



—INFO—



## L'embryogenèse somatique : une méthode de multiplication végétative du pin maritime pour demain ?

*FCBA et l'INRA ont engagé des recherches il y a maintenant près de 20 ans pour développer une méthode de multiplication végétative performante du pin maritime. Ses applications dans le programme d'amélioration génétique seraient multiples, depuis la gestion durable des ressources génétiques jusqu'à la sélection plus efficace des meilleures variétés et leur déploiement facilité dans les plantations. Suite aux développements pionniers chez l'épicéa auxquels FCBA a contribué (années 80, Afocel) et comme chez la plupart des autres conifères, c'est le processus d'embryogenèse somatique à partir de graines immatures couplé à la cryoconservation des embryons somatiques obtenus qui offre actuellement les meilleures perspectives pratiques. Des progrès importants ont été obtenus pour la maîtrise de cette technologie, particulièrement depuis la mise en place en 2004 (et continue depuis) d'une collaboration spécifique sur ce thème entre les équipes « Biotechnologie & Sylviculture Avancée » de FCBA et « Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières » de l'INRA. Nous faisons ici un bilan des avancées majeures à différentes étapes de l'embryogenèse somatique jusqu'à la mise en place d'essais au champ en cours d'évaluation. Nous portons également un regard sur les verrous techniques et les contraintes socio-économiques qu'il faudrait lever pour amener cette technologie prometteuse à franchir les portes de l'application pratique.*

### La multiplication végétative : un outil précieux en amélioration génétique

Lorsqu'elles sont maîtrisées, les techniques de multiplication végétative (clonage) sont un atout pour l'amélioration génétique car elles permettent d'accéder à la sélection individuelle (tests clonaux) plutôt qu'uniquement familiale (tests de descendances). La plus grande efficacité de la sélection qui en résulte (utilisation de toute la variance génétique disponible, héritable et non héritable) permet d'optimiser les gains génétiques à chaque cycle d'amélioration ce qui en fait un avantage énorme pour les espèces à maturité sexuelle tardive comme les arbres forestiers. Par ailleurs cette capacité à réaliser des copies végétatives d'arbres sélectionnés facilite la mise en place des vergers de conservation des ressources génétiques (parcs à clones) ou de production des nouvelles variétés (vergers de clones). Il est également possible d'envisager une sylviculture « multivariétale » via le déploiement de variétés polyclonales composées d'un assemblage de génotypes testés répondant le mieux aux objectifs de production (optimisation du gain génétique) pour un niveau de diversité génétique déterminé (choisi) dans les plantations. Cette plus grande souplesse et précision dans la création variétale est particulièrement souhaitable pour adapter les nouvelles variétés à la demande et augmenter leur « résilience » aux aléas environnementaux (changement climatique, maladies, insectes, etc.).

### La culture *in vitro* : un outil pour restaurer des capacités de multiplication végétative

Une telle stratégie est déjà à l'œuvre chez le peuplier pour lequel il n'y a pas de problème de multiplication végétative des arbres sélectionnés. Les variétés actuellement mises sur le marché sont effectivement produites chez les pépiniéristes par bouturage horticole classique (plançons). Cependant chez beaucoup d'espèces forestières et la plupart des conifères la récalcitrance des arbres matures au bouturage est un phénomène récurrent en lien avec le vieillissement ontogénétique (ou changement de phase depuis le stade juvénile jusqu'aux stades adultes végétatif et reproducteur). Il est souvent possible de restaurer des capacités organogénétiques perdues (vigueur juvénile, capacité d'enracinement des boutures, caractères morphologiques juvéniles, etc.) par des techniques de taille associées ou non avec des traitements hormonaux, de bouturage ou de greffage en cascade. Mais ces conditionnements *ex vitro* sont généralement longs et leur succès aléatoire (faible reproductibilité). L'apport des biotechnologies et en particulier de la culture *in vitro* a été déterminant dans beaucoup de situations. Cette culture d'explants (apex, bourgeons, méristèmes, fragments de tiges, feuilles, etc.) en conditions artificielle, axénique et miniature (*in vitro*) autorise un meilleur contrôle des paramètres environnementaux. Il est alors souvent

possible de revigorer voire rajeunir des arbres adultes qui récupèrent alors, au moins partiellement ou transitoirement, des capacités de multiplication végétative. C'est le cas par exemple pour les variétés d'eucalyptus résistantes au froid sélectionnées par FCBA (*E. gunnii*, *E. gundal*) qui bénéficient de l'appui du microbouturage pour produire des pieds-mères à forte valeur ajoutée pour la production de plants par bouturage chez les pépiniéristes (têtes de clones).

## L'embryogenèse somatique (ES) : vers un support performant pour la multiplication végétative du pin maritime

Chez le pin maritime, la multiplication végétative d'arbres sélectionnés est actuellement limitée au greffage horticole. Le bouturage reste très difficile. Si le greffage est utilisé en routine dans le programme d'amélioration pour installer des parcs à clones (mise en collection) ou certains vergers de production (vergers de clones), son utilisation en sélection (tests clonaux) doit prendre en compte l'effet intrinsèque du porte-greffe sur l'évaluation des caractères du greffon. La recherche d'une technique de production de copies végétatives « entières » (sur leurs propres racines) mobilise de gros efforts tant à FCBA qu'à l'INRA depuis plus de 20 ans. Microgreffage de méristèmes et/ou microbouturage *in vitro* sont des techniques explorées à FCBA avec succès pour rajeunir et obtenir des copies d'arbres matures (Dumas et Monteouis 1995, Trontin *et al.* 2004) mais leur efficacité est trop faible (taux de multiplication d'environ 1,2 par mois) pour envisager des applications autres qu'en recherche. C'est l'avènement dans les années 80 d'une technique de bouturage à « haut débit » de l'embryon zygotique contenu dans chaque graine qui a permis d'envisager la mise au point d'une stratégie de multiplication végétative performante de génotypes sélectionnés de pin maritime. Cette technique de clonage nommée « embryogenèse somatique » (ES, Fig. 1) mime la production d'embryons telle qu'elle se déroule dans les graines mais sans recours à la reproduction sexuée (du grec *sôma* = corps, ensemble des cellules non reproductrices par opposition au *germen*). L'ES consiste à entretenir un processus naturellement à l'œuvre dans chaque graine. A un stade immature du développement de l'embryon zygotique (cône vert) celui-ci est capable de se multiplier dans la graine pour produire 4 embryons génétiquement identiques (des jumeaux, Fig. 1A). Cette capacité disparaît rapidement au cours de la maturation des graines et l'un de ces embryons devient dominant (le futur semis) tandis que les 3 autres dégénèrent. En excisant ces embryons immatures de la graine à un stade de développement déterminé (autour de la mise en place de la dominance) il est possible d'induire *in vitro* leur multiplication par un processus de formation continu de nouveaux embryons (polyembryonie de clivage = formation *de novo* + division de ces embryons) jusqu'à former une masse embryogène (étape

d'initiation, Fig. 1B) contenant une multitude de copies conformes (un clone d'embryons immatures). Concrètement 1 g de masse embryogène peut contenir plus de 1000 embryons immatures ! Ces masses sont très faciles à propager avec des taux de multiplication pouvant atteindre 5 à 10 par semaine (étape de multiplication, Fig. 1C). Dans des conditions particulières de culture il est possible de provoquer le développement des embryons immatures en embryons somatiques cotylédonaire (étape de maturation, Fig. 1D) aptes à la germination (Fig. 1E) puis à la conversion en plants somatiques homologues à des semis (Fig. 1F).

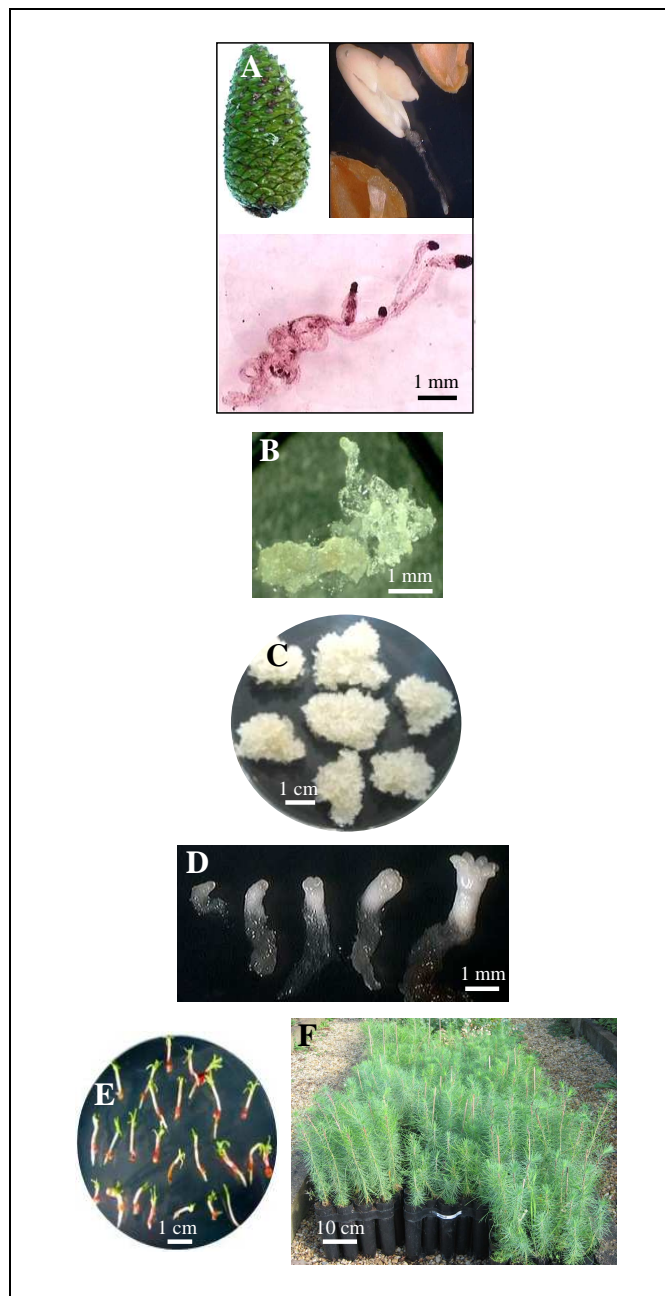


Figure 1. Embryogenèse somatique du pin maritime.

Ouverture des graines de cônes verts et excision de l'embryon zygotique (A). Initiation (B) et multiplication (C) des masses embryogènes. Développement des embryons (D), germination (E) et conversion en plants somatiques similaires au semis (F).

## L'ES couplée à la cryoconservation : la clef pour multiplier rétroactivement des arbres matures

La multiplication d'un embryon de semis dont nous ne connaissons pas *a priori* les performances au champ (contrairement aux parents) n'aurait qu'un intérêt limité si les masses embryogènes n'étaient pas conservables à long terme par congélation à très basse température sous azote (-196°C). Dans un programme d'amélioration bien engagé comme celui du pin maritime (depuis les années 60, 4<sup>ème</sup> cycle de sélection en cours), la possibilité de sécuriser les ressources génétiques en cryocollection dans un état très juvénile pendant toute la phase de test clonal sur le terrain (10 ans environ) permet de bénéficier rétroactivement d'un stock de tissu embryogène pour chacun des génotypes finalement sélectionnés pour leurs performances (Fig. 2). Il est alors possible d'envisager la multiplication de ces arbres élites par ES pour contribuer aux sorties variétales. C'est en ce sens que la multiplication végétative est actuellement un objectif crédible chez le pin maritime comme chez d'autres arbres forestiers en Europe (synthèse dans Lelu-Walter *et al.* 2013). Elle intègre au programme d'amélioration génétique en cours l'appui de deux biotechnologies, l'ES et la cryoconservation.

## Que savons-nous faire exactement en ES du pin maritime ?

Depuis les premières données ayant démontré la possibilité d'initier l'ES chez le pin maritime (thèse de Jarlet-Hughes 1989) et de produire des plants somatiques (Lelu *et al.* 1999), les développements sont continus tant à FCBA qu'à l'INRA (Tab. 1, synthèse dans Klimaszewska *et al.* 2007) avec un partenariat formel sur ce thème entre les 2 instituts depuis 2004 doublé de plusieurs collaborations nationales (Univ. Paris VI, Paris VII et Nancy I) ou internationales (Canada : CFS, Suède : SLU, Espagne : Univ. Málaga et Oviedo). Ce programme est largement soutenu par la Région Aquitaine, la Région Centre, l'Etat, ainsi que par des fonds Européens. L'avancement des recherches autorise la mise en place d'essais au champ dès 1999 par FCBA. Les travaux ont longtemps porté sur l'initiation des masses embryogènes qui est maintenant considérée comme suffisamment performante pour ne pas induire de biais de sélection comme d'ailleurs les étapes de multiplication et de cryoconservation qui sont maîtrisées. La plupart des efforts concernent maintenant l'étape de maturation (maîtrise du développement embryonnaire). Il s'agit surtout d'augmenter la fréquence des lignées capables de produire des embryons somatiques avec des rendements élevés et avec une qualité suffisante pour germer correctement, c'est-à-dire avec une vigueur initiale similaire à celle de l'embryon zygotique. Etat des lieux aux étapes clés ...

Tableau 1. Développement de l'ES du pin maritime à FCBA et à l'INRA

	Référence <sup>a</sup>	Collaboration	Thème <sup>b</sup>
1989	Jarlet-Hughes	FCBA/U. Paris VI	I
1995	Bercetche/Pâques	FCBA	I/M
1999	Lelu <i>et al.</i>	INRA/CFS	I/M/D/G/P
2001	Ramarosandra-tana <i>et al.</i>	FCBA/U. Paris VII	M/D/G
2003	Jordy/Favre	FCBA/U. Nancy I	D/G (qualité)
2005	Breton <i>et al.</i>	FCBA/U. Nancy I	M/D
2005	Harvengt	FCBA	I/M/D/G/P/E
2006	Perez-Rodriguez <i>et al.</i>	FCBA/U. Málaga/SLU	D (qualité)
2006	Lelu-Walter <i>et al.</i>	INRA/CFS	I/M/D/G/P
2006	Park <i>et al.</i>	FCBA/INRA/CFS	I
2006	Breton <i>et al.</i>	FCBA/U. Nancy I	M/D (qualité)
2007	Klimaszewska <i>et al.</i>	FCBA/INRA/CFS	I/M/D/G/P/E (synthèse)
2009	Klimaszewska <i>et al.</i>	INRA/CFS/U. Oviedo	M/D (qualité)
2011	Trontin <i>et al.</i>	FCBA/INRA	I/M/D/G/P/E

<sup>a</sup>Référence précise des articles dans Klimaszewska *et al.* (2007).

<sup>b</sup>I : initiation ; M : multiplication ; D : développement embryonnaire ; G : germination ; P : production de plants ; E : essais au champ.

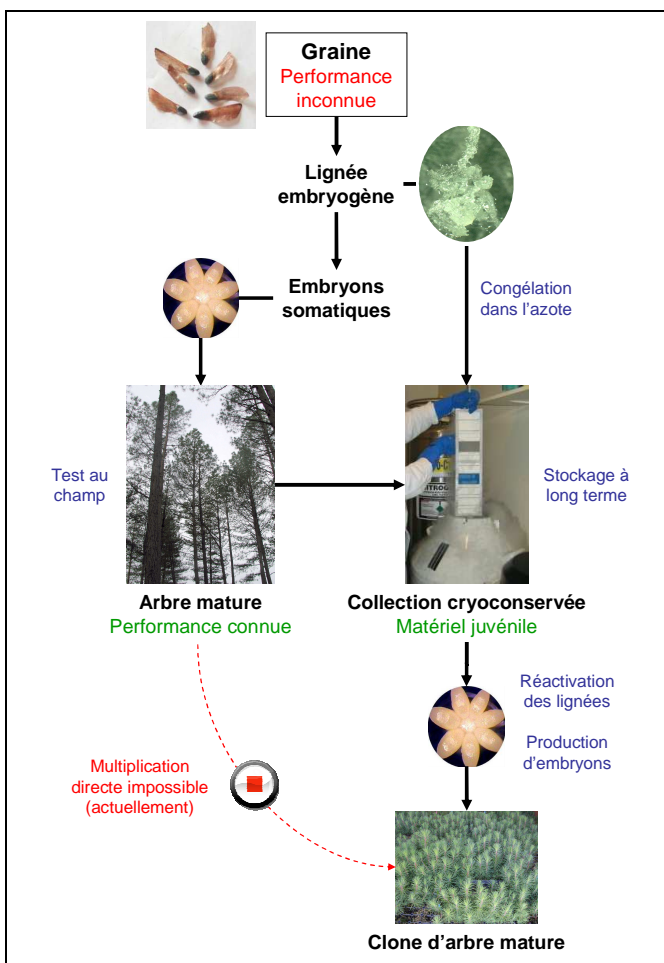


Figure 2. L'appui de l'ES et de la cryoconservation pour le clonage rétroactif d'arbres matures.

■ **Le taux de succès est élevé à l'étape d'initiation (77 %)**

Suite à une collaboration entre FCBA, INRA et CFS (Canadian Forest Service) initiée en 2003 portant simultanément sur plusieurs espèces de pin (Park *et al.* 2006) nous avons pu mettre en évidence la nette supériorité d'une base de milieu de culture *in vitro* (mLV, milieu Litvay modifié) à cette étape chez le pin maritime (**Fig. 3**). De 2003 à 2009 le taux d'initiation moyen de l'ES obtenu à FCBA avec le milieu mLV pour une large gamme de lots de graines issus de croisements contrôlés (27) ou open (17) s'élève à  $63,0 \pm 11,2$  % C'est 3 fois plus qu'avec la base de milieu utilisée de 2000 à 2005 (mDCR,  $21,7 \pm 7,6$  %). Toujours dans le cadre de cette collaboration inter-laboratoires nous avons également révélé l'intérêt d'un régulateur de croissance (CPPU, une hormone de type cytokinine) en combinaison avec mLV (effets synergiques). Après détermination de la concentration optimale en CPPU chez le pin maritime nous avons pu améliorer le taux d'initiation moyen jusqu'à  $76,8 \pm 6,4$  % (Trontin *et al.* 2011). Un tel résultat place le pin maritime parmi les conifères les plus performants à cette étape. L'effet famille reste significatif ainsi que la variation interannuelle mais avec un niveau aussi élevé de génotypes réceptifs au sein des familles le risque de biais (perte de diversité génétique) introduit par une éventuelle sélection sur le critère d'aptitude à l'ES apparaît à présent très limité. Cette étape assez longue (2-3 mois pour initier et stabiliser une lignée) est donc considérée comme maîtrisée pour des applications pratiques. Elle nécessite toutefois de bien cibler la courte fenêtre de prélèvement (7-10 jours) des embryons zygotiques immatures au stade de développement optimal pour l'initiation (le stade précotylédonaire) qui se situe généralement courant juillet dans le massif aquitain.

■ **Les masses embryogènes initiées sont aisément multipliées et cryoconservées**

La multiplication des masses embryogènes est très rapide tant sur milieu mLV que mDCR contenant une auxine (2,4-D) et une cytokinine (BAP). La culture est possible au contact direct du milieu gélifié ou sur filtre de papier qui permet de simplifier le transfert des masses sur milieu neuf. Les accroissements relatifs moyens en matière fraîche estimés pour 6 lignées embryogènes de 3 familles cultivées sur filtre de papier avec un repiquage toutes les 2 semaines sont supérieurs à 1000 % avec un avantage pour mLV ( $1582 \pm 152$  %) comparé à mDCR ( $1268 \pm 113$  %). Sur la base d'une telle capacité de multiplication, un rapide calcul montre qu'il est possible d'obtenir en 6 semaines (3 repiquages) pour une lignée environ 1 kg de masse embryogène à partir d'un g initial. A raison de 1000 embryons immatures par g de masse embryogène (cf. point 5.3) cela représente un potentiel d'un million d'embryons somatiques ! Même si nous ne réalisons actuellement en pratique que 10 % de ce potentiel, la dimension industrielle du process par rapport aux techniques classiques est évidente. Cependant une chute progressive du potentiel embryogène est observée au cours du vieillissement des lignées en multiplication (généralement en moins de 6 mois). Ce phénomène semble bien spécifique aux pins car il apparaît beaucoup plus limité chez d'autres conifères (épicéa, mélèze). Des facteurs épigénétiques (qui ne modifient pas la structure de base de l'ADN) seraient à l'œuvre comme la méthylation de l'ADN, la modification de la structure de la chromatine ou l'expression de petits ARNs régulateurs. Ce problème est techniquement contourné via la bonne gestion à long terme des stocks cryoconservés de masses embryogènes dans un état juvénile (**Fig. 2**). Les masses embryogènes peuvent être facilement cryoconservées dans l'azote ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) après un prétraitement d'un peu plus de 2 jours à l'aide de cryoprotectants et une descente en température contrôlée. Les très basses températures permettent de figer non seulement l'eau libre dans les cellules mais également l'eau liée aux molécules. Toute réaction métabolique est ainsi stoppée, en particulier les phénomènes de vieillissement. La décongélation de ces tissus ne pose pas de problème de survie (près de 100 % de réactivation). Il est donc possible d'établir des collections statiques de milliers d'individus dans un état juvénile au sein de cryoconservateurs qui occupent quelques m<sup>2</sup> seulement de surface utile. Nous entretenons ainsi à FCBA une collection de plus de 2000 génotypes de pin maritime qui représentent une bonne quinzaine des meilleures familles issues de croisements contrôlés. Une telle collection peut être maintenue à très long terme sous vapeurs d'azote (plus de 15 ans de recul à FCBA). La bonne gestion des échantillons permet de garantir le niveau du stock cryoconservé pour chaque lignée embryogène. Le coût de maintien des collections est uniquement lié à l'alimentation en azote, ce qui représente environ 0,30 €/an/échantillon.

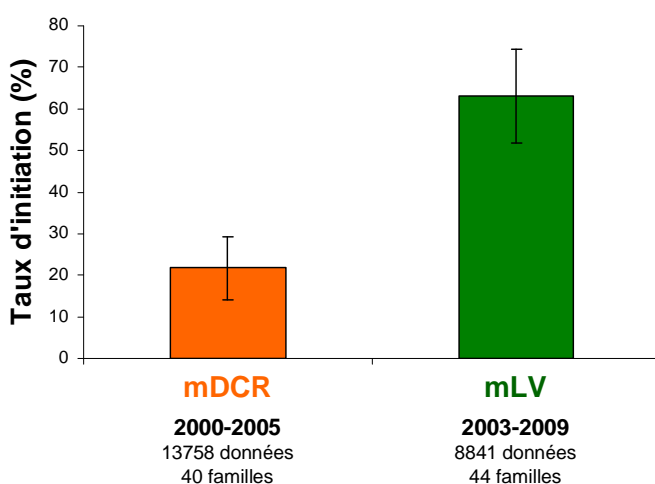


Figure 3. Le taux de succès à l'étape d'initiation (%) a considérablement augmenté en développant à partir de 2003 une base de milieu mLV plutôt que mDCR (barres = intervalle de confiance à 5 %).

■ **Le rendement en embryons somatiques et le taux de génotypes réceptifs restent insuffisants à l'étape de maturation**

L'intérêt du milieu mLV aux premières étapes de l'ES (initiation, multiplication) a été confirmé à l'étape de maturation. Si l'on considère les résultats obtenus entre 2000 et 2009 pour de nombreuses lignées, nous constatons (Fig. 4) que le rendement en embryons somatiques cotylédonaire s'est très nettement amélioré autour de 2004, date à laquelle nous avons progressivement opté pour mLV au lieu de mDCR. En moyenne nous obtenons 50 embryons/g de tissu embryogène avec mLV (547 lignées testées sur cette période). C'est près de 15 fois plus que sur mDCR (moins de 4 embryons/g, 1830 lignées testées).

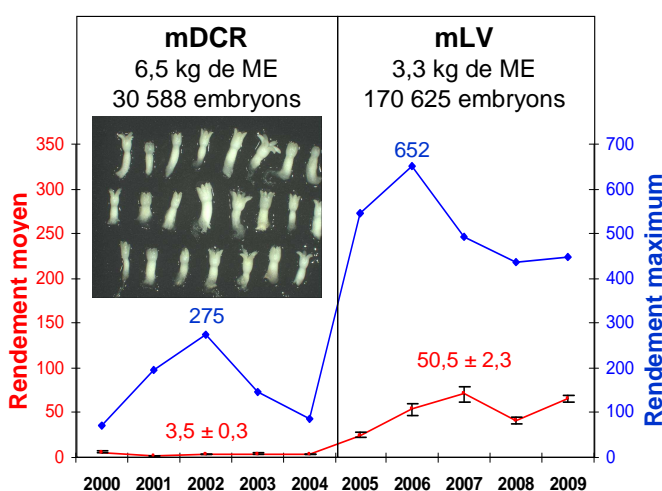


Figure 4. Le rendement en embryons somatique cotylédonaire (photo) par g de masse embryogène (ME) est beaucoup plus élevé sur milieu de maturation mLV comparé à mDCR. Moyenne (courbe rouge ; barres : intervalle de confiance à 5 %) et maximum annuel observé (courbe bleue).

Le taux de génotypes réceptifs à cette étape, estimé comme la fréquence des lignées capables de produire au moins 50 embryons/g est de 44 %. En considérant l'efficacité des étapes précédentes d'initiation (77 %) et de multiplication (100 %), la performance globale de l'ES se situe actuellement autour de 34 %. Ce chiffre reste trop faible mais suffisant pour envisager des applications pratiques. Nos meilleures lignées expriment des potentiels qui peuvent dépasser les 600 embryons/g (Fig. 4). C'est encore loin des potentiels estimés sur la base d'observation microscopiques (1000-5000 embryons immatures/g) mais il semble possible de s'en approcher. Les études portant sur notre génotype modèle (PN519) montrent en effet que la récalcitrance des lignées à la maturation serait surtout d'origine physiologique et/ou épigénétiques (interactions génotype x conditions de culture).

Les conditions de réalisation des étapes de l'embryogenèse au cours de la maturation sont maintenant relativement bien établies et reproduisent là encore ce qui est observé dans les graines. La transition des embryons immatures en multiplication dans les masses embryogènes vers le stade cotylédonaire apte à la germination est en effet provoquée par une réduction de la disponibilité en eau (milieu fortement gélifié), l'augmentation de la pression osmotique (milieu riche en saccharose) et l'ajout d'un signal hormonal (l'acide abscissique) qui est classiquement impliqué dans la régulation du développement embryonnaire. La durée du processus est de 12 semaines *in vitro*. C'est très comparable à ce qui est observé *in vivo* dans chaque graine (embryogenèse d'avril à juillet en Aquitaine).

**Les embryons somatiques sont-ils capables de se développer normalement ?**

■ **Ce que nous disent les essais au champ**

Les équipes de FCBA et de l'INRA ont été capables de produire des embryons somatiques cotylédonaire dès 1999 (Tab 1, Lelu *et al.* 1999). Depuis, un objectif constant est d'estimer au travers d'essais au champ si les embryons somatiques se développent normalement, s'ils peuvent fructifier à l'âge mûre et produire des graines. Huit essais ont été installés par FCBA (7) et l'INRA (1) avec des plants produits par FCBA ou en collaboration avec l'INRA depuis 2004 (Tab. 2). Cela représente plus de 3200 plants somatiques installés au champ. Ces essais testent pour la plupart des clones produits dans différentes conditions de culture *in vitro* comme les milieux mLV et mDCR.

Tableau 2. Tests au champ d'embryons somatiques produits par FCBA et l'INRA depuis 1999.

Plantation	Site	Nf*	Nc*	Np*
1999	FCBA Sivaillan (pépinière)	12	12	59
2003	FCBA Sivaillan (pépinière)	9	32	144
2004	FCBA Sivaillan (pépinière)	7	35	99
2004	FCBA Landriole (forêt)	9	25	448
2005	FCBA Landriole (forêt)	10	25	667
2005	INRA Laperge (forêt)	14	78	540
2008	FCBA Landriole (forêt)	6	11	770
2012	FCBA Domaine de France (forêt)	17	36	480

\*Nombres de familles (Nf), clones (Nc) et plants (Np) à l'installation des essais.

Le plus ancien essai, d'ampleur limitée (12 clones FCBA, 59 plants en pépinière) date de 1999. Lors de la dernière mesure à 12 ans (2011) les arbres somatiques mesuraient de 6,50 à 12,10 m pour un diamètre de 9 à 29 cm. Les mensurations de certains arbres somatiques sont donc comparables aux semis témoins de la parcelle (hauteur : 9,60 à 11,20 ; diamètre : 19 à 33 cm). Les premières fructifications ont été notées dès l'âge de 5 ans pour les embryons et les semis témoin et elles sont à présent régulières. Cet essai démontre donc que les embryons somatiques sont capables d'exécuter les phases juvénile et adulte végétative tout à fait normalement et d'entrer dans la phase adulte reproductive (Fig. 5).



Figure 5. Arbres somatiques de 12 ans (essai 1999, Sivaillan) dans leur phase adulte reproductive.

Des essais plus conséquents ont été mis en place à partir de 2004-2005 (25 à 79 clones FCBA ou INRA, quelques centaines de plants selon les essais, Tab. 2). Ils intègrent comme référence des semis issus des familles correspondant aux clones (témoins génétiques) ou aux variétés VF1 (témoins améliorés). Ces essais montrent que divers clones peuvent présenter des morphologies comparables aux semis (Fig. 6). Les plants somatiques présentent néanmoins une plus faible vigueur initiale qui affecte les paramètres de productivité. Dans l'essai de Sivaillan (2004) planté en pépinière (Fig. 6, encart bleu), la hauteur moyenne des embryons à 7 ans (5,71 m) est ainsi significativement plus faible que celle des semis témoins (7,03). Cependant la croissance relative des embryons mesurée sur la même période (1249 %) est similaire à celle des semis (885 %). Si cette plus faible croissance se retrouve en situation forestière (essais de Landriole, Fig. 7), certains clones n'en montrent pas moins un très bon comportement (ex : 25C, 29C, DE737, CM815, ET826). Après 6 saisons sur le terrain, les accroissements relatifs des clones sont pour la plupart dans la moyenne des semis et même parfois supérieurs (ex : 29C, PN6128, NM626, NM18c). Les meilleurs clones pourraient donc être capables de rattraper leur retard. Ce résultat démontre la faisabilité et l'intérêt de la sélection clonale chez le pin maritime. Un projet FCBA récent soutenu par la Région Aquitaine a en particulier abouti à la plantation du premier test de comparaison de clones (essai 2012, Tab. 2). Bien sûr la moindre vigueur initiale ne permet pas actuellement de réaliser les gains génétiques espérés pour la voie clonale dans

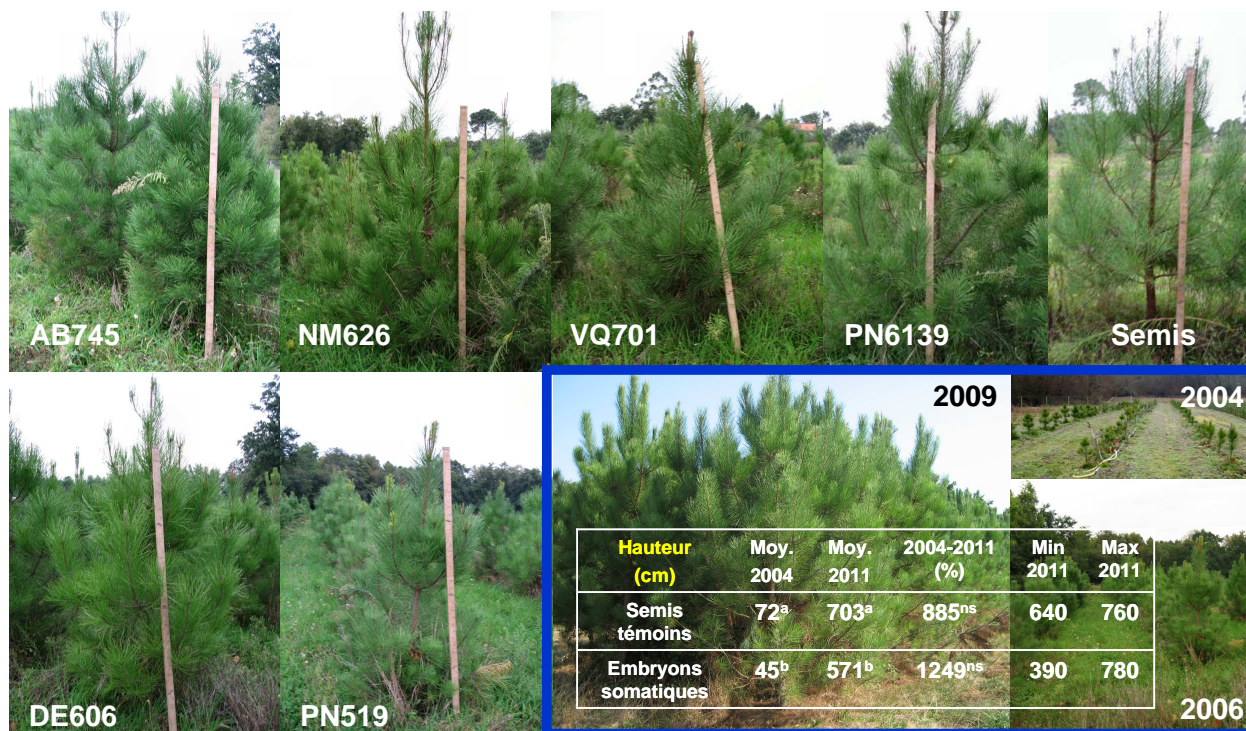


Figure 6. Aspect d'arbres somatiques (6 clones) et semis témoin 2,5 ans après plantation (essai 2004, Sivaillan). Encart bleu : vues générales de l'essai. Le tableau donne les hauteurs moyennes, minimales et maximales observées ainsi que l'accroissement relatif entre 2004 et 2011. <sup>a,b</sup>Différences significatives. <sup>ns</sup>non significatif.

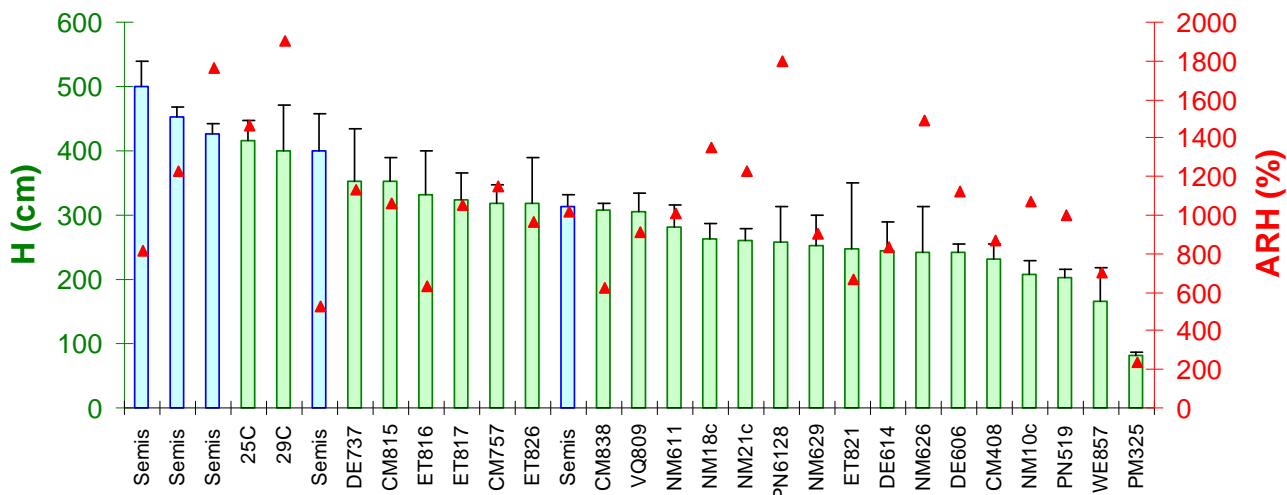


Figure 7. Moyenne des hauteurs (H) et accroissements relatifs en hauteur (ARH) à 6 ans de 24 clones (barres vertes) en situation forestière (essais de Landriole, 2004, 2005) en comparaison avec 5 lots de semis témoins (barres bleues). L'intervalle de confiance à 5 % est donné pour les hauteurs.

des délais standards. Mais dans l'hypothèse de la maîtrise du processus de l'ES (recherches en cours à FCBA et à l'INRA) cette stratégie apparaît très prometteuse. Ces essais conduisent aussi actuellement à la conclusion contre-intuitive que l'homogénéité au sein des clones est plus faible que celle des lots de semis témoins. Là encore, la moindre vigueur initiale des clones dans l'état actuel de la technologie est une cause plausible. Alors que la forte vigueur initiale des semis tend à lisser les différences entre génotypes au démarrage d'un essai, l'effet inverse est obtenu pour les clones. Il faut probablement attendre plusieurs années pour que les effets génétiques soient visibles et vérifier que l'homogénéité intraclonale augmente avec le temps tandis qu'elle diminue chez les semis. De telles observations ont été faites en Nouvelle-Zélande (M. Menzies, Scion, com. personnelle) dans le cas du pin radiata pour lequel le processus d'ES entre à présent dans le champ commercial.

#### ■ Quelle origine au retard de développement des plants somatiques comparé au semis ?

Il faut chercher l'origine de la faible vigueur initiale des plants somatiques dans la qualité intrinsèque des embryons cotylédonaires produits. Leur comparaison avec les embryons zygotiques excisés de la graine et cultivés dans les mêmes conditions *in vitro* démontre leur plus faible capacité germinative (Fig. 8). Si les embryons somatiques ont bien terminé leur programme d'embryogenèse à l'issue de l'étape dite de « maturation » (morphologie similaire à celle des embryons zygotiques), ils ne sont probablement pas complètement matures. La recherche du déterminisme physiologique et moléculaire de la maturité des embryons est actuellement un axe de développement majeur à l'INRA et à FCBA, en particulier dans le cadre d'une thèse en cours (A. Morel) dirigée par M.-A. Lelu-Walter (INRA Orléans) et soutenue par la Région Centre. Porter la qualité des embryons somatiques au niveau de leur

contrepartie zygotique, augmenter le taux de génotypes réceptifs à l'étape de maturation et exprimer au mieux l'énorme potentiel des lignées doivent à termes concourir à la mise en œuvre pratique de cette technologie chez le pin maritime.

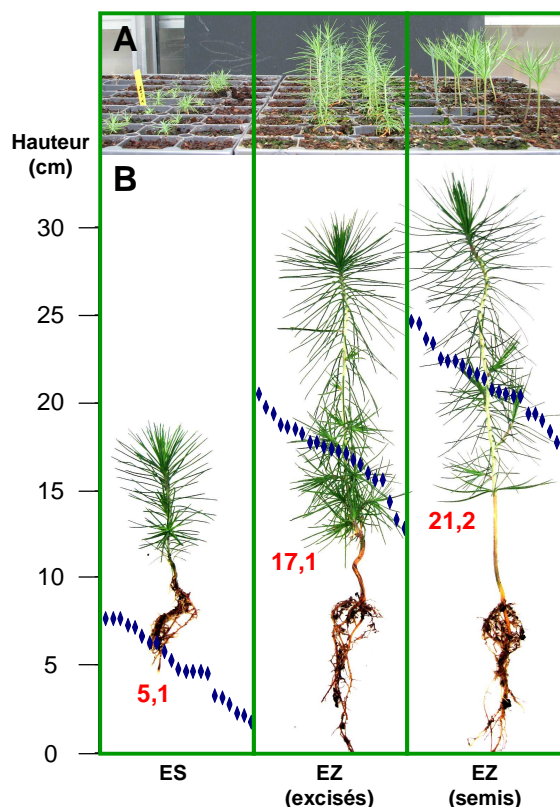


Figure 8. Aspect des embryons somatiques (ES) et zygotiques (EZ) d'une même famille (NL) excisés ou non de la graine (semis) après 6 (A) et 22 semaines (B) de développement *ex vitro*.

ES et EZ excisés ont germé 10 semaines *in vitro* puis ont été transférés *ex vitro* au moment du semis témoin. Le graphique B présente la variabilité (points bleus) et la hauteur moyenne (en rouge) de chaque catégorie de plants. Les différences observées sont significatives au seuil de 5%.

## Quelles possibilités d'automatisation de l'ES pour réduire les coûts ?

Le potentiel indéniable de l'ES pour le déploiement industriel de nouvelles variétés offrant un gain génétique maximisé pour une diversité génétique choisie dans les plantations est bien compris à l'étranger (Canada, USA, Nouvelle-Zélande) où les échelles commerciales ont été atteintes par divers groupes forestiers privés (ArBorGen, CellFor, Forest Genetics) chez plusieurs conifères (ex : douglas, *Picea glauca*, *Pinus radiata*, *Pinus taeda*). En revanche l'intérêt reste faible en Europe même si des tentatives de développement commercial sont en cours pour l'épicéa commun (Suède), l'épicéa de Sitka (Irlande) et le Sapin de Nordmann (Danemark, production de sapins de Noël). Au-delà des raisons structurelles (forêt morcelée car largement privée, retour sur investissement long) et sociétales (acceptabilité des variétés clonales, réglementations) qui apparaissent comme majeures en Europe, c'est le coût actuellement élevé du plant somatique comparé au semis traditionnel (5 à 10 fois plus) qui freine son emploi chez les pins (Lelu-Walter *et al.* 2013). La manipulation de chaque embryon cotylédonaire depuis la récolte et le tri sous loupe en fin de maturation jusqu'à l'acclimatation en serre devient en effet rapidement fastidieuse. Des dispositifs industriels de maturation et de germination des embryons en milieu semi liquide (immersion temporaire) sont déjà employés avec succès pour la production de millions de plants somatiques chez des ligneux comme le caféier (CIRAD, Nestlé). Les solutions techniques retenues sont très loin des coûteux bioréacteurs industriels et s'apparentent à de simples poches plastiques jetables dans lesquelles les embryons évoluent en vrac. Chez les conifères et en particulier les pins, le développement des embryons n'est pas complètement synchrone et ils restent souvent liés entre eux et/ou solidaires des tissus embryogènes environnants. Il est donc nécessaire de séparer les embryons les uns des autres puis de les trier sur des critères morphologiques. Des robots « conventionnels » (à l'image des chaînes de production d'automobiles) capables de reproduire les gestes humains (reconnaître, trier, orienter, transférer des objets de quelques millimètres un par un) sont en développement depuis plusieurs années (ex : Find et Krogstrup 2009) mais peinent à démontrer leur efficacité. Une approche radicalement différente a été présentée récemment (Aidun et Egertsdotter 2012) dans laquelle l'automatisation est réalisée par homogénéisation en milieu liquide des tissus embryogènes contenant les embryons à récolter puis injection dans de fins canaux au diamètre approprié (« microfluidic system »). Des jeux de pression appliqués dans les canaux permettent de faire circuler rapidement les embryons (50 cm/s), de les séparer ou de les espacer régulièrement. Il est alors aisé de les positionner devant une caméra ultra-rapide qui inspecte taille et morphologie (critères

prédéfinis) par analyse automatique d'images. Les embryons sélectionnés sont aiguillés vers un circuit de reconnaissance et d'orientation des pôles racinaires et caulinaires qui aboutit à leur mise en germination sur milieu solide. Deux lignes de production pilotes ont été installées en Suède récemment (SweeTree Technologies) pour des essais concluants chez l'épicéa commun (1 embryon planté par seconde). Un tel système hydraulique est beaucoup plus simple et abordable que l'approche robotisée. Breveté en 2011 (C. Aidun, USA), il pourrait être disponible sous licence prochainement (dès 2014-2015) pour adaptation à d'autres espèces.

## Et la multiplication directe d'arbres matures par ES ?

Une telle perspective permettrait l'accélération de la création variétale mais les conifères sont largement récalcitrants à ce type de traitement. C'est donc une éventualité encore très prospective chez le pin maritime. Son intérêt est néanmoins capital si on considère la nécessité dans un futur proche d'augmenter la fréquence et la diversité des sorties variétales pour mieux faire face à la demande en bois dans un contexte d'augmentation des aléas biotiques et abiotiques. Elle permettrait de gagner 10-12 ans (soit la durée d'un cycle de sélection) comparé à la stratégie actuelle d'ES à partir de graines immatures couplée à la cryoconservation (**Fig. 2**). Si celle-ci s'intègre parfaitement dans les programmes d'amélioration bien rodés, c'est moins le cas lorsqu'il s'agit de démarrer des programmes ou d'intégrer de nouveaux critères de sélection. Des progrès récents chez *Picea glauca* (Klimaszewska *et al.* 2011) montrent qu'il est possible de réaliser l'ensemble du processus de l'ES à partir de bourgeons d'arbres âgés d'une dizaine d'année. Nous avons obtenu à FCBA des données comparables chez *Picea abies* à partir d'arbres de 3 ans (Harvengt *et al.* 2001). A ceci près, dans les 2 cas, qu'il s'agit d'arbres somatiques (= obtenus par ES, propagation végétative). Etrangement, il n'y a toujours pas de démonstration tangible de cette possibilité à partir d'arbres zygotiques (= obtenus par semis, reproduction sexuée). Ces résultats ont le mérite de suggérer que le processus d'ES pourrait réactiver des capacités organogénétiques caractéristiques de l'état juvénile chez les conifères comme cela vient d'être démontré pour des chênes centenaires. FCBA et l'INRA prospectent cette possibilité chez le pin maritime dans le cadre de collaborations internationales avec les meilleures équipes du domaine intéressées par les pins au Canada, en Nouvelle-Zélande et en Finlande. Des tissus embryogènes ont pu être obtenus à partir de coupes de bourgeons chez les pins sylvestre et contorta (arbres de 10 à 20 ans) sans toutefois parvenir à régénérer des plants somatiques. Chez le pin maritime nous avons pu conclure à FCBA (données non publiées, Trontin JF, Quoniou S) qu'il est possible d'obtenir des structures



embryoïdes similaires à des embryons à partir de coupes de bourgeons d'arbres de 35 ans. Même si leur multiplication n'est pas encore possible, ces résultats laissent entrevoir la possibilité d'ES à partir de tissus de pins maritimes matures.

## Conclusion

Grâce aux efforts continus des équipes de recherche à FCBA et l'INRA depuis plus de 20 ans, une méthode de multiplication végétative performante par ES est envisageable à terme pour le pin maritime. Les collaborations soutenues entre les deux instituts et à l'international depuis 2004 ont permis de réaliser des progrès considérables en ce sens. Les étapes initiales (initiation, multiplication) de l'ES ainsi que la cryoconservation des tissus embryogènes sont maintenant bien maîtrisées. Les essais au champ conduits depuis 1999 démontrent que les plants somatiques régénérés à partir de ces tissus peuvent franchir les différentes étapes du développement normal d'un semis jusqu'à la fructification. Mais ils montrent également la moindre vigueur initiale de ce type de plant qui révèle un défaut de maturité des embryons somatiques à la récolte. Les recherches en cours visent donc surtout à mieux maîtriser l'étape de maturation des embryons, tant quantitativement (taux de génotypes réceptifs, expression de l'énorme potentiel embryogène des lignées) que qualitativement (amélioration de la capacité germinative et de la croissance initiale). C'est à cette condition que l'ES du pin maritime sera techniquement prête à affronter les questions socio-économiques (coût, marché, acceptabilité, gestion du gain et de la diversité dans les plantations).

Lorsqu'elles sont parfaitement maîtrisées et bon marché, les techniques de multiplication végétative comme l'ES sont un atout considérable pour l'amélioration génétique, la création et le déploiement rapide de nouvelles variétés chez les arbres forestiers. C'est pour favoriser leur développement et leur application qu'un groupe IUFRO mondial (<http://www.iufro.org/science/divisions/division-2/20000/20900/20902/>) a été créé par YS Park (CFS, Canada) en 2009 et auquel participent activement FCBA (co-coordination) et l'INRA. Les partenariats qui se nouent à l'occasion des manifestations de ce groupe (prochain meeting : Vitoria-Gasteiz, 9-14/09/2014) contribuent à accélérer la mise au point de l'ES.

Jean-François Trontin, Francis Canlet, Isabelle Reymond, Sandrine Debille, Karine Durandea, Luc Harvengt, Jean-Pierre Rousseau, Jean-Mathieu de Boisseson, Jean-Yves Fraysse, Pierre Alazard, Alain Bailly (FCBA)

Caroline Teyssier, Claire Le Metté, Alexandre Morel, Philippe Label, Marie-Anne Lelu-Walter (INRA)

## Bibliographie

1. Aidun CK, Egertsdotter EMU (2012). Fluidics-Based automation of clonal propagation via somatic embryogenesis: SE-fluidics system. 2<sup>nd</sup> International conference of the IUFRO working party 2.09.02, June 25-28, Brno, Czech Republic.

2. Dumas E, Monteuis O (1995). *In vitro* rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants: influence of activated charcoal. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 40: 231-235.
3. Find J, Krogstrup P (2009). Integration of biotechnology, robot technology and visualisation technology for development of methods for automated mass production of elite trees. *Working Papers of the Finnish Forest Research Institute* 114: 72-77
4. Harvengt L, Trontin JF, Reymond I, Canlet F, Pâques M (2001). Molecular evidence of true-to-type propagation of a 3-year-old Norway spruce through somatic embryogenesis. *Planta* 213: 828-832
5. Klimaszewska K, Trontin JF, Becwar M, Devillard C, Park YS, Lelu-Walter MA (2007). Recent progress on somatic embryogenesis on four *Pinus* spp. *Tree Forest Science & Biotechnology* 1: 11-25.
6. Klimaszewska K, Overton C, Stewart D, Rutledge RG (2011). Initiation of somatic embryos and regeneration of plants from primordial shoots of 10-year-old somatic white spruce and expression profiles of 11 genes followed during the tissue culture process. *Planta* 233: 635-647.
7. Lelu MA, Bastien C, Drugeault A, Gouez ML, Klimaszewska K (1999). Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with and without growth regulators. *Physiol. Plant.* 105: 719-728.
8. Lelu-Walter MA, Thompson D, Harvengt L, Sanchez L, Toribio M, Pâques L (2013). Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction. *Tree Genetics & Genomes* 9: 883-899.
9. Park YS, Lelu MA, Harvengt L, Trontin JF, Mac Eacheron I, Klimaszewska K, Bonga JM (2006). Initiation of somatic embryogenesis in *P. banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster* and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 86: 87-101.
10. Trontin JF, Reymond I, Quoniou S, Canlet F, Debille S, Bruneau G, Harvengt L, Le Metté C, Vallance M, Teyssier C, Label P, Lelu-Walter MA (2011). An overview of current achievements and shortcomings in developing maritime pine somatic embryogenesis and enabling technologies in France. IUFRO 2.09.02 proceedings on Advances in Somatic Embryogenesis of Trees and Its Application for the Future Forests and Plantations (Eds : YS Park, JM Bonga, SY Park, HK Moon), 19-21/08/2010 (Suwon, South Korea), pp 100-102.
11. Trontin JF, Alazard P, Dumas E, Quoniou S, Canlet F, Chantre G, Harvengt L (2004). Prospects for clonal propagation of selected maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) using micropropagation techniques. 9<sup>th</sup> Conference on Biotechnology in the Pulp & Paper Industry (Durban, South Africa), pp. 9.5.

Ces développements ont reçu depuis 1999 le soutien de la Région Aquitaine, de la Région Centre, du Ministère de l'Agriculture et de la Forêt ainsi que de l'Union Européenne



## Contact :

**Jean-François TRONTIN**

Tél. 05 56 79 95 03

[jean-francois.trontin@fcba.fr](mailto:jean-francois.trontin@fcba.fr)

FCBA – Pôle Biotechnologie & Sylviculture Avancée  
Equipe Génétique & Biotechnologie  
71, Route d'Arcachon – Pierroton, 33610 Cestas

