



# 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.

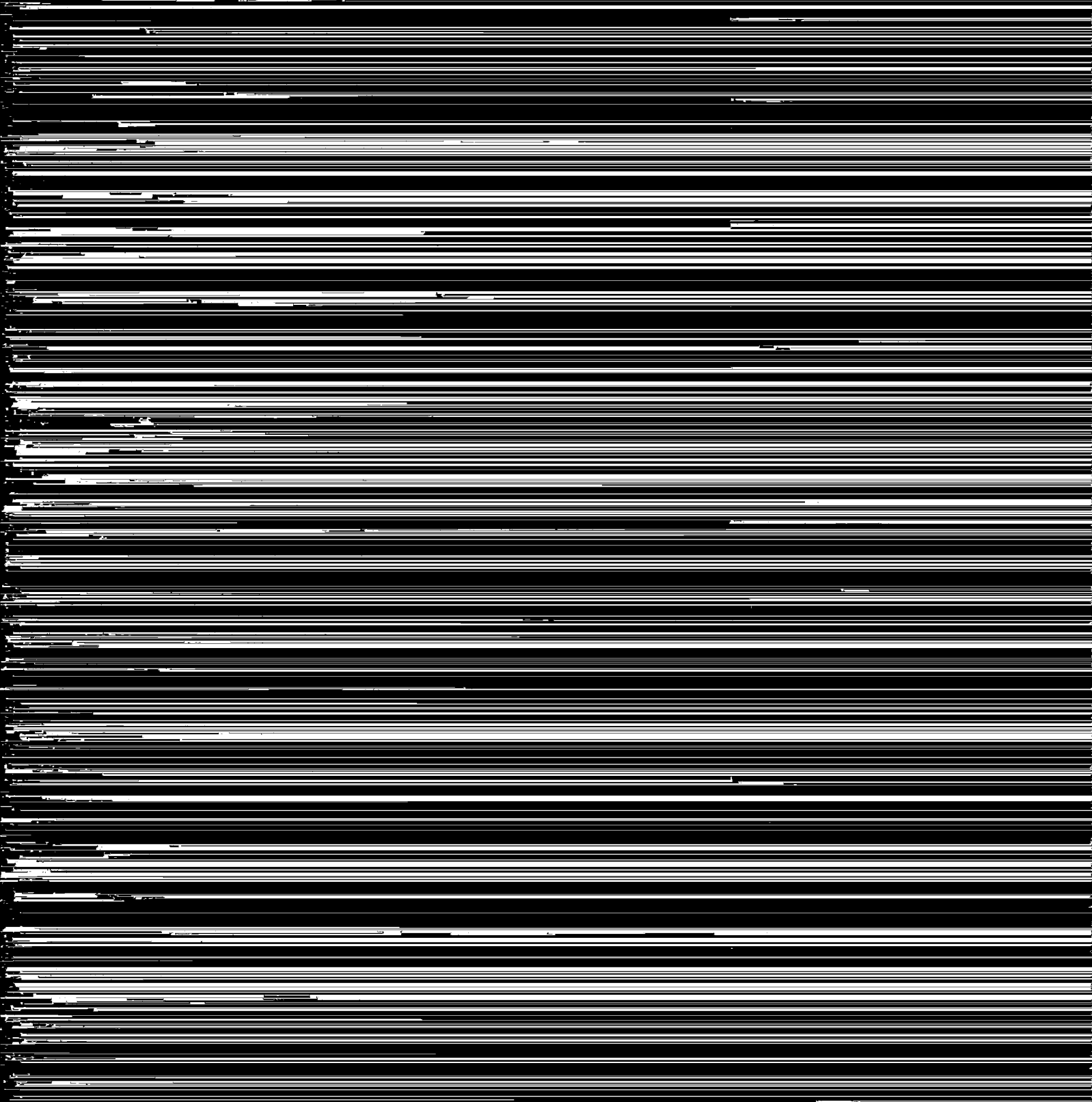
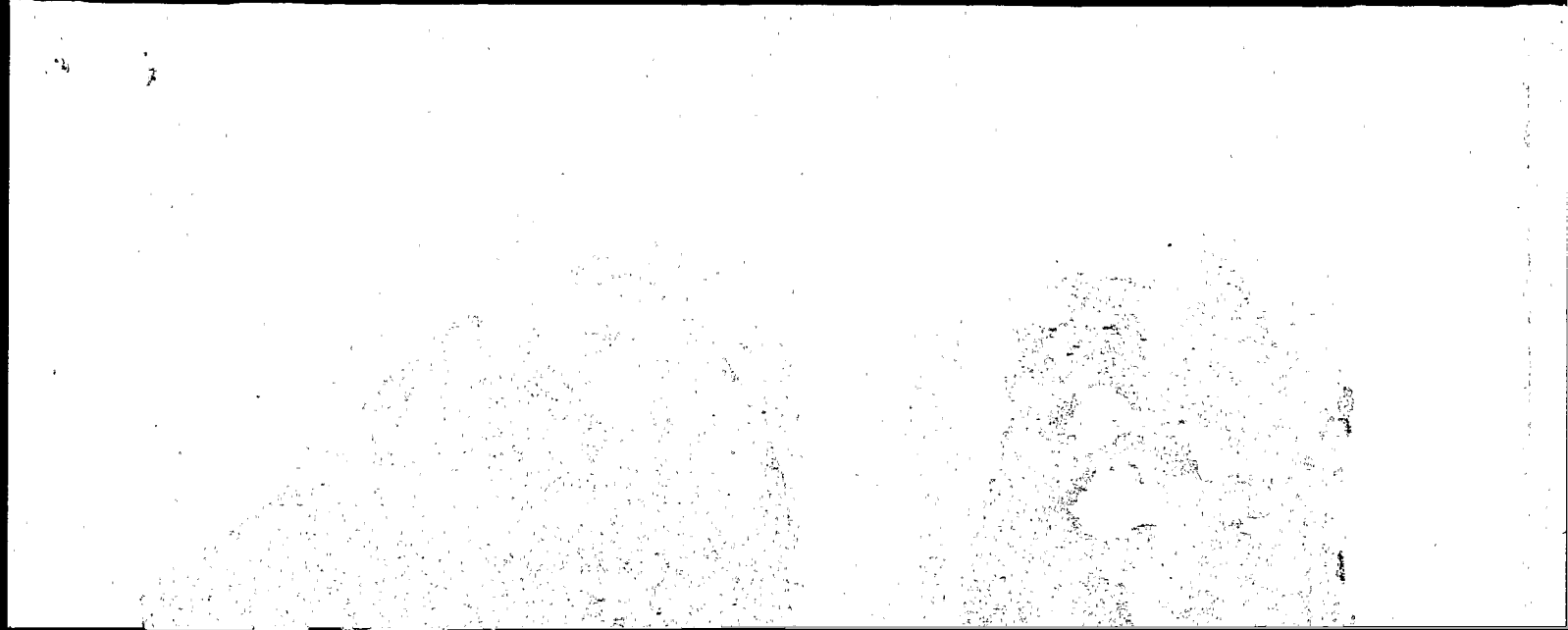
\* BP 5035, 34032 Montpellier.

Fonds Documentaire

N° : 2279

Cote B

Date : 4 JANV. 1983



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

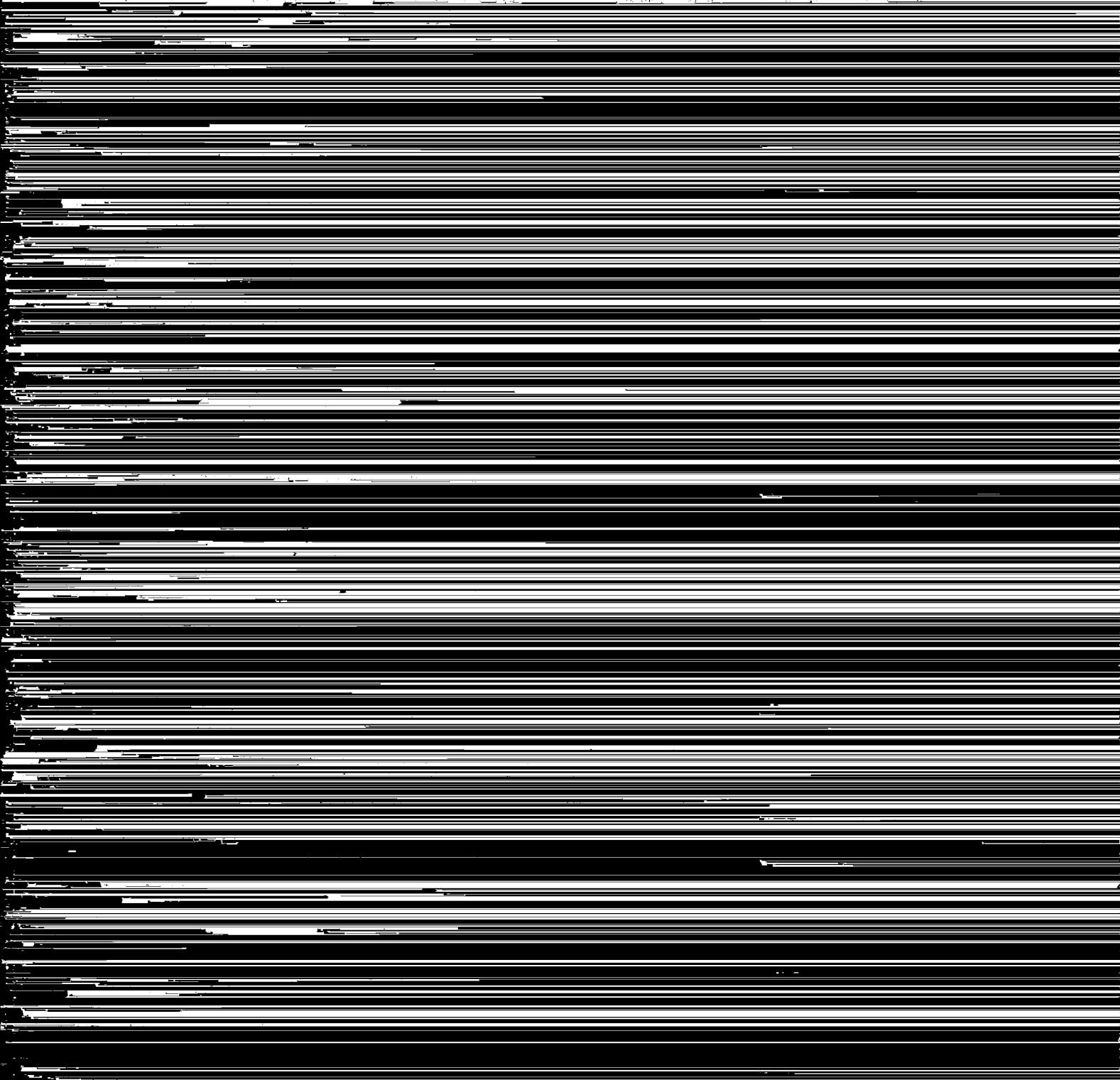
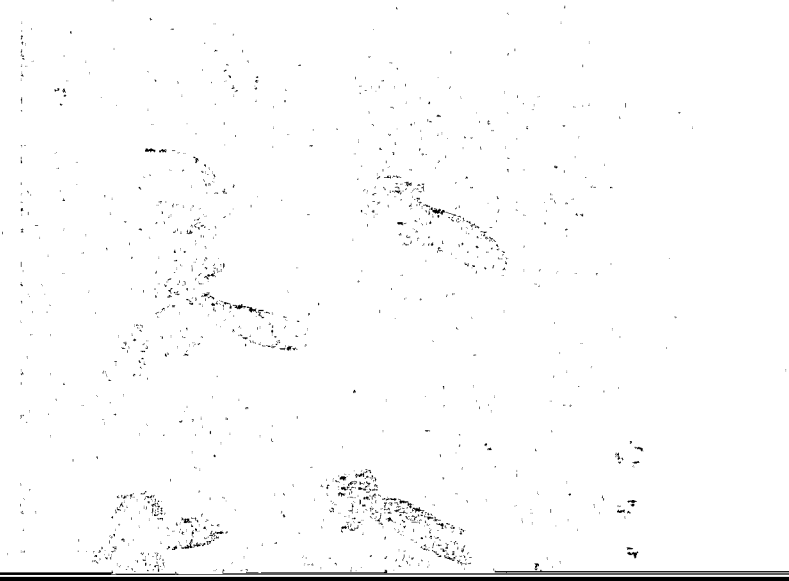
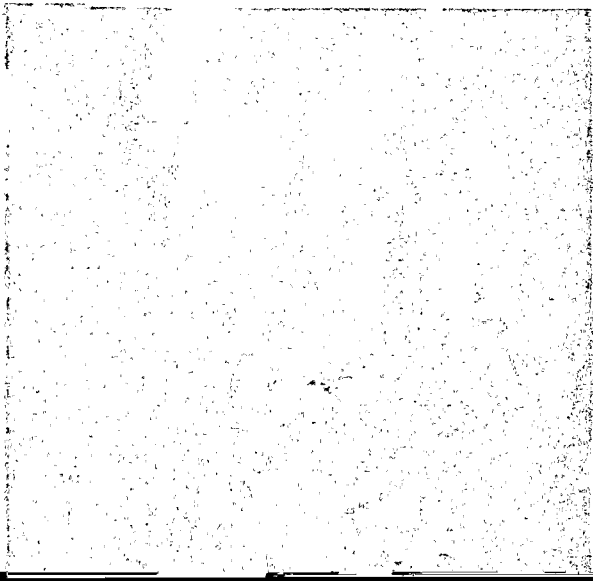
### Embryogenèse somatique directe

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).



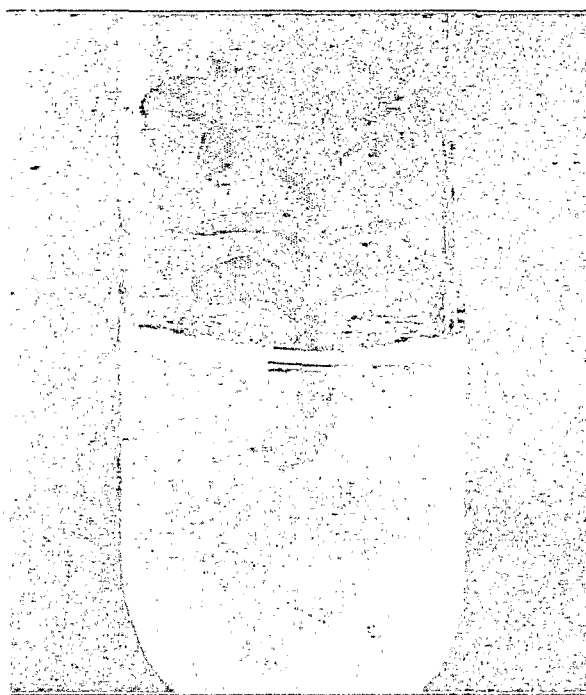


Photo 9. — Plantule d'Arabusta issue d'un embryon somatique, repiquée sur milieu d'enracinement

## 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 cal primaire, soit après formation de cal 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 cal 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 cotylédonaires 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 cotylédonaire 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-dichlorophénoxy-

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-dichloro-