

Biotechnologies/Biotechnologies
(Physiologie végétale/Plant Physiology)

Reprise de l'embryogenèse adventive à partir d'embryons somatiques de caféier (*Coffea arabica* L.) après leur congélation dans l'azote liquide

Anna BERTRAND-DESBRUNAIS, Jacques FABRE, Florent ENGELMANN, Jean DEREUDDRE
et André CHARRIER

Résumé — Des embryons somatiques de caféiers (*C. arabica* L.), obtenus à partir d'explants foliaires, survivent à une congélation à -196°C . Les jeunes embryons sont isolés puis cultivés pendant 24 h sur un milieu enrichi en saccharose (0,75 M). Ils sont ensuite mis à incuber pendant 2 h dans une solution cryoprotectrice contenant la même concentration en saccharose et 5 % de diméthylsulfoxyde. Placés dans des ampoules cryobiologiques, ils sont alors congelés lentement, jusqu'à -40°C , avant d'être plongés et conservés dans de l'azote liquide. Après un réchauffement rapide dans un bain-marie à 40°C , les embryons sont repiqués chaque jour sur des milieux dont la concentration en saccharose est progressivement abaissée jusqu'à la valeur standard de 0,1 M. Le taux de reprise de l'embryogenèse adventive atteint 50 %, 17 semaines après le réchauffement. Les premières plantules, obtenues *in vitro* à partir de matériel congelé, ont un développement apparemment normal. Dans un proche avenir, la technique mise au point pourrait être élargie à d'autres espèces actuellement entretenues en champ par les stations de recherche caféière.

Adventive embryogenesis recovery from coffee (*Coffea arabica* L.) somatic embryos after freezing in liquid nitrogen

Abstract — Coffee somatic embryos obtained from *C. arabica* L. leaf explants survive after freezing to -196°C . Young isolated embryos were precultured for 24 hrs. on medium enriched with sucrose (0.75 M). Incubation was performed at 20°C in cryopreservative solution containing the same concentration of sucrose as preculture medium and 5% dimethylsulfoxide. After a 2 hrs. incubation, embryos were transferred into cryobiological ampoules and frozen slowly to -40°C before being immersed in liquid nitrogen. After rapid thawing in a water-bath at 40°C , embryos were subcultured daily on media containing decreasing concentration of sucrose, until the standard value, 0.1 M, was reached. Survival was assessed by somatic embryogenesis recovery. After a lag phase of 5 weeks, recovery increased progressively up to 50%, 17 weeks after thawing. The first plantlets obtained from frozen material are growing *in vitro* and have developed normally. This technique should allow long-term preservation of coffee species presently kept in field collections.

Abridged English Version — Many tropical plants produce recalcitrant seeds which are sensitive to dehydration and low temperature and thus cannot be preserved by conventional storage. For these species including coffee, relatively costly field collections are maintained in several coffee research stations: the plants remain exposed to several threats, including pathogens and natural disasters.

Germplasm preservation of these species can be solved by using *in vitro* methods [1] and by reducing subculture requirements through manipulation of physical and nutrient conditions [3]. However, for long-term storage, only ultra-low temperatures (-196°C) can guarantee the stability of germplasm without any loss of viability. Cryopreservation techniques have been used for zygotic embryos [2].

Coffee beans do not survive freezing in liquid nitrogen, even after marked preliminary dehydration [4]. Techniques have been developed recently [5] allowing true-to-type micro-propagation using somatic embryogenesis. To date, adventive embryogenesis recoveries from somatic embryos have been reported for carrot [6], oil palm [7] and Norway spruce ([8], [9]).

This paper describes a cryopreservation procedure for coffee somatic embryos.

Note présentée par Alexis MOYSE.

0249-6313/88/03070795 \$2.00 © Académie des Sciences

16 NOV. 1990

ORSTOM Fonds Documentaire

N° : 31 144 ex 1

Cote : B III p 13

An embryogenic callus line (*Fig. 1*) originally derived from a leaf explant of *C. arabica* L. var. Caturra amarillo, was provided by the C.I.R.A.D. This callus line is maintained by regular subculturing (27°C and 0.5 to 1.5 W.m⁻²) on standard medium [10] containing Murashige and Skoog salts [11], Morel and Wetmore vitamins [12], 3 × 10⁻³ M adenine, 500 mg.l⁻¹ malt extract, 4.4 × 10⁻⁶ M 6-benzylaminopurine, 0.1 M sucrose and 7 g.l⁻¹ agar.

For cryopreservation, globular embryos, measuring about 150 to 300 μm, were isolated from callus. They were precultured overnight at 27°C on standard solid culture medium supplemented with 0.75 M sucrose. The specimens were transferred to preculture liquid medium at room temperature (20°C) and were treated with a solution of dimethylsulfoxide (DMSO) in preculture medium. This cryoprotective solution was added over a period of 30 min. until the final DMSO concentration of 5% (V/V) was reached.

After 2 hrs. incubation at 20°C, embryos in 1 ml of cryoprotective liquid medium were dispensed into sterile polypropylene screw-top ampoules and frozen at 0.5°C.min⁻¹ in a controlled freezing apparatus (Minicool type by l'Air Liquide). Freezing was induced at -11°C with forceps precooled in liquid nitrogen. Once the terminal temperature of -40°C was reached, some samples were directly immersed in liquid nitrogen where they attained a temperature of -196°C. After a storage period of 1 hr., thawing was carried out in a water-bath at 40°C. Thawed embryos were transferred to solid preculture medium and were subcultured daily on media containing decreasing concentrations of sucrose until 0.1 M was reached.

All control embryos subcultured on standard culture medium turned green and resumed growth. Regrowth was achieved in a few days by direct development and secondary somatic embryogenesis. Adventive embryos appeared preferentially at the root pole (*Fig. 2*). After pretreatment (preculture and cryoprotective treatment) and after freezing to -40 or -196°C, embryos began to turn brown. Regrowth occurred only by adventive embryogenesis (*Fig. 3*). Secondary embryos obtained after cryogenic storage differentiated *in vitro* and gave normal plantlets (*Fig. 4*).

The somatic embryogenesis recovery rate during post treatment increased gradually and was noticeably influenced by successive stages of the cryoprotective procedure (*Fig. 5*). For control embryos, the maximum embryogenesis rate (100%) was achieved in two weeks. However, while every pretreated embryo recovered somatic embryogenesis, the maximum recovery rate of 100% was only reached after 15 weeks.

After freezing to -40 or -196°C, embryogenesis recovery dropped to 45-50%. The maximal recovery rates were obtained 17 weeks after freezing and thawing. The first adventive embryos appeared after 3 (freezing to -40°C) or 5 weeks (freezing to -196°C) after thawing. Pretreatment and freezing increased considerably the lag phase for embryo neoformation.

In conclusion, somatic embryos of *C. arabica* L. have been successfully preserved at the temperature of liquid nitrogen. Relatively high-level recovery of adventive embryogenesis has been obtained without addition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) during post-treatment: the method employed minimizes the risk of somaclonal variations.

After storage in liquid nitrogen, somatic embryogenesis recovery occurred after a lag phase of several weeks depending on the physiological stage of the embryo and on the pretreatment conditions. Thus, in Norway spruce, relatively long lag phases have been obtained [8] which can be shortened dramatically by preculturing embryos on a medium containing a high concentration of sucrose [9]. Similar results were obtained with apical shoot tips of carnation [13].

Complementary studies are necessary to improve the recovery rates of coffee somatic embryos, to shorten the lag phase, and to obtain direct regrowth of embryos. However, germplasm preservation of coffee, the seeds of which are recalcitrant, is now a possibility. The technique employed should be extended to other species for future use in breeding programmes.

INTRODUCTION. — De nombreuses plantes tropicales ont des graines de courte viabilité. Ces plantes sont dites « récalcitrantes » aux méthodes de stockage couramment employées, utilisant une dessiccation et un maintien à basse température (-18 à $+5^{\circ}\text{C}$). Pour ce groupe d'espèces, auquel appartient le caféier, les collections sont conservées en champs dans plusieurs stations de recherche caféière; elles restent cependant exposées à divers risques. La conservation des ressources génétiques de ces espèces peut être facilitée par l'introduction des souches, sous différentes formes, en culture *in vitro* ([1], [2]) et par l'application de diverses techniques permettant d'espacer les repiquages [3]. Cependant, seule une conservation dans l'azote liquide (-196°C) peut permettre un stockage de plusieurs dizaines d'années sans perte de la viabilité.

La cryoconservation de structures organisées de caféier a déjà été tentée. Toutefois, selon Becwar et coll. [4], des graines entières de *C. arabica* L. (var. Bourbon) ne survivent pas à une congélation dans l'azote liquide, malgré une déshydratation préalable à 8 % d'humidité relative.

Des travaux récents de Söndhal et coll. [5], ont montré que la multiplication des souches de caféiers par embryogenèse somatique était possible jusqu'à la remise en conditions *in vivo* et que cette méthode pouvait être considérée comme permettant d'obtenir un matériel conforme. De plus, une reprise de l'embryogenèse a pu être obtenue après congélation dans l'azote liquide, d'embryons somatiques de carotte [6], de palmier à huile [7] et d'épicéa ([8], [9]).

Cette Note présente les premiers résultats concernant la reprise de l'embryogenèse adventive à partir d'embryons somatiques de caféier ayant été congelés dans l'azote liquide.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — MATÉRIEL VÉGÉTAL. — Des cals à croissance rapide, provenant d'explants foliaires de *Coffea arabica* L. (cv. Caturra amarillo), ont été fournis par le laboratoire C.I.R.A.D. de Montpellier. Ces cals, repiqués tous les 2 mois selon la méthode de Dublin [10] brunissent et deviennent fortement embryogènes lorsqu'ils sont placés à 27°C et en lumière atténuée ($0,5$ à $1,5 \text{ W. m}^{-2}$).

Le milieu de culture standard utilisé comprend les éléments minéraux de Murashige et Skoog [11], le mélange de vitamines de Morel et Wetmore [12], 3.10^{-3} M d'adénine, 500 mg.l^{-1} d'extrait de malt, $4,4.10^{-6} \text{ M}$ de 6-benzylaminopurine, $0,1 \text{ M}$ de saccharose et 7 g.l^{-1} d'agar.

Les embryons somatiques, utilisés dans cette étude sont globulaires (d'un diamètre de 150 à $300 \mu\text{m}$ environ), blanc-nacré, et regroupés en massifs (fig. 1). Dès la préculture ils sont isolés les uns des autres.

MÉTHODE DE CONGÉLATION. — La méthode utilisée pour la cryoconservation des embryons comprend plusieurs phases :

(a) La préculture : les embryons sont placés pendant 24 h à 27°C , en boîtes de Petri, sur un milieu enrichi en saccharose ($0,75 \text{ M}$).

(b) Le traitement cryoprotecteur : les embryons sont ensuite mis en suspension à 20°C dans un milieu liquide de même concentration en saccharose que celui de la préculture; une quantité égale d'une solution contenant 0,75 M de saccharose et 10 % (V/V) de diméthylsulfoxyde (DMSO) est ajoutée progressivement au milieu.

(c) Le refroidissement : après 2 h d'incubation, les embryons sont placés dans des ampoules cryobiologiques contenant 1 ml du mélange cryoprotecteur. Les échantillons sont progressivement refroidis de 0,5°C par minute, en utilisant un congélateur programmable (type Minicool, commercialisé par l'Air Liquide). Après un premier refroidissement, jusqu'à -11°C, la cristallisation est induite avec des pinces préalablement refroidies dans de l'azote liquide. Dès que la température de -40°C est atteinte, les échantillons sont directement plongés dans l'azote liquide, où ils sont stockés pendant au moins 1 h.

(d) Le post-traitement : après un réchauffement rapide de 2 mn, dans un bain thermostatisé à 40°C, les embryons sont d'abord transférés sur le même milieu solide que celui de la préculture, contenant 0,75 M de saccharose. Ils sont ensuite repiqués les jours suivants sur des milieux dont la concentration en saccharose est abaissée progressivement : 0,5, 0,3 et 0,1 M respectivement.

EXPRESSION DES RÉSULTATS. — Les résultats sont exprimés par le taux de reprise de l'embryogenèse adventive. Celui-ci est donné par la proportion d'embryons traités pour lesquels une reprise de la prolifération a été observée. 60 embryons (en deux expériences indépendantes) ont été utilisés pour chaque condition.

RÉSULTATS. — La survie, puis la reprise de l'embryogenèse adventive diffèrent selon le traitement subi par les embryons.

Pour les embryons témoins, placés sur le milieu standard, on observe simultanément un développement des embryons isolés, qui verdissent, et une néoformation précoce d'embryons globulaires blancs au pôle radiculaire (*fig. 2*). Après le prétraitement (préculture et traitement cryoprotecteur), une congélation à -40°C (prérefroidissement) ou à -196°C, les embryons brunissent; leur croissance est arrêtée. Après un temps de latence de 2 semaines au moins, des embryons secondaires, néoformés, apparaissent à leur surface, sans localisation précise (*fig. 3*). Comme pour les souches témoins, il est possible d'isoler des embryons somatiques. Ceux-ci sont actuellement cultivés sur un milieu favorisant la croissance. Leur développement en plantules a pu être obtenu (*fig. 4*).

L'évolution des taux de reprise de l'embryogenèse adventive, en fonction de la durée du post-traitement (culture sur milieu standard de multiplication), est indiquée sur la figure 5. Pour les embryons témoins, les premières formations adventives apparaissent moins d'1 semaine après la mise en culture, et 15 jours suffisent pour obtenir un taux de reprise de 100 %. Dans le cas des embryons n'ayant subi que le prétraitement (préculture et traitement cryoprotecteur), le taux maximal de reprise est également atteint. Cependant, le rythme d'apparition des embryons adventifs est plus progressif puisque 15 semaines sont nécessaires pour obtenir la valeur de 100 %.

La congélation jusqu'à -40 ou -196°C a pour effet de diminuer le pourcentage de reprise : les embryons néoformés n'apparaissent que dans 45 à 50 % des cas. Ces valeurs ne sont obtenues qu'après 17 semaines de post-traitement sur le milieu standard. De plus, 3 semaines (refroidissement à -40°C) ou 5 semaines (refroidissement à -196°C), sont nécessaires avant l'apparition des premiers signes de reprise de l'embryogenèse adventive. Aucune différence significative entre les pourcentages de reprise des embryons congelés à -40°C et des embryons congelés à -196°C n'a été décelée ($p=0,01$).

DISCUSSION. — Avec la méthode décrite, les embryons congelés présentent une reprise d'au moins 50 %, pour le cultivar utilisé. Ce taux élevé a été obtenu avec une technique simple n'employant pas de composé organochloré, comme l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), afin de limiter les risques de variation encourus. Cette substance de croissance, déjà utilisée pour accélérer la reprise de la prolifération, après l'azote liquide [7], n'est pas nécessaire en effet, dans le cas des souches embryogènes de caféier. De plus, cette étude a été faite sur des embryons somatiques. Ceux-ci permettent un meilleur maintien de la stabilité génétique par rapport aux souches entretenues en cultures cellulaires.

La reprise de l'embryogenèse après une congélation dans l'azote liquide demande une période de latence d'au moins 5 semaines. Ce temps de latence diffère de façon sensible d'un embryon à l'autre puisque 17 semaines sont nécessaires pour que le taux de reprise de 50 % soit atteint. Or une phase de latence prolongée peut être source de variation et même d'une importante sélection. La durée de latence peut dépendre des conditions du prétraitement. Ainsi, pour les cals embryogènes d'épicéa, la période de latence peut atteindre 5 semaines [8], en l'absence de préculture ou seulement 3 jours [9], si les cals ont été précultivés sur des milieux enrichis en saccharose. Des résultats similaires ont également été obtenus avec des méristèmes d'œillets [13]. Les modalités de la reprise de la croissance dépendent étroitement des conditions du prétraitement. Il est possible aussi que la durée nécessaire à l'apparition des premiers embryons adventifs soit en rapport avec l'état physiologique des embryons prélevés.

Seule la reprise de l'embryogenèse adventive a été obtenue. Il serait souhaitable d'obtenir une reprise directe du développement des embryons. Après une conservation dans l'azote liquide, cette propriété n'a été montrée que dans le cas d'embryons au stade globulaire ([6], [8], [9]).

Des recherches complémentaires sont donc nécessaires afin d'améliorer le taux de reprise de la prolifération des embryons somatiques de caféier et de réduire le temps de latence qui sépare le réchauffement des premières néoformations. De plus une vérification ultérieure en champ serait souhaitable avant d'envisager la cryoconservation comme moyen de conservation des ressources génétiques des caféiers. Ainsi, par la suite, l'étude sera élargie à d'autres variétés de *C. arabica* et à différentes espèces du genre *Coffea*.

ABRÉVIATIONS. — C.I.R.A.D. : Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, avenue du Val-de-Montferrand, B.P. n° 5035, 34032 Montpellier Cedex.

O.R.S.T.O.M. : Institut Français de Recherche pour le Développement en Coopération, 213, rue Lafayette, 75480 Paris Cedex 10.

Nous tenons à remercier M. Pierre Dublin (C.I.R.A.D.) pour ses conseils et la mise à notre disposition de la souche utilisée.

Ce travail a été financé par la convention C.E.E.-CAFE, contrat TSDA 212F.

Note reçue le 12 septembre 1988, acceptée le 10 octobre 1988.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] A. CHARRIER, C. R. 11^e coll. ASIC, Lomé, 1986, p. 403-425.
- [2] B. W. W. GROUT, In: L. A. WITHERS et P. G. ALDERSON, *Plant tissue culture and its agricultural applications*, Butterworths, Londres, 1986, p. 303-309.
- [3] K. K. KARTHA, L. A. MROGINSKI, K. PAHL et N. L. LEUNG, *Plant Science Letters*, 22, 1981, p. 301-307.

- [4] M. R. BECWAR, P. C. STANWOOD et K. W. LEONARD, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 108, 1983, p. 613-618.
 [5] M. R. SONDHAL, T. NAKAMURA et W. R. SHARP, In: *Basic Life Science*, 32, *Tissue culture in forestry and agriculture*, Plenum Press, New York, 1985, p. 141-143.
 [6] L. A. WITHERS, *Plant Physiol.*, 63, 1979, p. 460-467.
 [7] F. ENGELMANN, Y. DUVAL et J. DEREUDDRE, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 301, série III, 1985, p. 111-116.
 [8] P. K. GUPTA, D. J. DURZAN et B. J. FINKLE, *Can. J. For. Res.*, 17, 1987, p. 1130-1134.
 [9] M. GALERNE et J. DEREUDDRE, *Annales de l'AFOCEL*, 1987 (sous presse).
 [10] P. DUBLIN, *Café, Cacao, Thé*, 25, 1981, p. 237-242.
 [11] T. MURASHIGE et F. SKOOG, *Physiol. Plant.*, 15, 1962, p. 473-497.
 [12] G. MOREL et R. H. WETMORE, *Am. J. Bot.*, 38, 1951, p. 141-143.
 [13] J. DEREUDDRE, K. K. KARTHA et C. GAZEAU, *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 133, *Actualités Bot.*, (3), 1986, p. 75-88.

A. B.-D. : *Laboratoire de Physiologie végétale*,
 O.R.S.T.O.M., 70-74 route d'Aulnay, 93143 Bondy Cedex;
 A. B.-D., J. F., F. E. et J. D. : *Laboratoire de P.O.V.A.R., C.N.R.S.*,
 4, ter route des Gardes, 92190 Meudon;
 A. C. : O.R.S.T.O.M., B.P. n° 5045, 34032 Montpellier Cedex.

EXPLICATIONS DE LA PLANCHE

- Fig. 1. — Culture en conditions standard. Embryons (E) globulaires, blanc-nacré, sur cal brun (B). Sur les figures 1 à 3, les traits représentent 100 μ m.
 Fig. 1. — *Young embryos (E) used for cryopreservation. They are obtained from brown callus (B) on standard culture medium. The magnification bars in Figures 1 to 3 represent 100 μ m.*
 Fig. 2. — Embryon témoin après 1 mois de croissance. Néoformations embryogènes (N) au pôle radiculaire. Ébauches cotylédonaire (D).
 Fig. 2. — *4-week aged control embryo growing on standard culture medium. (D) cotyledonary primordium, (N) proembryoids at the root pole.*
 Fig. 3. — Reprise de l'embryogenèse adventive (A) sur un embryon (F), 7 semaines après la sortie de l'azote liquide.
 Fig. 3. — *Deep-frozen embryo (F) showing adventive embryogenesis recovery (A), 7 weeks after thawing.*
 Fig. 4. — Plantule en croissance *in vitro*. Cotylédons (C) développés, hypocotyle (H), racine (R), gemmule (G).
 Fig. 4. — *Growing in vitro plantlet obtained from embryo after freezing in liquid nitrogen. Root (R), shoot apex (G), hypocotyl (H), cotyledonary leaves (C).*
 Fig. 5. — Évolution du taux de reprise R (%) de l'embryogenèse adventive d'embryons isolés repiqués sur le milieu standard contenant 0,1 M de saccharose, en fonction de la durée de culture D (en semaines); (★) embryons témoins, (○) embryons prétraités, (□) embryons refroidis à -40°C , (Δ) embryons congelés à -196°C . Les embryons seulement prétraités et ceux refroidis à -40 ou -196°C sont d'abord repiqués, jour après jour, successivement, sur des milieux contenant 0,75, 0,5 et 0,3 M de saccharose avant d'être transférés sur le milieu standard. Les traits verticaux représentent les intervalles de confiance, à un seuil de probabilité de 95 %.
 Fig. 5. — *Changes in adventive somatic embryogenesis R (%), for isolated embryos, as a function of the duration D (in weeks) of growth on standard culture medium containing 0.1 M sucrose. (★) control embryos, (○) pretreated embryos, (□) embryos after freezing to -40°C , (Δ) embryos after a freeze cycle to -196°C . Pretreated embryos or frozen embryos were subcultured daily on media containing successively 0.75, 0.5 and 0.3 M sucrose. Then they were transferred onto standard culture medium. Vertical bars indicate standard deviation ($p=0.05$).*

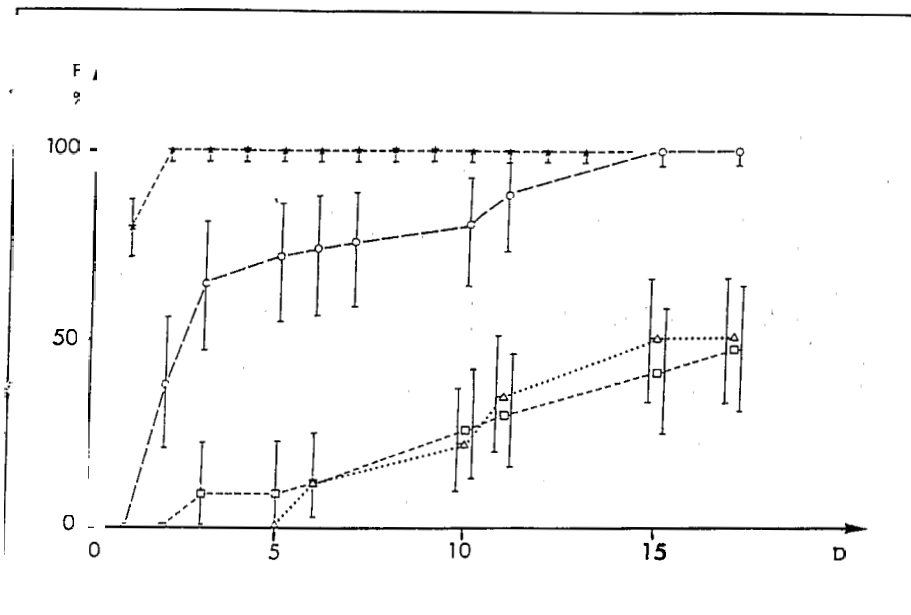
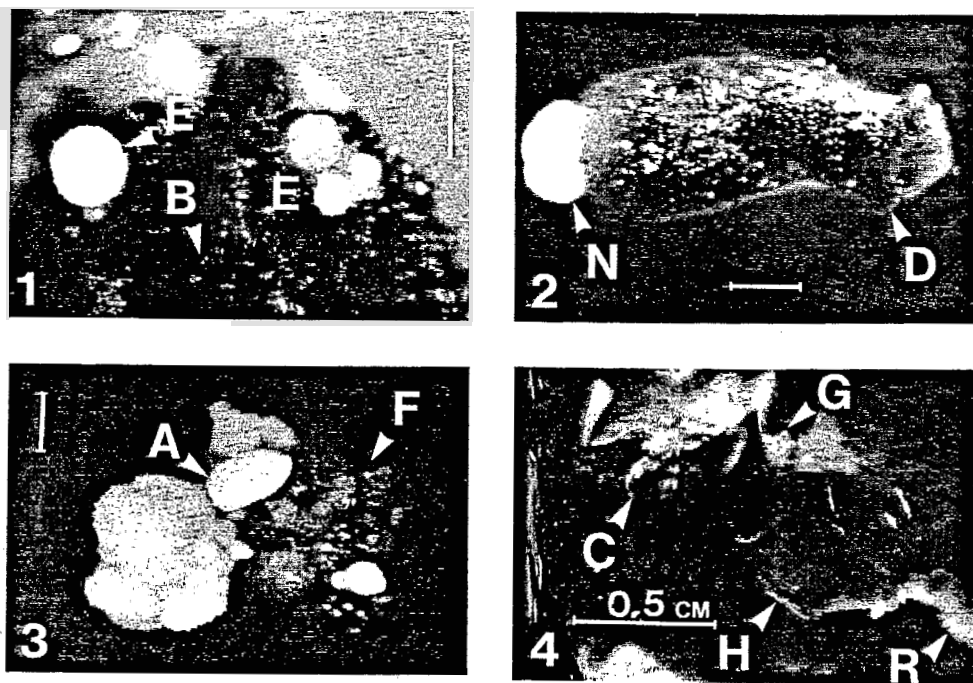


Fig. 5