est au point chez les épicéas et les mélèzes. De manière générale, les facteurs clés 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 pour *Pinus radiata, P. strobus* et *P. taeda,* les autres pins posent encore problème. C'est particulièrement vrai pour le pin maritime, comme l'ont montré diverses équipes ayant travaillé en parallèle à d'autres espèces du genre *Pinus* (INRA et partenaires du projet européen SEP). Les dernières années ont vu une nette amélioration du processus avec

la production d'un nombre croissant de plantes (AFOCEL: 20 en 1995, 150 en 1997, 600 en 1999, 3000 en 2002).

En France, **l'épicéa et le mélèze** sont donc prêts à être mis à l'épreuve d'un essai de déploiement à échelle pratique si la filière le jugeait intéressant.

Pour le **Douglas**, l'embryogenèse somatique a été testée à une échelle anecdotique mais suffisante pour indiquer un bon potentiel.

Pour le **pin maritime**, cas pour lequel l'intensité de la sylviculture et l'importance du marché du plant amélioré (national et international) pourrait motiver le plus d'efforts, des mises au point importantes restent à faire.

Chez les conifères, la perspective de pouvoir enfin disposer des biotechnologies comme l'embryogenèse somatique, laisse entrevoir de nombreuses retombées et applications. Méthode très performante de régénération, l'embryogenèse somatique s'avère aujourd'hui utile car elle constitue non seulement un outil de recherche mais aussi d'amélioration des espèces. Il semble nécessaire de susciter l'intérêt des améliorateurs et des professionnels comme les pépiniéristes et les forestiers. L'opinion des professionnels, utilisateurs potentiels (améliorateurs et sylviculteurs) permet de définir l'importance à accorder à ces recherches et de les orienter. Nous devons les convaincre de la valeur des plants produits par embryogenèse somatique en levant la suspicion associée au matériel *in vitro* afin d'éviter de passer à côté d'une technique d'avenir pour tous les acteurs de la filière bois. La question à laquelle nous sommes confrontés est de savoir si nous disposons de suffisamment de confiance, de dynamisme pour intégrer l'embryogenèse somatique ou si nous sommes en mesure de devoir encore attendre 10 ans.

4.2 Proposition

Afin de répondre plus rapidement et plus efficacement aux questions qui restent ouvertes, l'AFOCEL et l'INRA sont en train de préparer un **projet intégré de recherche en biotechnologie du pin maritime** optimisant les interactions entre l'amélioration classique et les domaines de recherche en biotechnologie (présentation prévue à l'été 2003). Ainsi, l'AFOCEL et l'INRA ont commencé à mettre en commun leurs expertises et s'engagent vers la mise en place d'expérimentations communes pour le pin maritime en développant les interactions entre génomique, transgenèse, embryogenèse somatique, techniques horticoles, sylviculture et amélioration.

Le protocole d'embryogenèse somatique n'étant pas encore abouti pour cette espèce, des recherches cognitives pour sa maîtrise s'avèrent nécessaires, à savoir l'étude et l'optimisation de :

- l'<u>initiation</u> de l'embryogenèse somatique à partir d'embryons zygotiques issus de familles sélectionnées: L'effort portera aussi sur la maîtrise de la multiplication des cultures embryogènes, la prolifération devant être absolument bloquée lors des étapes ultérieures notamment la maturation (antagonisme).
- la <u>maturation</u>, en particulier la synchronisation du développement des embryons somatiques cotylédonaires pour un rendement quantitatif et qualitatif élevé (*via* l'étude de facteurs peu étudiés jusque-là, y compris les interactions entre les traitements antérieurs et la capacité de germination). La conservation des embryons somatiques cotylédonaires (déshydratation, froid) devra être étudiée.
- la <u>germination et le développement des plants</u> pour obtenir *in fine* des plants de qualité prêts à l'acclimatation. Pour cela, il faut optimiser la composition et le conditionnement du

milieu de culture (gélification, support inerte) et supprimer la reprise de prolifération des cultures pour une bonne qualité de plant.

- l'acclimatation en tenant compte des particularités de ce matériel. Des plantations, de test et de démonstration, seront réalisées.

Enfin, l'optimisation de l'initiation de l'embryogenèse somatique à partir de matériel âgé (individus sélectionnés) constitue un axe de recherche important mais difficile car tout reste à faire chez le pin maritime. Cependant, nous nous appuierons sur l'expertise que l'AFOCEL a acquise en ce domaine sur l'épicéa.

Quant à la transgenèse, il nous faut encore mettre au point un système performant de transformation génétique des cultures embryogènes. Si l'utilisation ultérieure de la transgenèse comme outil de la caractérisation en laboratoire de gènes d'intérêt ne pose pas de problème particulier, les applications agronomiques sont beaucoup plus délicates à envisager. Nous proposons de diffuser une information sur la transgenèse en général et les réalisations nouvelles au niveau international en particulier. Nous ferons également le point sur l'impact environnemental (présence/absence et détection de traces d'ADN transgénique dans le sol, dans la pâte, dans le papier, etc.), tirant avantage des essais aux champs de peupliers transgéniques réalisés par nos deux instituts. Nous étudierons l'écobilan de divers scénarios de futures plantations transgéniques.

D'autre part, les interactions entre l'embryogenèse somatique et la génomique nous permettront de répondre à certaines interrogations soulevées par cette méthode de multiplication. Tout d'abord, l'utilisation de marqueurs moléculaires peut permettre de vérifier l'absence de variation somaclonale (et de détecter le cas échéant les facteurs qui permettent de les éviter) et d'assurer la traçabilité du matériel. Ensuite, il convient d'étudier la diversité génétique du matériel multiplié par embryogenèse somatique et vérifier l'absence de sélection qui risquerait de biaiser l'évaluation des performances du matériel propagé (manque de représentativité d'une descendance faussant les analyses de ségrégation par rapport aux parents). Assurer le maintien d'un niveau de diversité génétique suffisant est garant d'un bon potentiel d'adaptation aux fluctuations environnementales. Néanmoins, ce niveau peut varier fortement selon l'espèce, son mode de déploiement, la sylviculture appliquée et le contexte écologique. Enfin, la production de matériel végétal, via les plantations de test et de démonstration, peut être utile à la mise au point de la sélection assistée par marqueurs.

COMPTE RENDU DE LA REUNION DE PILOTAGE POUR DISCUSSION, VALIDATION DE L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUIVANTE :

Production de plants de résineux forestiers par embryogenèse somatique : Synthèse bibliographique et état d'avancement des recherches en France.

Gis Variétés Forestières Améliorées
(Convention DERF N° 61.45.37/01)

Une présentation succincte de cette étude bibliographique avait été faite lors de la réunion du GIS VFA (22 et 23 janvier 2003), étude qui était incomplète puisqu'il manquait la validation par un Comité de Pilotage.

C'est pourquoi, le 10 avril 2003, s'est déroulé à l'INRA d'Orléans la réunion du Comité de Pilotage du contrat INRA/DERF n°61.45.37/01. La date tardive de cette réunion est due à la difficulté de pouvoir trouver une date convenant à la majorité des participants.

Etaient présents à cette réunion : Messieurs ALAZARD Pierre (AFOCEL Sud Ouest), BASTIEN Jean-Charles (INRA-Orléans), BONNET-MASIMBERT Marc (Département FMN, INRA), HARVENGT Luc (AFOCEL Laboratoire de Biotechnologie), JAUBERTIE Jean-Pierre (Agriobtention), LEMONNIER Michel (Pépinière Lemonnier, représentant du syndicat des pépinièristes forestiers), LESGOURGES Yves (CRPF Aquitaine), LEZE Daniel (Forelite), PAQUES Luc (INRA Orléans, améliorateur), TRONTIN Jean-François (AFOCEL Laboratoire de Biotechnologie), VERGER Michel (INRA d'Orléans, améliorateur).
Et Mesdames GAUTHIER Alice (IDF), LELU-WALTER Marie-Anne (INRA Orléans), LE NET Isabelle (AFOCEL Laboratoire Economie et Compétitivité), MEVEL Christine (DERF), MONTES Patricia (INRA Orléans)

Se sont excusés de ne pouvoir venir : Messieurs GENTHIALON D. (SNPF), PASTUSZKA Patrick (INRA, Bordeaux), SARDIN Thierry (ONF) et Mesdames LEGAY Myriam (ONF), LEMOINE Marie-Claude (Agriobtention). Monsieur SANCEY Guy (Vilmorin), qui devait se joindre à ce Comité, n'a pu assister à la réunion.

Préalablement à la réunion, chaque participant avait reçu un résumé (18 pages) de l'étude bibliographique qui en comprenait près de 100, leur précisant que, sur demande, il pouvait leur être envoyé le document complet. Ce document sur l'embryogenèse somatique devait permettre d'orienter la discussion sur les thèmes suivants:

- Articulation avec les programmes d'amélioration.
- Articulation avec les autres techniques de diffusion du gain génétique : gain économique lié à l'intégration de l'embryogenèse somatique à l'amélioration et à la production des plants.
- Etat d'avancement des recherches en embryogenèse somatique des conifères en France.

Préambule

Les chercheurs qui développent l'outil "embryogenèse somatique" se doivent de répondre aux questions scientifiques qui leur sont posées comme celles concernant la "qualité" du matériel produit par la méthode. Ces chercheurs, cependant, ne peuvent se substituer aux autres acteurs (améliorateurs, professionnels, décideurs…) quant aux choix stratégiques : choix du matériel à multiplier, qui prend quoi en charge ? C'est aux utilisateurs potentiels de discuter et de décider de ces choix, les scientifiques développant l'outil embryogenèse somatique assurant le relais entre laboratoire et développement.

Ce préambule semblait nécessaire car une bonne partie de la réunion a porté sur des points qui n'étaient pas toujours du ressort et de la compétence des scientifiques responsables de la mise au point technique de l'embryogenèse somatique.

Remarques Générales du Comité de Pilotage

Le Comité de pilotage dans son ensemble, a convenu de l'intérêt évident de l'embryogenèse somatique comme outil de recherche (génomique, intégration à d'autres biotechnologies comme la transformation génétique) et de développement. Au regard de ce qui se fait dans le monde (voir le cas du pin radiata au Chili par exemple), il apparaît nécessaire de développer cet outil embryogenèse somatique pour pouvoir rester compétitif au niveau national et international (pin maritime, Y.Lesgourges). La volonté de recherche conjointe montrée par les deux équipes AFOCEL/INRA doit être aidée, les retombées économiques venant par après (Y.Lesgourges).

L'originalité qui fait l'attrait de cette technique est sans conteste la possibilité de pouvoir l'associer à la cryoconservation, ce qui ouvre des perspectives d'utilisation (maintien du caractère juvénile du matériel). Investir dans la mise en cryoconservation de génotypes en cours de testage est réalisable.

La critique essentielle de l'étude bibliographique a porté sur l'étude économique qui est apparue pour certains incompréhensible ou mal présentée. Cependant, il est souligné que, bien qu'imparfaite, elle était nécessaire ; ne pas l'avoir présentée aurait été source de reproches. La présentation a été retravaillée plusieurs fois sur base des remarques de quelques améliorateurs et sylviculteurs pour aboutir à une version très simplifiée (augmentation du prix de vente maximal des plants annulant le bénéfice apporté par le surplus de gain génétique exprimé en valeur).

Dans un premier temps, c’est surtout le résumé qui était mis en cause et non l’analyse elle-même : en effet, il n’était pas possible de détailler toutes les hypothèses et de faire une présentation des calculs dans le résumé. Or, aucun des membres du comité de pilotage n'a eu le temps de demander la version complète du rapport qui leur était proposée.

Dans un deuxième temps, il a été indiqué qu’il était sans doute possible d’affiner les calculs en relation avec certains acteurs de la production de plants dont les pépiniéristes.

La difficulté de l'analyse économique vient non pas de la méthode appliquée, qui, après une revue exhaustive de la littérature disponible en la matière, s’est fondée sur les critères traditionnels de l’analyse coûts-bénéfices, mais bien des données à partir desquelles l'analyse a été faite. Ces données ont été fournies principalement par les améliorateurs qui ont travaillé à la mise en place des vergers à graines et aident les pépiniéristes et marchands grainiers à produire le MFR de pin maritime. Ces données ont été complétées par les informations issues de projets de recherche comportant un volet de compilation des coûts réels et des temps de travail. Aussi l'étude économique peut être refaite sous réserve d'un accord entre professionnels concernés (pépiniéristes, gestionnaires de vergers, responsables de laboratoire de production et de recherche) quant aux données à prendre en compte. Il est fait remarquer que cette étude gagnerait à être réalisée pour une espèce pour laquelle l'embryogenèse somatique est maîtrisée, ce qui n'est à ce jour pas le cas du pin maritime (M. Bonnet Masimbert). Par ailleurs il faut bien distinguer que le problème économique se posera différemment pour celui qui plante et pour celui qui récolte (J.C. Bastien).

De plus, il faudrait pouvoir examiner cette question objectivement. Or, de nombreuses questions restent en suspens, rendant délicate la fixation de bien des paramètres influençant le retour financier de la sylviculture et de l'amélioration génétique. Ainsi, les hypothèses faites en la matière dans cette étude sont difficilement intégrées par le lecteur. Citons par exemple l'influence réelle de la durée de rotation (paramètre souvent considéré inchangé par rapport au schéma traditionnel bien que des variétés spécialisées puissent être cultivées en très courtes rotations), de la contractualisation incluant un paiement prenant en compte la qualité et donc le gain génétique (inexistante actuellement mais peut être en voie de concrétisation à moyen terme), de l'effet de la concurrence internationale pouvant faire évoluer l'intérêt porté au gain génétique (actuellement payé par les pépiniéristes et non les planteurs qui se voient offrir au fil du temps un niveau génétique croissant à prix constant), l'évolution de l'amélioration (détermination des gains génétiques effectifs en fin de rotation hors parcelles expérimentales en fonction du niveau d'amélioration et de la stratégie de multiplication, détermination des poids économiques des critères d'amélioration…).

Soulignons par ailleurs que les coûts réels des opérations de pépinière restent difficiles à connaître pour des raisons de confidentialité et, pour le bouturage par exemple, par l'absence de production commerciale actuelle permettant d'évaluer ces données sur une base concrète. De plus, l'essentiel des coûts est bien représenté par la main d'œuvre. Or, l'automatisation en cours dans le domaine de la manipulation des embryons, semis et boutures (la compagnie canadienne Cellfor et la société belge Cropdesign en sont deux exemples remarquables) pourrait changer la donne.
Les questions posées ont porté sur le matériel végétal produit par embryogenèse somatique et son utilisation, le coût de la méthode et les perspectives.

Matériel issu d'embryons somatiques

La question qui revient toujours est celle du comportement conforme des plants issus d'embryons somatiques …. Toutes les études qui ont été menées montrent, pour les traits pris en compte, une stabilité du matériel quant à ses caractères morphologiques (développement *in vitro :* maturation, germination) et sa croissance *ex vitro* (survie, hauteur, longueur branches latérales…).

Les acteurs (améliorateurs**,** professionnels) sont en attente de tests de démonstration à mettre en place ou à continuer à développer. Là encore pour être performant dans le message à faire passer, il faut bien prendre en considération l'interlocuteur auquel les tests seront destinés (scientifique ou technicien forestier, M.Lemonnier). Il apparaît donc urgent d'examiner ce qui a déjà été planté et faire de nouvelles plantations. La présentation de résultats très positifs de plantations de plusieurs parcelles, et même au sein d'un verger à graines, établies dans les années 80 avec du matériel issu de micropropagation (microboutures et microgreffes, boutures horticoles de pieds-mères issus de micropropagation) sera un premier pas.

L'embryogenèse somatique est une méthode de multiplication à l'identique. Le problème éventuel de la réglementation vis-à-vis de l'utilisation du matériel clonal issu d'embryons somatiques a été soulevé (D. Lezé). Le problème concerne plus le choix de départ des clones à multiplier, donc le matériel qui sera utilisé. A priori il n'y a pas trop d'inquiétude à avoir sur les problèmes réglementaires (J.C. Bastien), la réglementation devant suivre l'évolution des techniques(C. Mevel).

Indépendamment du coût, sous réserve d'absence de biais génétique (déjà démontré chez l'épicéa, cfr Passerieux *et al* 1999) et d'un comportement normal, les améliorateurs sont demandeurs de la mise en application de la méthode comme appui à l'amélioration. En effet, la cryoconservation des embryons somatiques permet de maintenir en collection à faible coût une population d'amélioration (ou une population sauvage remarquable) et repropager à l'état juvénile des individus sélectionnés à un âge avancé nécessaire à une évaluation précise de leurs performances en test clonal. Le potentiel élevé de multiplication de l'embryogenèse somatique permet de produire plus facilement et rapidement que les méthodes horticoles des copies des individus à tester en nombre plus élevé, permettant la mise en place de tests clonaux plus étoffés. De plus, on pourrait avoir plus souvent recours au test clonal sur les futurs géniteurs plutôt qu'aux tests de descendance qui se révèlent un peu moins performants (manque de précision) et plus coûteux (Lstiburek et Mullin, 2000; copie de poster en annexe). L'ensemble de ces avantages fait de l'embryogenèse somatique un outil puissant d'accélération des travaux de sélection.

Coût de la méthode

Une partie importante de la discussion a porté sur l'étude économique et le calcul du coût des plants produits par embryogenèse somatique. L'étude est apparue trop prématurée et pas essentielle, les coûts n'étant pas réels (L. Pâques). Il s'agissait en fait d'une simulation de coûts puisque aucune production commerciale n'existe en Europe. En utilisation directe, le prix des plants produits présente toujours un surcoût par rapport à des semis voire des boutures. L'association embryogenèse somatique/bouturage est certainement la voie la plus prometteuse

et viable quant à l'utilisation de cette biotechnologie. Les plants issus d'embryons somatiques servant à constituer les pieds mères de bouture, la multiplication par bouturage peut alors amortir le prix des plants produits (M. Verger). C'est bien ce qui est présenté dans le rapport au travers de deux exemples. Ce schéma est déjà effectif et mis en place en Irlande pour l'épicéa de Sitka (Coilte Teoranta) et en Nouvelle-Zélande pour le pin radiata.

S'en est suivi une discussion sur qui, public/privé, prenait en charge quoi ? La question du paiement du gain génétique par le sylviculteur au pépinièriste (basée sur la traduction du gain génétique en gain financier pour le sylviculteur) n'est pas naturelle dans le contexte français. Les recherches menées ne doivent pas rentrer dans le calcul du coût. Le secteur privé intervient pour le transfert de la méthode, pour développer et rentabiliser la technique. Qui prend alors en charge quoi ? Pour l'embryogenèse somatique, il faut regarder toutes les étapes et déterminer celles qui seront financées par le privé, le calcul du coût se faisant après (C. Mevel). Le choix dépend de contraintes parfois évidentes comme la nécessité de disposer d'un laboratoire de culture *in vitro* (cryoconservation, embryogenèse somatique). La prise en charge ou non de la gestion du parc à pieds mères peut être déterminante pour l'attractivité économique de la méthode. Si celle-ci est prise en charge par les pépiniéristes, alors il faudra intégrer son coût (M. Lemonnier). Mais la question ne se pose probablement pas selon les modalités habituelles : le relais de l'embryogenèse somatique par le bouturage horticole serait optimal dans le cas d'un remplacement des pieds-mères tous les 6 ou 12 mois, après seulement une année de bouturage (avec éventuellement une extension de la période de bouturage limitée classiquement à l'été par le forçage en serre des pieds mères). Il n'y aurait donc pas de parc à pieds-mères à maintenir et à gérer sur plusieurs années.

Conclusions et perspectives

Il est tout d'abord important de faire le point sur ce que l'on est capable de faire. Il faut aussi être conscient que les observations faites sur une espèce ne sont pas toujours transposables à une autre (L. Pâques). C'est pourquoi on ne peut s'affranchir de devoir refaire les essais, les tests à chaque nouvelle espèce travaillée.

Pour le mélèze hybride, des tests de démonstration sont à mettre en place mais avec du matériel amélioré (MA Lelu). Pour réaliser ce projet, des introductions à partir de la famille INRA H1 seront réalisées pour la première fois cette année (2003) afin de tester sa réactivité vis-à-vis de la méthode. Les cultures embryogènes obtenues seront cryoconservées (MA Lelu).

Il convient aussi de montrer la faisabilité de faire des pieds mères de boutures à partir de plants issus d'embryons somatiques (M. Verger). Les premières expérimentations en la matière sur le pin maritime sont en cours (projet européen SEP) alors qu'une production commerciale a commencé sur d'autres espèces (Sitka en Irlande, pin radiata en NZ).

Concernant le pin maritime, un partenariat entre l'AFOCEL et l'INRA est en cours de formalisation. Il porte sur les biotechnologies dont l'embryogenèse somatique. P. Alazard souligne l'intérêt pour la voie clonale de l'embryogenèse somatique, méthode qui devrait être optimisée d'ici 5 ans si le rythme des progrès actuels se maintient (10 plants produits en 1995, 100 plants en 1997, 2000 plants en 2002). Le bouturage d'embryons marche mieux que le

bouturage de semis (L. Harvengt). En tout état de cause, il faut bien intégrer la sécurité sanitaire (avoir des stocks en bon état) pour éviter les maladies. Il est nécessaire d'intégrer l'embryogenèse somatique dans les programmes d'amélioration du pin maritime, de tester les clones, famille par famille (JC Bastien).

Enfin, il conviendra de faire un nouvel état des lieux des différents coûts, avec un suivi notamment de ceux en laboratoire lorsqu'on pourra se placer dans une situation comparable à une pre-production commerciale pour établir une grille de coûts réellement utilisable. Mais le débat sur la valorisation financière du gain génétique reste entier.

Marie-Anne Lelu-Walter/Luc Harvengt

Bibliographie

Adams JM, Piovesan G, Strauss SH et Brown S 2002. The Case of Genetic Engineering of Native and Landscape Trees againts Introduced Pests and Diseases. Conservation Biology 16:4:874-879.

Ahtikoski A 2000. The profitability of scots pine and silver birch next-generation seed orchards in Finland. Ph D Thesis, *Faculty of Agriculture and Forestry, Department of Forest Economics*, University of Helsinki, Sweden, 189 p.

Alazard P 1992. Production de variétés améliorées de pin maritime en verger de pollinisation contrôlée. Dans: Proceedings du colloque *Production de variétés génétiquement améliorées d'espèces forestières à croissance rapide, AFOCEL, IUFRO,* Tome 2, pp 27-34.

Alazard P 1997. Des variétés de pin maritime améliorées pour la branchaison. Fiche information fôrêt 558:6.

Alazard P 2001. Gain génétique des graines issues de la première génération de vergers de Pin maritime. No 2 (Fiche 628):6.

Apiozola LA et Garrick DJ 2001. Breeding objectives for three silvicultural regimes of radiata pine. Revue canadienne de recherche forestière 31:4:654-662.

Apiozola LA et Greaves BL 2001. Why are most breeders not using economic breeding objectives? In IUFRO (éd) Proceedings of the Symposium Developing the Eucalyptus for the Future, Valdivia, Chile, 10 p

Arbez M et Green TE 2000. Ecological Impacts of Plantation Forests on Biodiversity and Genetic Diversity. Dans: Green TE (éd) Ecological and Socio-Economic Impacts of Close-to-Nature Forestry and Plantation Forestry: A comparative Analysis, EFI Proceedings, n°37, 2001: Instituto Superior de Agronomia - ISA. p. 7-20.

Becwar MR, Blush TD, Brown DW et Chesick EE 1991. Multiple paternal genotypes in embryogenic tissue derived from individual immature loblolly pine seeds. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 26, 37-44.

Bercetche J. et Pâques M. 1995. Somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster*). Dans: Somatic embryogenesis in Woody Plants vol.3, éds Jain S.M., Gupta P.K. Newton R.J., Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht, pp221-242.

Bercetche J., Reymond I. et Pâques M., 1993. Conversion des embryons somatiques de *Picea abies* en plantes : influence du support de culture. Annales. AFOCEL 1992, 5-28.

Boulay M (1987) Recherches préliminaires sur l'embryogenèse somatique *d'Eucalyptus gunnii*. Annales de Recherches Sylvicoles 1986, pp 23-37.

Bourgkard F et Favre JM (1989) L'embryogenèse somatique chez *Sequoia sempervirens*. Annales de Recherches Sylvicoles 1988, pp 83-95.

Bourgkard F et Favre JM (1992). Essai d'induction de l'embryogenèse somatique chez *Sequoia sempervirens*. Complément des Annales de Recherches Sylvicoles 1991, Biotechnologies appliquées aux arbres forestiers, pp. 25-46.

Borralho NMG, Cotterill PP et NKanowki PJ 1993. Breeding objectives for pulp production of Eucalyptus globulus under different industrial cost structures. Can J For Res 23:643-656.

Bradshaw HD et Strauss SH 2001. Breeding strategies for the 21st century: domestication of proplar. *In*: Dickmann DI, Isebrands JGT, Eckenwalder JE and Richardson J. (éds*)* Poplar Culture in North America., NRC Research Press, National Research Council of Canada, Ottawa, Canada. Part B, Chapter 14:383-394.

Brown C.L.et Gifford E.M., 1958. The relation of the cotyledons to root development of pine embryos grown *in vitro*. Plant Physiol. 33, 57-64.

Buford MA et Burkhart HE 1987. Genetic improvement effect on growth and yield of loblolly pine plantations. Forest Science 33:3:707-724.

Carlisle A et Teich AH 1978. Analyse du coût et des avantages des programmes d'amélioration des essences forestières. Unasylva 30:118-119:6 p.

Carlson W.C., Hartle J.E. 1995. Manufactured seeds of woody plants. In: Somatic Embryogensis in Woody Plants: Volume 1-History, Molecular and Biochemical Aspects, and Applications, (eds S.M. Jain, P.K. Gupta, R.J. Newton), Kluwer Academic Publishers, London, pp. 253-264.

Carson SD, Garcia O et Hayes JD 1999. Realized Gain and Prediction of Yield with Genetically Improved Pinus radiata in New Zealand. Forest Science 45:2:186-200.

Chaperon H. 1986. La culture du pin maritime en Aquitaine (livre). AFOCEL, page 105

Clark J 2000. The global wood market, prices and plantation investment: an examination drawing on the Australian experience. Environmental Conservation 28:1:53-64.

Costanza, R, d'Arge, R, de Groot, R, Farber, S, Grasso, M, Hannon, B, Limburg, K, Naeem, S, O'Neill, R, Paruelo, J, Raskin, RG, Sutton, P et MJ van den Belt 1997. The Value of the World's Ecosystem Services and Natural Capital. Nature, 387, 253-260.

Cotten L 1997. La spécialisation des itinéraires sylvicoles du Pin Maritime dans le Massif des Landes de Gascogne - Une opportunité technique et économique. Rapport de stage de fin d'études, ENGREF, 74 p.

CRC 2002. Partnership with Industry. Activity report 2001.

Cyr D.R. 1999. Cryopreservation of embryogenic cultures of conifers and its application to clonal forestry. In: Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Volume 4. Jain S.M., Gupta P.K., Newton R.J. (eds.). Kluwer Academic, Boston MA. pp. 239-261.

Cyr D.R. et Klimaszewska K. 2002. Conifer somatic embryogenesis: II. Applications. Dendrology, (sous presse).

Cyr D.R., Webster F.B., et Roberts D.R., 1991. Biochemical events during germination and early growth of somatic embryos and seed of interior spruce (*Picea glauca engelmanni* complex). Seed Sci. Res. 1, 91-97.

Cyr D.R., Lazaroff, W., Grimes S., Quan G., Bethune T., Dunstan D. et Roberts D. 1994. Cryopreservation of interior spruce (*Picea glauca engelmanni* complex) embryogenic cultures.

Cyr D., Attree S.M., El-Kassaby Y.A., Ellis D.D., Polonenko D.R., Sutton B.C.S. 2001. Application of somatic embryogenesis to tree improvement in conifers. In: Molecular Breeding of Woody Plants. Morohoshi N., Komamine A. (eds). Proceedings of the International Wood Biotechnology Symposium (IWBS), Narita, Chiba, Japan, 14-17 March 2001. Elsevier Science B.V. pp. 305-312.

Plant Cell Reports 13: 574-577.

DiFazio SP, Slavov GT, Burczyk J, Leonardi S et Strauss SH 2002. Gene flow from tree plantations and implications for transgenic risk assessment. Plantation Forest Biotechnology for the 21st Century (sous presse) C. Walter et M. Carson (éds.): Research Signpost, Kerala, India. Pp 10-30

Ellis D.D., McCabe D., McInnis S., Ramachandran R., Russel D.R., Wallace K.M., Martinell B.J., Roberts D.R., Raffa K.F. et McCown B.H. 1993. Stable transformation of *Picea glauca* by particle acceleration. Bio/Technology, 11, 84-89.

Feirer R.P., 1994. The biochemistry of conifer embryo developemnt: amino acids, polyamines and storage proteins. In S. Jain, P. Gupta and R. Newton (eds), Somatic Embryogenesis in Woody plants, Vol 1, Kluwer Academic Publishers (Dordrecht, The Netherlands). pp 317-336.

Filonova LH, Bozhkov PV et von Arnold S 2000a. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. J. Exp. Bot. 51, 343, 249-264.

Filonova LH, Bozhkov PV, Brukhin VB, Daniel G, Zhivotovsky B et von Arnold S 2000b. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. J. Cell Sci. 113, 24, 4399-4411.

Find J.I., Floto F., Krogstrup P., Moller J.D., Norgaard J.V. et Kristensen M.M.H. 1993. Cryopreservation of an embryogenic suspension culture in *Picea sitchensis* and subsequent plant regeneration. Scand.J.For.Res., 8: 156-162.

Fins L et Moore JA 1984. Economic Analysis of a tree improvement program for western larch. Journal of Forestry 84:11:675-679.

Galerne M. et Dereuddre J. 1987. Survie de cals embryogènes d'épicéa après congélation à -196°C. Annales AFOCEL, 7-33.

Graudal L et Kjær E 1998. Priorities and strategies for tree improvement. Présentation au Premier atelier régional de formation en conservation et l'utilisation durable des ressources génétiques forestières en Afrique de l'Ouest, Afrique Centrale et Madagascar, Ouagadougou, Burkina Faso 16-27 mars 1998, 17 p.

Green TE 2000. Ecological and Socio-Economic Impacts of Close-to-Nature Forestry and Plantation Forestry: A comparative Analysis. Dans Proceedings of the Scientific Seminar of the 7th Annual EFI Conference, Instituto Superior de Agronomia - ISA , September. 2000. Lisbon, Portugal: EFI Proceedings n°37:86-95.

Grossnickle S and Major J (1994a) Interior spruce seedlings compared with emblings produced from somatic embryogenesis. II. Stock quality assessment prior to field planting. Can J For Res 24:1385-1396.

Grossnickle S and Major J (1994b) Interior spruce seedlings compared with emblings produced from somatic embryogenesis. III. Physiological response and morphological development on a reforestation site. Can J For Res 24:1397-1407.

Grossnickle S, Major J and Folk R (1994) Interior spruce seedlings compared with emblings produced from somatic embryogenesis. I. Nursery development, fall acclimation, and over-winter storage. Can J For Res 24:1376-1384.

Grossnickle SC, Cyr D et Polonenko DR 1996. Somatic embryogenesis tissue culture for the propagation of conifer seedlings: A technology comes of age. Tree Planters' Notes 47:2:15 p.

Gupta P.K. et Durzan D.J., 1986. Plantlet regeneration via somatic embryogenesis from subcultured callus of mature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). *In vitro* Cell. Devel. Biol. 22, 685-688.

Gupta et Durzan 1987. Somatic embryos from protoplasts of loblolly pine proembryonal cells. Bio/Technology, 5, 710-712.

Gupta P.K., Durzan D.J. et Finkle B.J. 1987. Somatic polyembryogenesis in embryogenic cell masses of *Picea abies* (Norway spruce) and *Pinus taeda* (loblolly pine) after thawing from liquid nitrogen. Can.J.For.Res. 17: 1130-1134.

Gupta P.K., Timmis R., Timmis K., Carlson W., Grob J. et Welty E. 1994. Plantlet regeneration via of somatic embryogenesis in Douglas-fir (Pseudostuga menziesii). Dans: Proceedings, 1994, Biological Symposium Minneapolis, TAPPI press (Atlanta), pp. 35-40.

Häggman H, Jokela A, Krajnakova J, Kauppi A, Niemi K et Aronen T 1999. Somatic embryogenesis of Scots pine: cold treatment and characteristics of explants affecting induction. J Exp Bot 50, 341:1769-1778.

Hakman I. et von Arnold S., 1985. Plantlet regeneration through somatic embryogenesis in *Picea abies* (Norway spruce). J. Plant Physiol. 121, 149-158.

Hakman I., Fowke L.C., von Arnold S. et Eriksson T. 1985. The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). Plant Sci., 38, 53-59.

Hamalainen J.J., Jokinen K.J. 1992. Selection of Norway spruce somatic embryos by computer vision. In Proceedings: The International Society for Optical Engineering. DeShazer J.A., Meyer G.E. (eds.). SPIE Volume 1836, pp. 195-205.

Hargreaves CL, Smith DR, Foggo M et Gordon M 1997. Cryopreservation of zygotic embryos of *Pinus radiata* and subsequent plant regeneration. FRI Bulletin 203, 281-284.

Harvengt L 2000. Fiche technique Embryogenèse somatique du pin maritime. Document interne AFOCEL, 19 pages

Harvengt L, Bouvet A, Gastine F, Canlet F, Reymond I and Pâques M 1999. Field behaviour of 5 year-old Norway spruce somatic embryos. Forest Biotechnology '99. A Joint Meeting of: The International Wood Biotechnology Symposium, IUFRO Working Party 2.04-06 Molecular Genetics of Trees, Keble College University of Oxford, Oxford, United Kingdom July 11-16, 1999. Poster 18.

Högberg K.A., Ekberg I., Norell L. et von Arnold S. 1998. Integration of somatic embryogenesis in a tree breeding programme : a case study with *Picea abies*. Can. J. For. Res., 1536-1545.

Hubert C. et Bastien C. 1999. Gain génétique, risque économique, risque écologique : quels liens ? Rev. For. Fr., 4, 496-510.

Hünhn M. 1987. Clonal mixtures, juvenile-mature correlations and necessary number of clones. Silvae Gent., 36, 83-92.

Ibaraki Y 1999. Image analysis for sorting somatic embryos. *In* S. Jain, P. Gupta et R. Newton (éds), Somatic embryogenesis of woody plants, Vol. 4, Kluwer Academic Publishers (Dordrecht, Pays-Bas). p.p 169-188

Johnson GR, Wheeler NC et Strauss SH 2000. Financial feasibility of marker-aided selection in Douglas-fir. Can. J. For. Res. 30:12:1942-1952.

Joly P-B, Lemarié S et Marris C 2001. Analyse économique du développement des cultures à base d'organismes génétiquement modifiés aux Etats-Unis (synthèse). INRA-STEPE, INRA-SERD 11p.

Kartha K.K., Fowke L.C., Leung N.L., Caswell K.L., Hakman I. 1988. Induction of somatic embryos and plantlets from cryopreserved cell cultures of white spruce (*Picea glauca*). Journal of Plant Physiology 132, 529-539.

Kergoat PY 1999. Première approche de l'analyse du bénéfice de la stratégie de lutte contre la pyrale avec des mais transgéniques. 6 p.

Kjaer ED et Foster GS 2000. The Economics of tree improvement of teak (*Tectona grandis* L.). , Royal Veterinary and Agricultural University, Humlebaek, Denmark; USDA Forest Service, Huntsville, Al, USA, 17 p.

Klimaszewska K., Ward C et Cheliak B. 1992. Cryopreservation and plant regeneration from embryogenic cultures of larch (*Larix* x *eurolepis*) and black spruce (*Picea mariana*). J. Exp. Bot., 43: 73-79.

Klimaszewska K., Y. Devantier, D. Lachance, M.A. Lelu et P.J. Charest, 1997. *Larix laricina* (tamarack): somatic embryogenesis and genetic transformation. Can. J. For. Res., 27, 538-550.

Klimaszewska K, Park Y-S, Overton C, Maceacheron I et Bonga JM 2001a. Optimized somatic embryogenesis in *Pinus strobus* L. In Vitro Cell Dev Biol Plant 37, 392-399.

Klimaszewska K., D. Lachance, G. Pelletier, M.A. Lelu et A. Seguin 2001b. Regeneration of transgenic *Picea glauca*, *P. mariana*, and *P. abies* after cocultivation of embryogenic tissue with *Agrobacterium tumefaciens.* In Vitro Cell. Dev. Biol. 37, 748-755.

Konradova H, Lipavska H, Albrechtova J and Vreugdenhil D (2002) Sucrose metabolism during somatic and zygotic embryogeneses in Norway spruce: content of soluble saccharides and localisation of key enzyme activities. J Plant Physiol 159:4:387-396.

Kramer P.J. et Kozlowski T.T., 1979. Physiology of seeds and seedlings. In Physiology of woody plants, Academic press, N.Y.. pp 495-531.

Kriström B 1999. Valuing Forests. Working-Paper, Departement of Economics, Swedish University of Agricultural Sciences Vol 22, 33 p.

Lainé E., Bade P. et David A. 1992. Recovery of plants from cryopreserved embryogenic cell suspensions of *Pinus caribaea*. Plant Cell reports, 11: 295-298.

Lelu M.A. et C.H. Borman, 1990. Induction of somatic embryogenesis in excised cotyledons of *Picea glauca* and *Picea mariana.* Plant Physiol. Biochem., 28, 785-791.

Lelu M. A. et Pilate G. 2000. Transgenics in *Larix*. Dans : Molecular biology of Woody Plants, Vol. 2. Jain, M. and Minocha, S.C. éds. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 119-34.

Lelu M.A., M. Boulay et Y. Arnaud, 1987. Obtention de cals embryogènes à partir de cotylédons de *Picea abies* (L.) Karst. prélevés sur de jeunes plantes âgées de 3 à 7 jours après germination. C.R.Acad. Sci. Paris, t.305, Série III, 105-109.

Lelu M.A., M. Boulay et C.H. Borman, 1990. Somatic embryogenesis in cotyledons of *Picea abies* is enhanced by an adventitious bud-inducing treatment. New Forest, 4, 125-135.

Lelu M.A**.**, K. Klimaszewska et P. Charest, 1994. Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos and from cotyledons and needles of somatic plantlets of *Larix*. Can. J. For. Res. 24, 100-106.

Lelu M.A., Klimaszewska K., Pflaum G. et Bastien C. 1995. Effect of maturation duration on desiccation tolerance in hybrid larch (*Larix* x *leptoeuropaea* Dengler) Somatic Embryos. In Vitro Cell. Dev. Biol.

Lester DT et Libby WJ 1998. External evaluation of somatic embryogenesis for enhancing genetic gains from Britishc Columbia's tree breeding programs. 39 p.

Levée V., M.A. Lelu, L Jouanin, D. Cornu et Pilate G. 1997. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of hybrid larch (*Larix kaempferi* x *L. decidua*) and transgenic plant regeneration. Plant Cell Reports, 16, 680-685.

Levée V, Garin E, Klimaszewska K, Séguin A 1999. Stable genetic transformation of white pine (*Pinus strobus* L.) after cocultivation of embryogenic tissues with *Agrobacterium tumefaciens*. Mol Breed 5: 429-440.

Libby W.J. 1982. What is a safe number of clones per plantation ? Dans: Resistance to disease and pests in forest trees, Heybroek H.M., Stephan B.R. et von Weissenberg K. (éds), The Netherlands, pp. 342-360.

Libby W.J. 1987. Testing and deployment of genetically engineered trees. Dans: Cell and Tissue Culture in Forestry, Bonga J.M. et Durzan D.J. (éds), Martinus Nijhoff publ., Dordrecht, The Netherlands, pp. 167-197.

Lindgren D. 1993. The population biology of clonal deployment. Dans: Clonal Forestry I: Genetics and biotechnology, Ahuja M.R. et Libby W.J. (éds), Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 34-49.

Lowe WJ, Byram TD et Bridgewater FE 1999. Selection Loblolly pine parents for seed orchards to minimize the cost of producing pulp. Forest Science 45:2:213-216.

Lucier AA, Hinchee M et McCullough RB 2001. Biotechnology and the forest products industry. Dans: Strauss SH et Bradshaw HD (éds) Ecological and Societal Aspects of Transgenic Plantations, Proceedings of the First International Symposium, College of Forestry, Oregon State University, pp 57-61.

Macrae, S., Cotterill, P. et Brolin, A. 1999. An integrated approach to high yield high quality eucalypt wood fibre: conventional breeding, biotechnology and clonal forestry. Appita 52: 174–179

Mann CC et Plummer Ml 2002. Forest Biotech Edges Out of the Lab. Science 295:1626-1629.

Mariette S, Chagne D, Decroocq S, Vendramin GG, Lalanne C, Madur D et Plomion C 2001. Microsatellite markers for Pinus pinaster Ait. Ann For Sci 58, 203-206

Mo L.H. et von Arnold S., 1991. Origin and development of embryogenic cultures from seedlings of Norway spruce (*Picea abies*). J.Plant Physiol. 128, 297-302.

Najar M (1997) Produire en 35 ans des pins maritimes de plus de 1 m3 en lande humide : une réalité. No 3 (Fiche 554):6.

Nanson A 2000. Perspectives de l'amélioration génétique des arbres forestiers pour la production forestière. La Forêt Privée 254:Juillet-Août:63-71.

Norgaard J.V., Duran V., Johnson O., Krogstrup P., Baldursson S. et von Arnold S. 1993. Variations in cryotolerance of embryogenic *Picea abies* cell lines and the association to genetic, morphological and physiological factors. Can. J. For.Res., 23: 2560-2567.

Nunes PA, van den Bergh JC et Nijkamp P 2000. Ecological - Economic Analysis and Valuation of biodiversity Tinbergen Institute, 36p.

Ouédraogo A-S 1997. Conservation et utilisation des ressources génétiques forestières. Dans: FAO (éd) Proceedings du XI Congrès Forestier Mondial. Octobre 1997, Antalya, Turquie, pp 2-20

Owusu R-A 1999. GM technology in the forest sector. A scoping study for WWF, 34 p.

Paperstudies 2002. Commercialisation of forest biotechnology: Economic targets for enhanced global competitiveness of the U.S. pulp and paper industry. 2002:22-07-02.

Park Y.S., Pond S.E. et Bonga J.M. 1993. Initiation of somatic embryogenesis in white spruce (*Picea glauca*): genetic control, culture treatment effects, and implications for tree breeding. Theor. Appl. Gent., 86, 427-436.

Park Y.S., Pond S.E. et Bonga J.M. 1994. Somatic embryogenesis in white spruce (*Picea glauca*): genetic control in somatic embryos exposed to storage, maturation treatments, germination, and cryopreservation. Theor. Appl. Gent., 89, 742-750.

Park Y.S., Barrett J.D. et Bonga J.M. 1998. Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry: deployment, genetic control, and stability of cryopreserved clones. In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant 34: 231-239.

Passerieux E, Baud S, Dulieu H et Pâques M 1999. RAPD. Variation in a Norway Spruce Seedlot: Consequences of Somatic Embryogenesis. The Journal of Heredity 90, 6, 662-667. Roberds J.H. et Bisher J.W. 1997. Risk analyses in clonal forestry. Can.J.For.Res., 27, 425-432.

Peña L., Seguin A. 2001. Recent advances in the genetic transformation of trees. Trends in Biotechnology 19, 500-506.

Percy RE, Klimaszewska K et Cyr DR 2000. Evaluation of somatic embryogenesis for clonal propagation of western white pine. Can. J. For. Res. 30:12:1867-1876.

Plän T 1999. The economic valuation of biological diversity. Report of the Tropical Ecology Support Program, 137 p.

Plomion C, LeProvost G, Pot D, Vendramin GG, Gerber S, Decroocq S, Brach J et Raffin A, Pastuszka P 2001. Pollen contamination in a maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) polycross seed orchard and certification of improved seeds using cpSSR. Can J For Res 31, 1816-1825

Polonenko D. R. 1999. Challenges and issues in scaling commercial production of conifer somatic embryogenesis. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 35, 299-305.

Radojevic L, Alvarez C, Rodriguez R et Fraga MF 1999. Somatic embryogenic tissue establishment from mature *Pinus nigra* Arn. *ssp*. Salzmannii embryos. In Vitro Cell Dev Biol Plant 35, 3, 206-209.

Raleigh N 2000. Tree improvement research - Research Study Descriptions. 73.

Rausser G 1998. Deriving biodiversity option valeur within a model of biotechnolgy research and développement. Working Paper Series, U.C. Berkeley Law and Economics 9:1-20.

Rausser G et Small A 2000. Valuing research leads: bioprospecting and the conservation of genetic ressources. Working Paper Series, U.C. Berkeley Law and Economics 11:1-34.

Rege JEO 1999. Economic valuation of animal genetic resources. Proceedings of an FAO/ILRI Workshop, FAO Headquarters, Rome, Italy, 1517 March 1999, 76 p

Riera P 2001. Assessment of methodologies for valuing biological diversity of forests. Report to the Work Programme on the Conservation and Enhancement of Biological and Landscape Diversity in Forest Ecosystems, 1997–2000 of the Ministerial Conference on the Protection of Forests in Europe (MCPFE), Department of Applied Economics, Universitat Autònoma de Barcelona, on behalf of the European Forest Institute (EFI) 14 p.

Roberts D.R., Sutton B.C.S. et Flinn B.S. 1990. Synchronous and high frequency germination of interior spruce somatic embryos following partial drying at high relative humidity. Can. J. Bot., 68, 1086-1090.

Roberts D.R., Webster F.B., Flinn B.S., Lazarof W.R. et Cyr D.R., 1993. Somatic embryogenesis of spruce. Dans K. Redenbaugh (Ed.), Synseeds - Application of synthetic seeds to crop improvement, pp 427-450. CRC Press, Boca Raton, Fl., pp 427 - 450.

Roberts D.R., Webster F.B., Cyr D.R., Edmonds T.K., Grimes S.M.A., Sutton B.C.S. 1995. A delivery system for naked embryos of interior spruce. Dans: Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture. Aitken-Christie J., Kozai T., Smith M.A.L. (eds.) Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 245-256.

Ruaud JN, Bercetche J et Pâques M 1992. First evidence of somatic embryogenesis from needles of 1-year-old *Picea abies* plants. Plant Cell Reports 11, 563-566.

Sedjo RA 1997. The Forest Sector: Important Innovations. Ressource for the Future, Discussion Paper. p. 55.

Sedjo, R.A. (2001) The economic contribution of biotechnology and forest plantations in global wood supply and forest conservation, *In*: Strauss SH et Bradshaw HD (éds) Ecological and Societal Aspects of Transgenic Plantations, Proceedings of the First International Symposium,. College of Forestry, Oregon State University. pp. 29-46.

Shaw D.V. et Hood J.V. 1985. Maximizing per effort by using clonal replicate in genetic tests. Theor. Appl. Gent., 71, 392-399.

Simpson D, Sedjo R et Reid JW 1996. Valuing biodiversity for use in pharmaceutical research. Journal of Political Economy 104:1:163-185.

Strauss SH et Brunner AM 2002. Tree biotechnology in the 21st century: Transforming trees in the light of comparative genomics. (sous presse).

Sutton B. 2002. Commercial delivery of genetic improvement to conifer plantations using somatic embryogenesis. Ann. For. Sci., 59, 657-661.

Sutton BCS et Polonenko DR 1999. Commercialization of plant somatic embryogenesis. Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Netherlands, Vol 4, pp. 263-291.

Svobodova H, Albrechtova J, Kumstyrova L, Lipavska H, Vagner M and Vondrakova Z (1999) Somatic embryogenesis in Norway spruce: Anatomical study of embryo development and influence of polyethylene glycol on maturation process. Plant Physiology and Biochemistry 37:3:209-221.

Talbert JT, Weir RJ et Arnold RD 1985. Cost and benefit of Mature First-Generation Loblolly pine tree Improvement program. Journal of Forestry 3:95:162-165.

Timmis R. 1998. Bioprocessing for tree production in the forest industry: conifer somatic embryogenesis. Biotechnology Progress 14, 156-166.

Timmis R et Ghermay T 1997. Liquid culture morphology related to embryio yield in Douglas fir. Dans: Abstracts of Joint meeting of IUFRO working parties 2.04-07 and 2.04-06 Somatic Cell Genetics and Molecular Genetics of Tree, Québec, Canada, 12-16 Août 1997, abstract n°74.

Trontin JF, Harvengt L, Garin E, Lopez-Vernaza M, Arancio L, Hoebeke J, Canlet F et Pâques M 2002. Towards genetic engineering of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). Annals of Forest Science, 59, 687-697.

Trontin JF et Harvengt L 2002 Les plantations d'arbres génétiquement modifiés : une stratégie envisageable pour les approvisionnements en bois de demain ? Fiche Information Forêt n°3-2002: 653.

UE 2001. Sciences du vivant et biotechnologie – Une stratégie pour l'Europe. 40p .

Virchow D 1999. Economic value of genetic resources: an agenda for research. AgBiotechNet 1:6 p.

Wagner JE et Holmes TP 1999. Estimating economic gains for landowners due to time-dependent changes in biotechnology. Forest Science 45:2:163-170.

Walter C, Grace LJ, Wagner A, White DWR, Walden AR, Donaldson SS, Hinton H, Gardner RC, Smith D R. 1998. Stable transformation and regeneration of transgenic plants of *Pinus radiata* D. Don. Plant Cell Rep 17, 460-468.

Wescott R.J., 1994. Production of embryogenic callus from non embryogenic explants of Norway spruce *Picea abies* (L.) Karst. Plant Cell Rep. 14, 47-49.

Williams CG et deStieguer JE 1990. Value of production orchards based on two cycles of breeding and testing. Forest Science 36:1:156-168.

Wright BD 1991. Valuation of biological diversity conserved *in-situ*.

Yanchuk AD 2001. The role and implications of biotechnological tools in forestry. Unasylva 204:52:53-61.

Zhang C, Timmis R et Hu WS 1999. A neural network based pattern recognition system for somatic embryos of Douglas fir. Plant Cell Tissue Org. Cult. 56, 25-35.

Annexe

Lstiburek et Mullin, 2000; poster

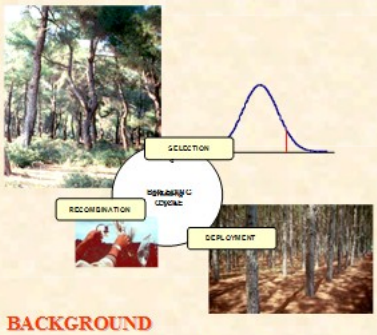
NC STATE UNIVERSITY

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

M. Lstiburek and T. J. Mullin

Department of Forestry, College of Natural Resources, North Carolina State University, Raleigh, NC

mlstibu@unity.ncsu.edu tim_mullin@ncsu.edu



BACKGROUND

Long-term **forest tree breeding** is a series of recurrent breeding and selection cycles.

Progeny testing with a pollen mixture (**polycross**) is commonly used to determine breeding values for "**backward selection**" of breeding parents. For many tree species, offspring of breeding parents can be propagated vegetatively by rooted cuttings or other cloning methods. Could such techniques for **clonal replication** of test offspring allow more effective "**forward selection**", and thus eliminate the need for progeny testing?

METHODS

We approached this question by **stochastic simulation** using **POPSIM** (Mullin and Park, 1995). Our simulation began with a breeding population of 360 founder genotypes (Table 1). This population was subdivided into 20 breeding groups (**sublines**) and cycled through 5 discrete generations of breeding, testing and selection.

Additive, dominance and environmental effects for each phenotype were drawn randomly from normal distributions of among-family and within-family effects. Population parameters were based on genetic variances for volume production in Norway spruce.

Positive assortative mating was used to generate 20 full-sib families per subline (360 in total) as candidates for the next cycle. One tree per family was selected, keeping the size of breeding population constant. The best 18 individuals were grafted to a **seed orchard** to produce seed for commercial plantations.

Grafted orchards produce improved seed for **plantations**

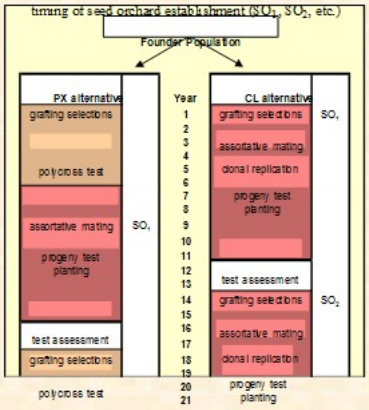
In each cycle, breeding values were evaluated for the purpose of assortment of parents for mating and for selection of best parents to the seed orchard. Two alternatives were evaluated for estimation of breeding values (Table 1):

Polycross (PX) - Breeding values of selected trees estimated by **progeny testing with a polycross.**

Clonal replicates (CL) – Breeding values estimated based on mean performance of **clonally replicated candidate genotypes.**

To make the comparison fair, family sizes and number of clonal replicates were optimized, and program resources were fixed. The schedule of operations used Norway spruce as a model. **Status effective number** (Lindgren et al. 1996) was used to monitor increase in average relatedness among seed orchard parents.

Table 1. Schematic description of **PX** and **CL** alternatives and timing of seed orchard establishment (SO_1, SO_2, etc.)



RESULTS

While both alternatives offered similar amounts of genetic gain after 5 breeding cycles, shorter cycle length and earlier seed orchard establishment resulted in **substantially more gain per year from the CL strategy** (Figure 1).

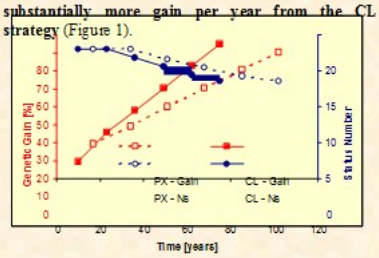


Figure 1. Genetic gain and status number (Ns) in seed orchards over 5 cycles of breeding, testing and selection

Restrictions on selection of **relatives** resulted in similar average relatedness among seed orchard parents after each cycle.

A comparison of both alternatives was made at year 75 (Figure 2) for varying levels of **program resources** for genetic testing. These results indicate that the superiority of the **CL** alternative is **not sensitive** to the amount of investment into the assessment of parental breeding values.

The **CL** alternative was more profitable even when cloned propagules are more expensive than seedlings.

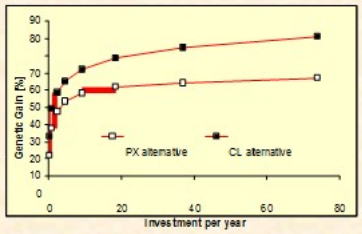


Figure 2. Genetic gain in seed orchard in year 75 as a function of investment per year

Varying genetic parameters revealed that the relative superiority of **CL** alternative was **little affected by narrow-sense heritability**. The presence of **dominance variance** reduced the benefit of the **CL** alternative, but had no impact on the gains from the **PX** method.

CONCLUSION

For many forest tree species, assessment of parental breeding values based on phenotypic means of clonally replicated genotypes is likely more efficient than polycross progeny testing. This conclusion is applicable, even when clonal propagation is expensive.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors acknowledge financial support from Föreningen Skogsträdsförädling (Swedish Tree Breeding Association) and the North Carolina State University–Industry Cooperative Tree Improvement Program. Our thanks go to Dr. Dag Lindgren for his valuable comments.

LITERATURE

Lindgren D., Gea L. D. and Jefferson P. (1996). "Loss of genetic diversity monitored by status number." Silvae Genetica 45: 52-59.

Mullin T. J. and Park Y. S. (1995). "Stochastic Simulation of Population Management Strategies for Tree Breeding: a New Decision-Support Tool for Personal Computers." Silvae Genetica 44(2-3): 132-141.