



# EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE DIRECTE SUR FRAGMENTS DE FEUILLES DE CAFÉIER ARABUSTA

P. DUBLIN

Directeur de recherche ORSTOM

Laboratoire de culture *in vitro*, GERDAT, Montpellier \*

## Introduction

Plusieurs données relatives aux recherches sur la multiplication végétative *in vitro* des caféiers, dits de basse altitude, dont l'Arabusta, ont été précisées lors de publications antérieures. Les techniques d'induction de bourgeons néoformés ou d'embryons somatiques avaient alors été mises au point sur fragments de tiges orthotropes jeunes, chlorophylliennes (Staritsky, 1977 ; Dublin, 1980).

Les disponibilités en ramifications de ce type demeurent cependant limitées malgré les tailles périodiques indispensables pour assurer leur renouvellement. Les feuilles, par contre, constituent un matériel abondant, toujours disponible et facile à renouveler.

Par ailleurs, l'expérience montre que les taux d'infection sur explants de feuilles sont toujours très faibles, et sans comparaison avec les taux élevés que l'on obtient sur fragments de tiges.

Sharp et Söndhal (1977) furent les premiers à utiliser les fragments de feuilles dans l'embryogenèse somatique chez les caféiers cultivés. Les explants de feuilles utilisés par ces auteurs produisaient des embryons somatiques au bout de cinq à sept mois de culture, après passage obligatoire par une phase : cal indifférencié.

Les recherches entreprises ici avaient pour but d'obtenir des embryons somatiques sur fragments de feuilles plus rapidement et surtout sans passage par un cal indifférencié, de façon à limiter au mieux les risques de variation génétique, toujours possibles lors d'une callogenèse prolongée.

Un autre objectif est d'examiner les degrés de

conformité, au plan agronomique, des caféiers issus de différents niveaux d'embryogenèse somatique.

## Matériel et méthodes

Les feuilles ont été prélevées sur les ramifications plagiotropes de divers clones d'Arabusta, introduits de Côte d'Ivoire et cultivés en serre depuis trois ans.

Seules les feuilles jeunes bien développées des deux nœuds les plus proches du bourgeon terminal ont été utilisées.

La désinfection est faite par trempage des feuilles dans une solution d'hypochlorite de calcium (220° chlorimétrique) à 9 %, additionnée de quelques gouttes de tween 80, pendant 30 min et rinçage (trois fois) à l'eau stérile.

Les explants constitués par des fragments de limbe de 2 cm de côté ont été tantôt immergés à mi-hauteur dans les milieux de culture, tantôt déposés à la surface de ceux-ci (photo 1).

Les flacons contenant milieu de culture et explant ont été placés dans les chambres de culture à 27 °C, soit à l'obscurité continue, soit sous un éclairage à 4 000 lux avec un régime de 12 h d'éclairage et 12 h d'obscurité.

## Milieux de culture

Le milieu de base comprenait en général les éléments minéraux du milieu de Murashige et Skoog additionné des vitamines de Morel et de saccharose, 30-40 g/l. Les milieux ont été solidifiés avec de l'agar (Bacto Difco Agar), 7 g/l, et passés à l'autoclave à 115 °C pendant 20 min.

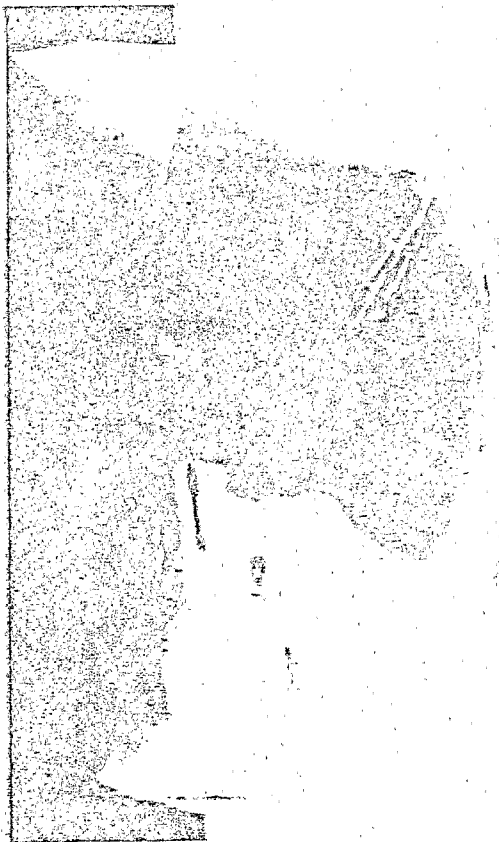
\* BP 5035, 34032 Montpellier.

Fonds Documentaire

N° : 2279

Cote B

Date : 4 JANV. 1983



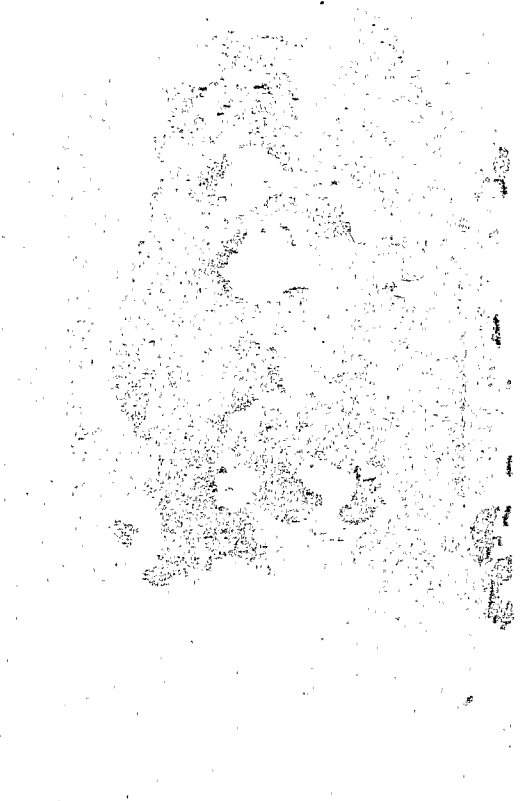
1



2



3



4

Le pH a été ajusté à 5,6 avant addition de l'agar.

Une seule auxine : l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), et une cytokinine : le 6-benzylaminopurine (BAP), ont été utilisées. Les concentrations ont varié entre 0,01 et 1 mg/l pour le 2,4-D et entre 1 et 10 mg/l pour le BAP. Dans quelques cas de l'adénine (40 mg/l) et de l'extrait de malt (400-500 mg/l) ont été ajoutés séparément ou en combinaison aux milieux de différenciation.

## Résultats

### Embryogenèse somatique directe

L'embryogenèse somatique directe sans formation de cal a été obtenue sur milieux riches en cytokinines et dépourvus d'auxine. Après mise en culture, il se forme un très léger cal de cicatrisation sur les bords des explants.

Les embryons apparaissent au niveau des nervures qui affleurent la surface des milieux de culture.

Ces embryons se différencient trois mois après la mise en culture des fragments de feuille, qui dans l'intervalle ont perdu toute trace de leur coloration verte d'origine (photo 2).

La précocité et l'importance de cette embryogenèse varient selon l'origine génétique des explants, leurs dimensions, le niveau auquel ils ont été prélevés sur la feuille et selon aussi leur orientation dans les milieux de culture.

Repiqués sur milieu de développement (Dublin, 1980), ces embryons, dont les zones racinaires et cotylédonaire sont bien différenciées, se développent rapidement en plantules organisées avec feuilles et racines.

### Embryogenèse somatique indirecte avec formation préalable de cal

Dans le cas d'embryogenèse somatique avec formation préalable de cal, les explants de feuilles ont été mis à l'obscurité pendant quatre à six semaines,

sur un milieu additionné de 2,4-D (0,01 à 1 mg/l), puis placés en lumière après repiquage sur un milieu de différenciation à base de BAP (1 à 10 mg/l).

Durant la phase de callogenèse à l'obscurité, des cals blancs, crémeux, plus ou moins compacts selon les doses de 2,4-D utilisées se développent tout autour des fragments de feuilles.

Après repiquage sur milieu de différenciation et passage à la lumière, ces cals prennent une coloration brune et produisent soit des embryons somatiques bien organisés, mais en nombre limité, soit des cals secondaires de deuxième génération (photo 3).

Ces cals secondaires présentent une structure granuleuse, friable, leur coloration jaune pâle contrastant très fortement avec le brun foncé des cals primaires (photo 4).

Laissés sur milieux de différenciation, ces cals secondaires évoluent et donnent naissance à un nombre impressionnant de protubérances minuscules correspondant à autant d'embryoïdes, qui selon les conditions de culture peuvent rester bloqués à un stade globulaire plus ou moins avancé (photo 5).

Ces cals secondaires, fortement embryogènes, correspondent aux cals H. F. S. E. (High Frequency Somatic Embryo) de Söndhal et Sharp (1977).

Repiqués en temps utile, sur un milieu de développement additionné d'adénine ou d'extrait de malt, ces cals embryogènes conduisent à un nombre impressionnant d'embryoïdes, qui se transforment en autant d'embryons organisés avec épicotyle et feuille cotylédonaire (photos 6, 7, 8).

Transférés sur milieu d'enracinement (Dublin, 1980), ces embryons émettent racines et feuilles et se développent en plantules. On peut encore renforcer leur enracinement par un trempage de leur zone épicotylaire dans une solution auxinique (AIB 10 à 100 mg/l) pendant 24 h, suivi d'un repiquage sur un milieu minéral (MS  $\times$  1/2) sans auxine (photo 9).

Les phénomènes de blocage des embryoïdes à un stade globulaire plus ou moins avancé, rencontrés lors de l'embryogenèse somatique sur fragments de feuille, sont la conséquence de déséquilibres nutritifs ou hormonaux.

Très souvent, un repiquage précoce permet d'éviter ces arrêts du développement.

Photo 1. — Explant de feuille d'Arabusta dans un milieu d'induction directe d'embryogenèse somatique

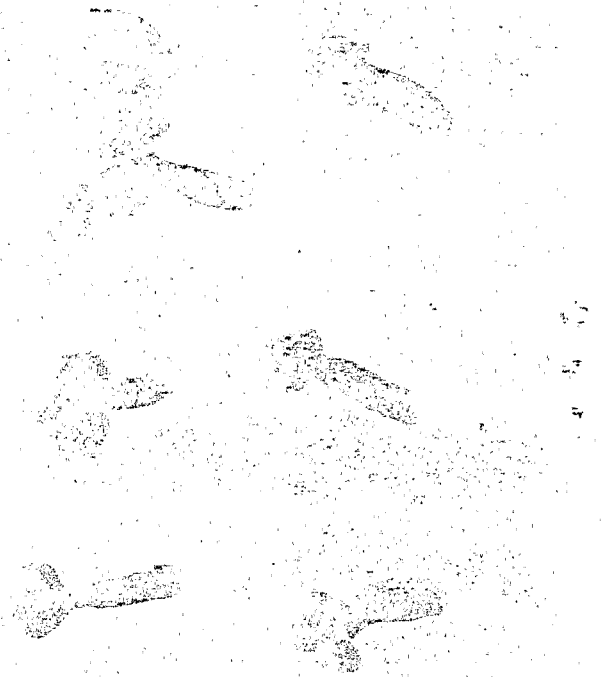
Photo 2. — Embryogenèse somatique directe, sans formation préalable de cal indifférencié, sur fragment de feuille d'Arabusta

Photo 3. — Embryogenèse somatique sur cal primaire de feuille d'Arabusta

Photo 4. — Cals secondaires embryogènes, friables, différenciés sur cals primaires de feuille d'Arabusta



6



8



5



7

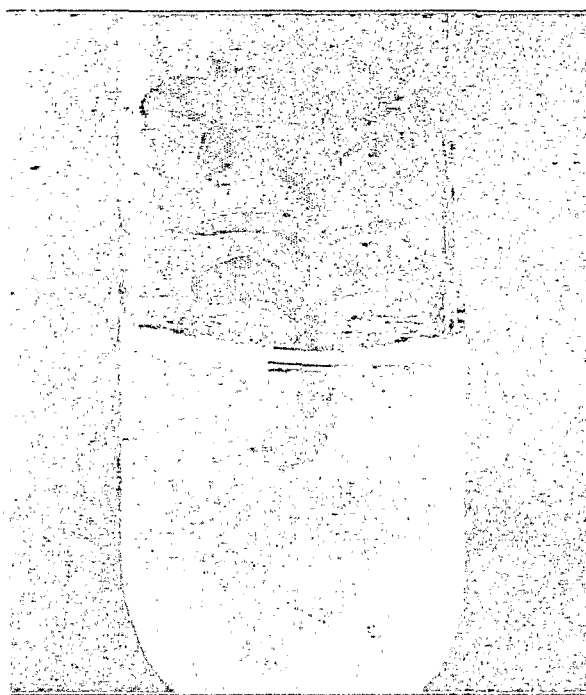


Photo 9. — Plantule d'Arabusta issue d'un embryon somatique, repiquée sur milieu d'enracinement

## Discussion et conclusion

Les fragments de feuilles jeunes de caféier Arabusta constituent un matériel très pratique pour l'obtention d'embryons somatiques et de plantules chez ce végétal.

Selon les séquences et les milieux de culture utilisés, les embryons somatiques peuvent être obtenus, soit directement, sans passage par une phase cal indifférencié, soit après formation de cals primaires, soit après formation de cals secondaires très fortement embryogènes.

Ces trois niveaux d'induction d'embryogenèse somatique correspondent à des échéances également différentes : deux à trois mois pour les embryons induits directement, cinq à huit mois pour les embryons issus de cals primaires ou secondaires.

Les cals de deuxième génération, toujours fortement embryogènes, conduisent à des effectifs (nombre d'embryons par explant) considérables par rapport à ceux obtenus en embryogenèse directe ou en embryogenèse sur cal primaire.

Les anomalies de conformation (embryon bloqué au stade globulaire, cotylédon atrophié, déséquilibre entre développement caulinaire et radicaire) sont d'autant plus fréquentes que leur délai de différenciation a été plus longtemps retardé.

Il est donc probable que le degré de conformité des caféiers issus d'embryons somatiques sera variable selon les niveaux d'induction et les délais d'apparition de ces embryons.

Les cals de deuxième génération, fortement embryogènes, pourront être source de diversité génétique utilisable dans le cadre d'un programme d'amélioration génétique du caféier.

L'embryogenèse somatique directe, par contre, bien que d'un rendement moindre que l'embryogenèse sur cal secondaire, devrait conduire à un meilleur niveau de conformité.

## BIBLIOGRAPHIE

- CAPOT (J.). — L'amélioration du caféier en Côte d'Ivoire. Les hybrides « Arabusta ». *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XVI, n° 1, janv.-mars 1972, p. 3-17.
- DUBLIN (P.). — Induction de bourgeons néoformés et embryogenèse somatique. Deux voies de multiplication végétative *in vitro* des caféiers cultivés. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XXIV, n° 2, avril-juin 1980, p. 121-130.
- DUBLIN (P.). — Multiplication végétative *in vitro* de l'Arabusta. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XXIV, n° 4, oct.-déc. 1980, p. 281-290.
- HERMAN (E. B.), HAAS (G. J.). — Clonal propagation of *C. arabica* L. from callus culture. *HortScience* (Saint-Joseph, Michig.), vol. 10, n° 6, sect. 1, déc. 1975, p. 588-589.
- MURASHIGE (T.), SKOOG (F.). — A revised medium for rapid growth on bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantar.* (Copenhague), vol. 15, 1962, p. 473-497.
- SONDHAL (M. R.), SHARP (W. R.). — High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica*. *Z. Pflanzenphysiol.* (Stuttgart), vol. 81, 1977, p. 395-408.
- STARITSKY (G.). — Embryoid formation in callus tissue of coffee. *Acta Bot. Neerl.* (Leiden), vol. 19, n° 2, 1970, p. 509-514.

Photo 5. — Cals secondaires très fortement embryogènes avec embryon en début de différenciation du stade globulaire

Photo 6. — Embryons somatiques au stade globulaire après repiquage d'un cal secondaire à haute fréquence sur milieu de développement

Photo 7. — Embryons somatiques au stade : début de différenciation des feuilles cotylédonaire issues d'un cal secondaire très fortement embryogène, repiqué sur un milieu de développement d'embryons

Photo 8. — Embryons somatiques d'Arabusta avec hypocotyle et feuille cotylédonnaire au terme de leur développement avec début d'enracinement

DUBLIN (P.). — Embryogenèse somatique directe sur fragments de feuilles de caféier Arabusta. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XXV, n° 4, oct.-déc. 1981, p. 237-242, 9 photos, 7 réf.

Les recherches entreprises par l'auteur ont pour but, d'une part, d'obtenir rapidement des embryons somatiques sur fragments de feuilles sans passage par un cal différencié, d'autre part, d'examiner les degrés de conformité, sur le plan agronomique, des caféiers issus de différents niveaux d'embryogenèse somatique.

Les feuilles utilisées pour les explants ont été prélevées sur les ramifications plagiotropes de divers clones d'Arabusta.

Le milieu de base de culture est composé du milieu de Murashige et Skoog additionné des vitamines de Morel et de saccharose (30-40 g/l). Les milieux (pH 5,6) sont solidifiés avec du Bacto Difco Agar et passés à l'autoclave pendant 20 min. L'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique et le 6-benzyl-aminopurine aux concentrations respectivement comprises entre 0,01 et 1 mg/l et 1 et 10 mg/l sont utilisés. Dans certains cas, de l'adénine (40 mg/l) et de l'extrait de malt (400-500 mg/l) ont été ajoutés séparément ou en combinaison aux milieux de différenciation.

L'embryogenèse somatique directe sans formation de cal a été obtenue sur milieux riches en cytokinines et dépourvus d'auxine. Les embryons somatiques peuvent également être obtenus après formation de cals primaires ou après celle de cals secondaires très fortement embryogènes.

Les cals de deuxième génération pourront être utilisés dans le cadre d'un programme d'amélioration génétique du caféier. L'embryogenèse somatique directe, bien que d'un rendement moindre que celle sur cal secondaire, devrait conduire à un meilleur niveau de conformité.

DUBLIN (P.). — Direkte somatische Embryogenesis auf Blätterfragmenten von Kaffeebaum Arabusta. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XXV, n° 4, oct.-déc. 1981, p. 237-242, 9 photos, 7 réf.

Die vom Autor angestellten Forschungen bezwecken einerseits somatische Embryone auf Blätterfragmenten zu erzielen ohne bei einem differenzierten Kallus zu gehen, andererseits den Konformitätsgrad in agronomischer Hinsicht der aus den verschiedenen Stufen somatischer Embryogenesis hervorgegangenen Kaffeebäumen zu untersuchen.

Die für die Gewebeausschnitte verwendeten Blätter werden auf den plagiotropen Verzweigungen verschiedener Arabusta Klone entnommen.

Die Grundnährlösung besteht aus den mit Vitaminen von Morel und von Saccharose (30-40 g/l) versetzten Nährboden von Murashige und Skoog. Die Nährlösungen (pH 5,6) werden mit Bacto Difco Agar erstarrt und während 20 min im Autoklav belassen. Die 2,4 Dichlorphenoxyessigsäure und das 6-Benzylaminopurin in Konzentrationen zwischen 0,01 und 1 mg/l bzw. 1 und 10 mg/l werden benutzt. In gewissen Fällen wurde Adenin (40 mg/l) oder Maltextrakt (400-500 mg/l) getrennt oder in Verbindung den Differenzierungsnährlösungen hinzugefügt.

Die direkte somatische Embryogenesis ohne Kallusbildung wurde auf Nährlösungen erzielt, die reich an Cytokininen und frei an Auxin waren. Die somatischen Embryone können ebenfalls nach Bildung von primären Kallus und nach der sekundären stark embryogenen Kallus erzielt werden.

Die Kallus des Nachzuchts können im Rahmen eines Programms genetischer Verbesserung des Kaffeebaums verwendet werden. Obwohl die direkte somatische Embryogenesis weniger ertragbringend ist als die auf sekundären Kallus dürfte sie zu einem besseren Konformitätsgrad führen.

DUBLIN (P.). — Direct somatic embryogenesis on fragments of Arabusta coffee tree leaves. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XXV, n° 4, oct.-déc. 1981, p. 237-242, 9 photos, 7 réf.

The object of the research carried out by the author was to obtain somatic embryos on fragments of leaves rapidly, without passing through a differentiated callus stage, and also to examine the degrees of conformity, from the agronomic point of view, of the coffee trees obtained from various levels of somatic embryogenesis.

The leaves used for the explants were taken from the plagiotropic ramifications of the various Arabusta clones.

The basic culture medium consists of a Murashige and Skoog medium to which Morel vitamins and saccharose (30-40 g/l) have been added. The media (pH 5.6) were solidified with Bacto Difco Agar and were placed in an autoclave for 20 min. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 6-benzyl-aminopurine were used at concentrations respectively between 0.01 and 1 mg/l and 1 and 10 mg/l. In some cases, adenine (40 mg/l) and malt extract (400-500 mg/l) were added, separately or in combination, to the differentiation media.

Direct somatic embryogenesis without the formation of callus was obtained on media rich in cytokinins, devoid of auxine. Somatic embryos can also be obtained after the formation of primary calluses, or after that of very highly embryogenic secondary calluses.

Second generation calluses can be used in a coffee tree genetic improvement programme. Direct somatic embryogenesis, although giving a smaller yield than that obtained on secondary callus, should lead to a better conformity level.

DUBLIN (P.). — Embriogénesis somática directa sobre fragmentos de hojas de cafeto Arabusta. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XXV, n° 4, oct.-déc. 1981, p. 237-242, 9 photos, 7 réf.

Las investigaciones emprendidas por el autor tienen como meta obtener rápidamente embriones somáticos sobre fragmentos de hojas, sin paso por un callo diferenciado y, asimismo, examinar los grados de conformidad, desde el punto de vista agronómico, de los cafetos procedentes de distintos niveles de embriogénesis somática.

Las hojas empleadas para las « explantitas » han sido tomadas en las ramificaciones plagiotropas de diversos clones de Arabusta.

El medio básico de cultivo está compuesto por el medio de Murashige y Skoog, con adición de vitaminas de Morel y de sacarosa (30-40 g/l). Los medios (pH 5,6) se solidifican con Bacto Difco Agar y están sometidos a un paso por autoclave de 20 min. El ácido 2,4-diclorofenoxyacético y el 6-bencil-aminopurina se emplean con concentraciones comprendidas respectivamente entre 0,01 y 1 mg/l y 1 y 10 mg/l. En ciertos casos, se añade adenina (40 mg/l) o extracto de malte (400-500 mg/l) ya sea por separado o en combinación, a los medios de diferenciación.

La embriogénesis somática directa sin formación de callo ha sido obtenida en medios ricos en citokininas y desprovistos de auxina. Los embriones somáticos pueden también ser obtenidos tras formación de callos primarios o después de aquella de callos secundarios muy fuertemente embriogénos.

Los callos de segunda generación podrán ser utilizados en el contexto de un programa de mejora genética del cafeto. A pesar de arrojar un rendimiento menor que aquella sobre callo secundario, la embriogénesis somática directa debería dar lugar a un mejor nivel de conformidad.