

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

## *Somatic embryogenesis of conifers : a way to produce trees for afforestation*

M.A. LELU<sup>1</sup>, D. THOMPSON<sup>2</sup>

**1** INRA, Unité Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières  
Avenue de la pomme de pin, BP 20619 Ardon, 45166 Olivet Cedex  
Tél : 02 38 41 78 00 • Fax : 02 38 41 48 09 • Email : lelu@orleans.inra.fr

**2** Coillte Teoranta, The Irish Forestry Board, Research Laboratory,  
Newtownmountkennedy, Country Wicklow, Irlande  
Tél : 353 1281 9493 • Fax : 353 1281 0465 • Email : david.thompson@coillte.ie

**Résumé :** Parmi les techniques de culture *in vitro*, l'embryogenèse somatique est potentiellement la méthode de régénération la plus performante pour la propagation clonale d'arbres forestiers du fait de son taux de multiplication élevé. Chez les conifères, l'intérêt de cette technologie pour l'amélioration génétique et la conservation des ressources génétiques est indéniable. La cryoconservation des cultures embryogènes (dans l'azote liquide à  $-196^{\circ}\text{C}$ ) laisse entrevoir la possibilité de disposer à volonté de matériel juvénile. L'embryogenèse somatique représente aussi un outil de développement en foresterie. De fait, cette technologie est déjà utilisée à l'échelle industrielle pour les épicéas et différents pins au Canada, aux USA et en Nouvelle Zélande.

**Mots clés :** embryogenèse somatique, conifères, amélioration, cryoconservation, développement

**Abstract :** *Somatic embryogenesis is recognised as potentially the most efficient in vitro culture technique for clonal propagation of forest trees due to its high multiplication rate. In conifer species, this technology is very useful for breeding and genetic resources conservation programmes. Embryogenic cultures can be stored indefinitely in liquid nitrogen at  $-196^{\circ}\text{C}$  (cryopreservation), without loss of juvenility. Somatic embryogenesis can be used also for large scale production of superior quality forest trees, as demonstrated at an industrial level in Canada, the USA and New Zealand.*

**Keywords :** *somatic embryogenesis, conifers, breeding, cryopreservation, mass propagation*

# 1 Introduction

---

Du matériel forestier amélioré est disponible en France et en Europe mais en quantité parfois insuffisante pour répondre aux besoins des sylviculteurs. Cela est partiellement dû à des difficultés de propagation en masse par graines et/ou boutures. Des méthodes de micropropagation ont été développées pour la production rapide et en grande quantité de plants génétiquement améliorés. Parmi les techniques de culture *in vitro*, l'embryogenèse somatique est potentiellement reconnue comme la méthode de régénération la plus performante pour la propagation clonale d'arbres forestiers. Désormais la question qui se pose est : sommes-nous prêts à l'intégrer dans les programmes forestiers en Europe ? La réponse est clairement non car il nous reste à l'évaluer en tant que méthode de production de plants forestiers.

A ce jour, l'embryogenèse somatique est plus perçue comme une aide aux programmes d'amélioration que comme une méthode de propagation en masse de matériels améliorés. Cette situation résulte entre autres de la méconnaissance des potentialités de cette méthode de régénération végétative par les professionnels. Il est donc nécessaire de faire le point sur l'état d'avancement des travaux et les applications réalisées à ce jour de par le monde en matière d'embryogenèse somatique.

## 2 Qu'est-ce que l'embryogenèse somatique ?

---

Lors de la reproduction, a lieu la fusion d'un gamète mâle et d'un gamète femelle donnant lieu à la formation d'un zygote qui se développe ensuite en embryon selon une séquence d'événements nommée embryogenèse. Or, chez les plantes, il existe une embryogenèse non zygotique qui implique toutes les étapes du développement d'un embryon mais sans qu'aucune fusion gamétique soit impliquée. L'embryogenèse est appelée somatique quand l'embryon est formé à partir des cellules issues du soma, par opposition aux cellules du germe ou sexuelles. Le nouvel individu possède alors le même génotype que celui de la plante mère. Ces embryons somatiques poursuivent leur développement pour germer et produire des plants identiques qui constituent donc un clone.

L'embryogenèse somatique a été initialement développée comme méthode de multiplication végétative. En effet, de toutes les techniques de culture *in vitro*, elle conduit sans aucun doute au taux de multiplication le plus élevé. D'autre part, l'embryon somatique est une structure bipolaire qui développe simultanément un pôle racinaire et un pôle caulinaire opposés. Ainsi, par rapport à l'enracinement de bourgeons (axillaire ou adventif) l'obtention de plants par embryogenèse somatique est plus rapide puisqu'il n'existe pas d'étape d'enracinement proprement dite.

L'embryogenèse somatique représente donc une technique de multiplication végétative clonale permettant la production rapide et illimitée de plants génétiquement identiques.

Voilà 15 ans, Hakman *et al.* (1985) décrivaient pour la première fois l'embryogenèse somatique chez un gymnosperme, l'épicéa commun (*Picea abies*). Depuis, ce processus a été obtenu pour de nombreux conifères regroupant 9 genres représentés par 34 espèces (Attree et Fowke, 1993). Chez les conifères, les recherches entreprises en embryogenèse somatique ont connu un très rapide développement du fait de ses nombreux intérêts et applications (propagation en masse, cryoconservation, transformation génétique...). Les travaux en cours aboutissent à une meilleure compréhension de ce processus de régénération permettant sa mise au point technique pour un certain

nombre de conifères dont *Picea abies*, *P. glauca*, *P. glauca engelmannii*, *P. mariana*, *Pinus strobus* et *Larix sp.* (cf Photos n°1 et 2).



Photo n°1 : Embryons somatiques cotylédonnaires de mélèze hybride



Photo n°2 : Plants acclimatés de mélèze hybride obtenus par embryogenèse somatique

## 3 L'embryogenèse somatique : pour quoi faire ?

---

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<sup>1</sup>. Par ailleurs, disposer d'un système fiable et efficace de régénération, c'est-à-dire reproductible et performant par le nombre de plants régénérés, est un pré-requis aux études de la fonctionnalité de gènes *via* la transformation génétique. Pour les conifères, l'embryogenèse somatique représente la seule technique de régénération en culture *in vitro* à ce jour disponible.

L'embryogenèse somatique constitue aussi un outil d'amélioration des espèces et de développement en foresterie, points que nous allons développer ci-dessous.

### 3.1 Aide aux programmes d'amélioration

L'embryogenèse somatique, dont l'intégration dans les programmes d'amélioration commence à être étudiée (Högberg *et al.*, 1998), offre à l'améliorateur d'une espèce forestière une méthode particulièrement performante pour deux principales raisons :

- Multiplication rapide et en masse de génotypes produits par croisements contrôlés en vue de leur évaluation sur le terrain. C'est en disposant d'un nombre important de copies d'un même individu qu'on estime avec une meilleure précision sa valeur génétique. 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, ou l'épicéa), nécessite un délai d'au moins 4 ans ; grâce à l'embryogenèse

---

<sup>1</sup> capacité de toutes les cellules à régénérer une plante entière

somatique ce délai est réduit de moitié. Cependant, les plants produits par embryogenèse devront être testés au même titre que des plants issus de semis.

- Conservation de la juvénilité. 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 avec une bonne faculté d'enracinement. 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  $-196^{\circ}\text{C}$  sans changement de leurs caractéristiques physiogénétiques originelles, et notamment leur forte aptitude à la régénération liée à la juvénilité. Ainsi, la cryoconservation assure à l'utilisateur de disposer à volonté et pour toujours du matériel le plus juvénile qui soit. La cryoconservation, permettant la conservation des ressources génétiques, entraînera une réduction substantielle des coûts de gestion du matériel (temps, espace) 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.

Ainsi l'embryogenèse somatique, de par ses nombreux avantages, s'avère un outil performant pour le développement des programmes d'amélioration (cf Figure n°1). Associée à la cryoconservation, la perspective de conservation à long terme des ressources génétiques est de plus envisageable.

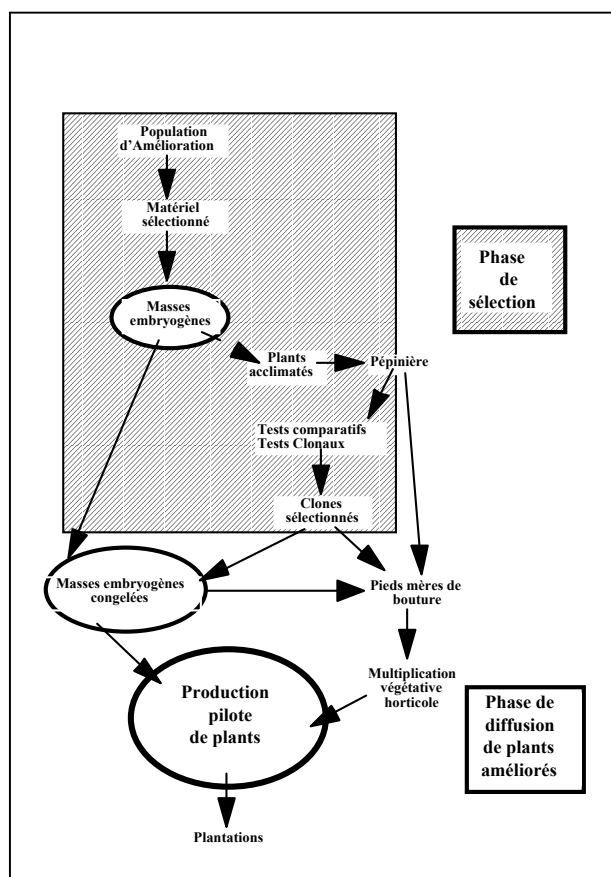


Figure n°1 : Embryogenèse somatique : intégration dans un programme d'amélioration, pour la fabrication de variétés multiclonaux et la diffusion de plants améliorés

## 3.2 Diffusion de plants forestiers génétiquement améliorés

Le système idéal de multiplication végétative aurait les caractéristiques suivantes : il serait indépendant du génotype et de l'âge de la plante, aurait un taux de multiplication élevé et uniforme, serait disponible et utilisable à long terme et avec un faible coût de production. Comparée au bouturage, l'embryogenèse somatique se révèle plus intéressante pour son taux de multiplication potentiellement bien supérieur et la possibilité de cryoconserver les cultures embryogènes. Par contre son point faible est son coût de production qui reste actuellement 3 à 4 fois supérieur à celui de semis (cf Tableau n°1).

	<b>Bouturage</b>	<b>Embryogenèse Somatique</b>
<b>Caractéristiques :</b>		
Taux de multiplication	modéré	élevé
Utilisation/espèce/génotype	large (?)	limité (?)
Utilisation/âge matériel	limité <sup>a</sup>	limité <sup>b</sup>
Conservation	piets-mères	cryoconservation
Développement	modéré	large
<b>Coûts :</b>		
/semis	2-3 fois	3-4 fois
pour produire 1 plant		0.18 €
pour repotage, élevage		0.10 €
Total pour 1 plant au champ		0.28 €

Tableau n°1 : Comparaison des caractéristiques et des coûts de production de plants résineux forestiers obtenus par bouturage et embryogenèse : exemple de plants d'épicéa de sitka

**a** : problème d'enracinement, de plagiotropie.

**b** : en général à partir de graine, au plus des aiguilles de plants âgés de 3 ans.

Par ailleurs, existe toujours cette réticence liée à du matériel produit par la 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 (cf Tableau n°2) afin d'étudier la croissance, le comportement au champ des plants produits par embryogenèse somatique (uniformité, conformité). A ce jour, des études faites à partir de plants obtenus par embryogenèse somatique, il n'a pas été constaté de comportements anormaux de ce matériel comparé à des semis ou à des boutures (Grossnickle et Major, 1994a, b ; Grossnickle *et al.*, 1994).

L'utilisation de l'embryogenèse somatique dans un but de production de plantes à l'échelle industrielle requiert une meilleure compréhension et contrôle du processus et le développement d'essais de pré-production à grande échelle en utilisant du matériel amélioré. Les améliorateurs et les partenaires industriels 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.

Pays	Sociétés	Année	Test	Espèce
<b>Tests clonaux</b>				
Canada	B.C.R. Inc	1993/96	2.000 lignées cryoconservées	<i>Picea glauca engelmannii</i>
		1994/98	1.400 tests clonaux	
		1994	600 lignées cryoconservées	<i>Picea sitchensis</i>
		1997	400 tests clonaux	
	Irving Inc.		300 lignées cryoconservées	<i>Picea glauca, P. mariana, P. abies</i>
	Silvagen Inc.	1998	600.000 plants	<i>Picea glauca engelmannii, P. glauca, P. sitchensis</i>
Nlle Zélande	Carter Holt Harvey		20.000 lignées cryoconservées	<i>Pinus radiata</i>
USA	Westvaco		x <sup>a</sup> plants	<i>Pinus taeda</i>
	Weyerhauser	1993	x <sup>a</sup> plants	<i>Pseudotsuga menziesii</i>
<b>Production commerciale</b>				
Canada	Silvagen Inc.	1997-98	500.000	<i>P. glauca engelmannii</i>
		Futur	1-3 millions	

Tableau n°2 : Pré-développement de l'embryogenèse somatique des conifères : cryoconservation, tests clonaux et production commerciale réalisés  
a : données non disponibles

Au Canada, Etats-Unis, Nouvelle-Zélande, de nombreuses compagnies privées (Silvagen, Westvaco, Weyerhauser, BCR Inc.) 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). En 1998, Silvagen a produit 600.000 plants de *Picea glauca*, *P. glauca engelmannii* et *P. sitchensis* (cf Tableau n°2). Ces sociétés privées se livrent actuellement à une véritable guerre commerciale comme l'illustrent les brevets qui sont déposés par les trois grands concurrents que sont Silvagen, Westvaco et Weyerhauser. 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 développés (*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 plus du domaine «confidentiel» (quelques centaines voire milliers de plants). Il serait donc intéressant de réaliser une production pilote de plants forestiers de résineux par embryogenèse somatique (de 10.000 à 50.000 plants) afin d'évaluer les problèmes inhérents à cette production et d'estimer les coûts de production. Cela permettrait d'évaluer, sur le plan technique et financier, les limites et la faisabilité de l'embryogenèse somatique en tant que méthode de multiplication végétative. Le cas échéant, les plants issus d'embryons somatiques pourraient servir de pieds-mères pour la production de boutures (cf Photo n°3).



*Photo n°3 : Plants de mélèze hybride, obtenus par embryogenèse somatique, pouvant servir de pieds-mères pour la production de boutures*

## 4 Conclusion

---

Chez les conifères, les perspectives de pouvoir enfin disposer des biotechnologies comme l'embryogenèse somatique, laissent entrevoir de nombreuses retombées et applications. Méthode très performante de régénération, l'embryogenèse somatique constitue non seulement un outil de recherche (étude fonctionnelle des gènes) mais aussi d'amélioration des espèces. En foresterie, elle assure la multiplication clonale d'espèces forestières productrices entre autres de fibres papetières.

Aussi devons nous susciter l'intérêt des professionnels comme les pépiniéristes, les forestiers, et les convaincre de la valeur des plants produits par embryogenèse somatique en levant la suspicion associée au matériel *in vitro* au risque 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 commercialiser ce processus d'embryogenèse somatique ou si nous sommes en mesure de devoir encore attendre 10 ans ?...

## Bibliographie

---

Attree S.M., C. Fowke L., 1993, Embryogeny of gymnosperms : advances in synthetic seed technology of conifers, *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 35, 1-35

Grossnickle S.C., Major J.E., 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.C., Major J.E., 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.C., Major J.E., Folk R.S., 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

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

Högberg K.A., Ekberg I., Norell L., von Arnold S., 1998, Integration of somatic embryogenesis in a tree breeding programme : a case study with *Picea abies*, *Can. J. For. Res.*, 24, 1536-1545

Park Y.S., Barrett J.D., Bonga J.M., 1998, Applications of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry : deployment, genetic control, and stability of cryopreserved clones, *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 34, 231-239

Polonenko D.R., 1999, Challenges and issues in scaling commercial production of conifer somatic embryogenesis, *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 35, 299-302

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