

Embryogenèse somatique au ministère des Ressources naturelles et de la Faune du Québec : Du laboratoire au site de plantation*

Laurence Tremblay^{1,2}, Mohammed S. Lamhamedi¹

¹Direction de la recherche forestière (DRF), ministère des Ressources naturelles et de la Faune (MRNF),

²Pépinière forestière de Saint-Modeste, Direction de la production de semences et de plants (DPSP), ministère des Ressources naturelles et de la Faune (MRNF).

Courriel : Laurence.Tremblay@mrnf.gouv.qc.ca; Mohammed.Lamhamedi@mrnf.gouv.qc.ca;

* Article publié dans la revue *Des plants et des hommes*, Vol. 9, n°3, pp : 6-11; Décembre 2006

Introduction

L'aménagement durable des forêts et l'avancement des connaissances comptent parmi les priorités du ministère des Ressources naturelles et de la Faune du Québec. Parmi les différents volets de recherche, la filière de reboisement (amélioration génétique, production de semences, bouturage, embryogenèse somatique, production de plants, sylviculture) est un maillon incontournable de la stratégie de l'intensification de la sylviculture en vue de rehausser la productivité des forêts. Grâce à l'avancement des travaux de recherche spécifiques à cette filière, les généticiens ont sélectionné, selon des méthodes standards d'amélioration génétique, du matériel élite dont la productivité est supérieure à celle de la forêt naturelle. Cela a permis l'établissement des vergers à graines de première et de deuxième génération des principales essences commerciales pour lesquelles les semences sont actuellement utilisées dans la production de plants des 24 pépinières forestières du Québec. De plus, une partie des plants (2 %) sont produits par bouturage de masse à partir de pieds-mères issus de semences récoltées sur les meilleurs croisements dirigés.

Le bouturage de masse est une technique très avantageuse, car elle permet de garantir une productivité forestière supérieure par comparaison à celle des plantations (semences issues des vergers de 1^{re} et de 2^e génération) et de la forêt naturelle. Cependant, en plus du problème du vieillissement des pieds-mères c.a.d. ils ne peuvent être utilisés que pendant une période relativement très courte (3 ans maximum), le nombre de boutures produites par pied-mère est très limité. Pour pallier à cet inconvénient, l'embryogenèse somatique (ES)

s'avère la technique *in vitro* la plus performante. Cette technique pourra être intégrée de façon complémentaire aux opérations de bouturage à une échelle opérationnelle. En effet, elle permet d'obtenir un nombre illimité de copies d'un même individu tout en garantissant la conservation du matériel grâce à la cryoconservation des tissus embryogènes dans l'azote liquide. Cette conservation permettra, dans le cas du bouturage, de maintenir une juvénilité des pieds-mères clonaux les plus performants tout en garantissant le maintien de la diversité génétique. De plus, cette technologie permet de raccourcir les cycles de sélection spécifiques à l'amélioration génétique et de conserver les ressources génétiques.

Les principaux objectifs de cet article consistent à : i) faire un rappel très succinct des principales étapes de l'ES; ii) décrire les principales phases historiques de développement et d'adaptation des techniques de l'ES spécifiques aux principales essences commerciales du Québec; iii) faire une brève description des projets à réaliser ou en cours de réalisation sur les possibilités d'intégration de l'ES dans le programme d'amélioration génétique, en pépinière forestière, en bouturage et dans la gestion des vergers à graines.

1. Principales étapes de l'ES

L'ES permet d'obtenir, à partir d'une seule graine (=clone), une multitude d'embryons somatiques lesquels deviendront des plants somatiques dont le génotype est identique à la graine de départ. Le terme somatique signifie que les embryons sont créés de façon asexuée. L'ES est une méthode de multiplication végétative *in vitro* dans des conditions contrôlées et dont aucune manipulation génétique n'est faite. Il y a six

principales étapes nécessaires pour obtenir des milliers de plants à partir d'une seule semence, soit : **1)** l'induction consiste à produire du tissu embryogène à partir de l'embryon zygotique extrait de la graine. Ce tissu embryogène passe par les mêmes stades de développement que l'embryon zygotique; **2)** le stade de maintenance permet une multiplication du tissu embryogène qui restera à un stade très peu différencié. À ce stade, le tissu embryogène est mis en cryoconservation (conservation à long terme dans l'azote liquide); **3)** un stade de développement plus avancé permet la formation d'embryons cotylédonaire qui sont obtenus lors de la maturation du tissu embryogène; **4)** une étape de germination des embryons somatiques matures en plantules est ensuite réalisée. Cette étape est comparable à la germination de la graine (croissance du système racinaire et caulinaire fonctionnel); **5)** les plantules obtenues ont besoin d'une étape d'acclimatation indispensable à leur survie et à leur croissance; et **6)** les plantules sont transférées en sol pour une croissance en serre. Un exemple des étapes de production de plants d'épinette blanche par ES est illustré à la Figure 1.

2. Principales phases historiques de développement et d'adaptation des techniques de l'ES spécifiques aux principales essences commerciales du Québec

Dès l'apparition de la première publication en 1985 ⁽¹⁾ concernant l'ES des conifères, le MRNF s'est intéressé à intégrer cette technologie de façon progressive dans la filière de reboisement du Québec. Ainsi, on peut distinguer trois principales phases de développement, d'adaptation et d'intégration des techniques de l'ES au MRNF du Québec.

2.1 Phase 1 (1990 à 2000) : Développement et ajustement des techniques d'ES de nos principales essences forestières à l'échelle du laboratoire

Pendant cette phase la DRF et la DPSP ont subventionné plusieurs projets de recherche de Mme Francine Tremblay et de son équipe du laboratoire de culture *in vitro* des conifères de l'Université Laval. En parallèle, un autre projet a été subventionné par des pépinières privées grâce à l'appui financier du programme

gouvernemental du ministère de l'Industrie et du Commerce, Science et Technologie du Québec (programme Synergie). D'autres projets ont porté sur l'ES de l'épinette de Norvège dont l'appui financier était assuré par le MRNF via le Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies.

Les projets subventionnés ont porté sur l'optimisation des différentes étapes de l'ES, ainsi que sur la mise en place des premiers tests clonaux de démonstration (épinette noire, épinette blanche et mélèzes hybrides). À l'échelle du laboratoire, plusieurs facteurs ont été étudiés tant dans la composition du milieu de culture que l'environnement physique des différentes étapes nécessaires à l'obtention de plants issus d'ES pour les épinettes ^(2 à 10). D'autres travaux ont aussi été effectués sur la déshydratation et la conservation à long terme des embryons somatiques de l'épinette noire et de l'épinette blanche ^(11, 12), ainsi que sur la stabilité génétique des plants somatiques ^(13 à 15).

Grâce à ces subventions, plus de 15 000 plants issus d'ES ont été mis dans des tests clonaux de démonstration pour l'épinette noire, l'épinette blanche et les mélèzes hybrides. La majorité de ces tests clonaux a été installée en sites de reboisement par les chercheurs de la DRF. Lors de ces travaux subventionnés par le MRNF, il y avait toujours une collaboration active (réalisation des croisements dirigés, production de semences, participation active lors des différentes phases de chaque projet, encadrement des étudiants et des professionnels de recherche, choix des sites et préparation de terrain, plantation, etc.) d'un chercheur de la DRF en génétique et/ou en production de plants. D'autres tests clonaux ont été établis en collaboration avec les chercheurs du Service canadien des forêts (SCF, Canada).

2.2 Phase 2 (2001 à 2003) : Intégration de l'ES à la pépinière de Saint-Modeste

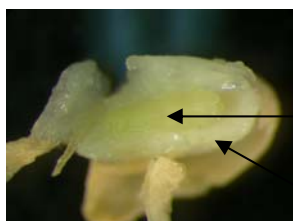
Afin d'intégrer l'ES à une échelle opérationnelle à la pépinière de Saint-Modeste, une entente a été ratifiée en 2001 entre la DPSP et le laboratoire de culture *in vitro* des conifères de l'Université Laval en étroite collaboration avec la DRF. Dans cette entente de transfert

Étape 1 : Induction (3 à 10 sem.)

Cônes immatures d'épinette blanche



Dissection de la graine immature



Embryon zytotique

Mégagamétophyte

Mise en culture de l'embryon zytotique



Obtention du tissu embryogène



Cryoconservation

Tissu embryogène



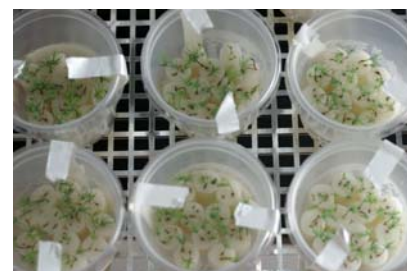
Étape 2 : Maintenance (Repiquage aux 2 semaines)

Étape 6 : Transfert en sol



Étape 5 : Acclimatation (1 semaine)

Plantules somatiques obtenues après 12 semaines



Étape 4 : Germination (10 à 12 semaines)

Déshydratation

Embryons somatiques matures après 5 semaines en maturation



Étape 3 : Maturation (4 à 6 semaines)

Figure 1 : Exemple des étapes de production de plants d'épinette blanche par embryogenèse somatique

technologique (2001 à 2004), la priorité a été accordée à l'intégration des étapes de l'ES spécifiques à l'épinette blanche à cause de l'avancement de son programme d'amélioration génétique. Ces travaux ont été financés entièrement par la DPSP du MRNF. Cette deuxième phase a permis de transférer les connaissances en ES (protocoles et spécifications des méthodes) à la pépinière de Saint-Modeste en utilisant comme matériel un seul clone ayant déjà montré sa performance lors des principales étapes de l'ES. Un laboratoire fonctionnel en ES a été mis sur pied et a permis de produire 13 000 plants de ce clone (G-308). Toutes les étapes nécessaires à cette première production de plants ont été réalisées par le personnel de Saint-Modeste, ainsi que l'élaboration des régies de culture des plants somatiques aussi bien en récipients qu'à racines nues. Cette phase de transfert technologique a aussi permis la mise au point d'un système de germination des embryons somatiques en circuit fermé dont l'optimisation est en cours à la DPSP et à la DRF. De plus, l'approche d'acclimatation des plants a été adaptée à une échelle opérationnelle sans recourir à l'utilisation du mist⁽¹⁶⁾ dont le taux de survie dépassait 98 %. À notre connaissance, il s'agit de la seule pépinière (Saint-Modeste) au monde qui n'utilise pas le mist (enceinte permettant de contrôler l'humidité relative de l'air), à une échelle opérationnelle, lors de l'acclimatation des plants résineux produits par ES.

2.3 Phase 3 (2004 jusqu'à aujourd'hui) : Réalisation de projets de mise à l'échelle opérationnelle et intégration de l'ES

En 2004, suite à la réalisation de croisements dirigés par la DPSP, le laboratoire d'ES de la pépinière de Saint-Modeste a produit 3 860 plants issus de 80 clones. Parmi ces clones, nous avons retenu 52 clones qui seront plantés en sites de reboisement en 2007 pour la réalisation du premier test clonal avec deux répétitions identiques en termes de nombre et de copies de clones. Ces répétitions seront réparties dans deux sites différents.

En décembre 2005, la DPSP, en collaboration avec la DRF, a engagé une professionnelle experte en ES pour poursuivre la réalisation de

projets de mise à l'échelle opérationnelle de la production de plants par ES. Plus spécifiquement, ses travaux portent actuellement sur l'optimisation de certaines phases d'ES aussi bien à l'échelle du laboratoire que de la pépinière. De plus, une priorité est accordée à la production de clones d'épinette blanche qui seront utilisés dans le cadre de nouveaux tests clonaux. Ces clones sont produits à la pépinière de Saint-Modeste. En 2005, une production de plants a été réalisée avec l'obtention de plus de 9 000 plants issus de 163 nouveaux clones qui sont présentement en croissance en vue de la mise en place d'un deuxième test clonal. À l'été 2006, une induction de tissus embryogènes a permis d'obtenir 781 nouveaux clones. Parmi ceux-ci, 300 clones sont actuellement en maturation et seront mis en germination en janvier 2007 par le personnel de Saint-Modeste pour la réalisation d'un troisième test clonal. Deux techniciennes, nouvellement engagées par cette pépinière, travaillent exclusivement au laboratoire d'ES. Au laboratoire d'ES de la DRF, l'aide technique est assurée de manière occasionnelle et temporaire par trois techniciens (photos page 11).

La production de plants pour ces trois tests clonaux nous a permis d'unifier les forces vives de la DPSP et de la DRF, d'harmoniser nos actions et de synchroniser les étapes d'ES. Ainsi, plus de 26 000 plants ont été produits à la pépinière de Saint-Modeste. De plus, tous les clones produits pour la mise en place des tests clonaux (phases 1 et 2) ont été congelés dans l'azote liquide à -196°C (cryoconservation).

3. Projets à réaliser ou en cours de réalisation sur les possibilités d'intégration de l'ES

En ce qui concerne les étapes d'ES, certains points particuliers restent à optimiser et à raffiner, notamment :

- l'évaluation des pourcentages de perte reliés à chaque étape;
- la création d'une base de données mieux adaptée aux échantillons mis en cryoconservation;
- la réévaluation des protocoles à l'échelle de la pépinière forestière;
- la réalisation de travaux à long terme portant sur l'évaluation de la pertinence

d'utilisation des graines immatures ou matures

- l'optimisation de la germination à grande échelle et possibilités de fabrication de bioréacteurs;
- l'élaboration d'essais à grande échelle qui portent sur l'ensemencement direct des embryons matures dans le sol;
- la mécanisation automatique de certaines étapes d'ES (transfert en sol, repiquage, etc.);
- l'optimisation des conditions de la déshydratation des embryons matures;
- la mise à jour des fichiers informatiques en harmonie avec le système informatique de gestion de semences et de plants;
- la détermination de marqueurs moléculaires spécifiques aux principales étapes de l'ES des croisements dirigés des essences commerciales du Québec (outils de sélection précoce quant à l'aptitude et à la réponse des semences à l'induction ou aux autres étapes de l'ES).

Des travaux récents menés à la DRF ont montré la présence d'une variabilité clonale très prononcée en matière d'enracinement des pieds-mères clonaux de l'épinette de Norvège (Lamhamedi, Tousignant & F. Tremblay). D'autres essais techniques effectués par la pépinière de Saint-Modeste sur un nombre très limité de clones ont montré que les pieds-mères clonaux d'épinette blanche produisent des boutures qui s'enracinent en conditions opérationnelles. Ceci démontre clairement les possibilités de s'orienter vers un bouturage clonal tout en préservant la diversité génétique. La sélection des clones qui seront intégrés dans la filière de bouturage suppose une connaissance approfondie de leur performance reliée à la croissance, à la phénologie et à l'enracinement.

Afin de s'assurer de la qualité des plants somatiques, d'autres travaux complémentaires sont en cours de réalisation et portent sur la caractérisation morpho-physiologique et l'architecture de la partie aérienne de tous les clones ⁽¹⁷⁾ lors de leur production en pépinière forestière.

Un projet récent, qui a franchi avec succès l'année passée les étapes d'évaluation de pertinence et d'évaluation scientifique, est en cours à la DRF. Il s'intitule; « Intégration de l'embryogenèse somatique dans l'optimisation de la gestion des vergers à graines d'épinette blanche pour augmenter le rendement ligneux ». Ce projet est réalisé par Mme Fabienne Colas en collaboration avec Mohammed Lamhamedi et Jean Beaulieu (SCF, Canada).

Conclusion

Les résultats actuels en matière d'intégration de l'ES à la pépinière de Saint-Modeste sont très encourageants. L'approche utilisée est unique quant à l'examen approfondi des différentes possibilités d'utilisation de cette technologie dans la filière de reboisement c'est-à-dire de la semence à la plantation. Présentement, l'implantation de cette technologie à l'échelle opérationnelle est en cours à la DPSP et à la DRF.

Un atout essentiel de l'ES est la cryoconservation des tissus embryogènes. Cette technique permet la conservation du matériel dans un minimum d'espace et de les reproduire en grande quantité au moment voulu. Elle est essentielle à la conservation des ressources génétiques. Une cryobanque de tous les clones en tests clonaux de l'épinette blanche, l'épinette noire et les mélèzes hybrides a été établie à la DRF et à la pépinière de Saint-Modeste.

Les travaux en cours de réalisation sur la caractérisation morpho-physiologique des clones en pépinière, le bouturage des pieds-mères clonaux produits par ES et l'évaluation de la qualité des semences et du pollen produits par différents clones illustrent bien les potentialités tangibles d'utilisation de l'ES.

En tenant compte des percées technologiques réalisées en matière de bouturage, l'ES et le bouturage seront utilisés de façon complémentaire tout en conservant la diversité génétique. Dans le cadre des programmes d'amélioration génétique, de reboisement et de l'installation des vergers à graines réalisés par le MRNF du Québec, aucun plant transformé génétiquement (introduction d'un ou de plusieurs gènes) n'a été utilisé.

Remerciements

Plusieurs personnes du MRNF ont participé de façon active aux différentes phases spécifiques à l'implantation de l'ES à la pépinière de Saint-Modeste et à l'optimisation des étapes de l'ES au laboratoire d'ES de la DRF. L'aide et l'appui technique de toute une équipe dévouée sont fortement appréciés (Saint-Modeste : Julie Gingras et Annie Dionne; DRF : Linda Veilleux, Monique Pelletier et Danielle Lamontagne). La formation de cette équipe technique a été assurée par Mme Laurence Tremblay.

Les recommandations et la réalisation des croisements dirigés ont été effectuées par André Rainville (DRF), Donatien Lévesque (DPSP centre) et Jacques Grenier (DPSP centre). Nous tenons également à remercier Fabienne Colas (DRF), Jean-Yves Guay, (Saint-Modeste), Michel Rioux (Saint-Modeste), le personnel de la pépinière de Saint-Modeste et du laboratoire de chimie organique et inorganique de la DRF pour leur implication active dans ce dossier.

Nos remerciements s'adressent également à MM. Jean Claude Delarosbil, Gilles Gaboury, Alain Bonneau et Robert Jobidon pour leur appui continu à ce projet d'intégration de l'embryogenèse somatique à la pépinière de Saint-Modeste.



Équipe technique dédiée de façon permanente ou occasionnelle à la réalisation de travaux spécifiques à l'intégration de l'embryogenèse somatique (ES) dans la filière de production de plants. **Photo de gauche** - Laboratoire d'ES à la pépinière de Saint-Modeste (de gauche à droite) : Annie Dionne et Julie Gingras. **Photo de droite** - Laboratoire d'ES à la DRF : Linda Veilleux, Monique Pelletier, Danielle Lamontagne.

Littérature

1.Hakman, I., et al. (1985) *Plant Science* 38, 53-60; 2.Khlifi, S., and Tremblay, F.M. (1995) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 41, 23-32; 3.Meskaoui, A.E., and Tremblay, F.-M. (1999) *Plant Cell Tissue Organ Cult* 56, 201-209; 4.Meskaoui, A.E., and Tremblay, F.-M. (2001) *J Exp Bot* 52, 761-769; 5.Tremblay, L., and Tremblay, F.M. (1991) *Plant Science* 77, 233-242; 6.Tremblay, L., and Tremblay, F.M. (1991) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 27, 95-103; 7.Tremblay, L., and Tremblay, F.M. (1995) *Plant cell tissue organ cult* 42, 39-46; 8.Tremblay, L., and Tremblay, F.M. (1995) In *Biotechnology in Agriculture and Forestry : Somatic embryogenesis and synthetic seed I* (Bajaj, Y.P.S., ed), 431-445, Springer-Verlag; 9.Iraqi, D., et al. (2005) *Alawamia* 113, 62-76; 10.Tremblay, F.M., et al. (2005) In *Protocol for somatic embryogenesis in woody plants* (Gupta, S.M.J.a.P.K., ed), Springer; 11.Bomal, C., and Tremblay, F.-M. (1999) *Plant Cell Tissue Organ Cult* 56, 193-200; 12.Bomal, C., and Tremblay, F.-M. (2000) *Annals of Botany* 86, 177-183; 13.Isabel, N., et al. (1996) *Am j bot* 83, 1121-1130; 14.Isabel, N., et al. (1993) *Theor Appl Genet* 86, 81-87; 15.Tremblay, L., et al. (1999) *American Journal of Botany* 86, 1373-1381; 16.Lamhamedi, M.S., et al. (2003) *Physiologia Plantarum*. 118, 554-561; 17.Lamhamedi, M.S., et al. (2000) *Tree Physiol* 20, 869-880.