

## Mise en évidence d'un marqueur protéique différenciant deux types de cals issus de mêmes clones chez le Palmier à Huile (*Elaeis guineensis* Jacq.)

Philippe MARMEY, Isabelle BESSE et Jean-Luc VERDEIL

**Résumé** — La régénération du Palmier à Huile passe par une phase d'embryogenèse somatique où deux types de cals peuvent être utilisés. Un type de cal conduit à une malformation des inflorescences des plantes régénérées, l'autre permet une régénération conforme. Une analyse des profils protéiques par électrophorèse monodimensionnelle permet d'identifier pour trois clones étudiés un marqueur protéique discriminant les deux types de cals.

### A proteic marker found to differentiate two types of calli of the same clones of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)

**Abstract** — Regeneration of oil palm plantlets has been achieved through two different types of calli. Arguments have recently been put forward to implicate one of the two types in oil palm inflorescence malformation. A proteic marker can characterize, for three clones, one type of callus after one-dimensional electrophoresis.

**Abridged English Version** — Regeneration of clonal oil palm plantlets has been demonstrated successfully during the past few years through procedure which involved somatic embryogenesis on calli [1]. Two types of calli can lead to embryogenesis (Fig. 1): the primary calli (called nodular) and the fast growing calli (called CCR) that arise spontaneously from primary calli [2]. The process of ORSTOM-IRHO involves the nodular calli for the mass production of plantlets whose conformity in the plantation is nowadays checked. However, type CCR, not included in the process, leads to plantlets that all have malformations of the inflorescences [3].

The primary calli are characteristically compact, rather organized and nodular. Calli from type CCR are friable and are in fact clumps of numerous meristematic cells in division ([4], [5]). In this paper, we propose to compare for three clones the proteic patterns of the two types of calli.

**MATERIAL AND METHODS.** — *Plant material.* — Three clones are used: A and C are clones of calli obtained respectively from a normal and abnormal tree, planted in Ivory Coast, regenerated from a nodular callus. B is a callus obtained during the cloning of a normal tree, also planted in Ivory Coast. Cultures of calli, either nodular or CCR, are grown under 12 hours' light at  $40 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , on a medium containing an auxin (2-4D) and a cytokinin (BAP) [6]. Maintenance of cultures involves routine of subculture of calli, at six-week intervals for the nodular type and three-week intervals for type CCR. Extraction of proteins takes place two months after separation of the two calli, when CCR calli are big enough.

*Protein extraction.* — The callus is ground into powder in liquid nitrogen in a mortar. The powder is homogenized with a polytron at 4°C in extraction buffer [50 mM Tris/HCl; 10 mM NaCl; 1 mM Dithiothreitol (DTT); 2 mM Phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF)]

Note présentée par Alexis MOYSE.

189 92  
p. 5

and then centrifuged at 10,000 g for 30 min. at 4°C; the supernatant is then kept at -20°C. Concentrations of proteins samples are estimated according to Bradford [7].

*One-dimensional electrophoresis of proteins.* — Gels are performed using the modified Laemmli discontinuous buffer system [8], using 15% acrylamide for the analytical portion with a 7% acrylamide stacking gel. High range molecular weight markers (Pharmacia) are used. 20 µg of proteic extracts are load into the gel per well after 5 min. of boiling. Gels are silver stained [9] after migration.

RESULTS. — The two types of calli, with a morphological different aspect (*Fig. 2*), show also differences for the concentration of the soluble proteins; nodular calli are two to four times richer in proteins (Table).

Protein patterns of the two types of calli for clones A, B and C (with migration of two proteic extracts for the clone C) are shown in Figure 3. Two differences are well repeated between nodular and CCR calli patterns. A band at 22.2 kd is observed only in the CCR type pattern. A 21.5 kd band is less important in the patterns corresponding to the CCR type. These results are observed for two other clones.

DISCUSSION. CONCLUSION. — This study reveals a 22.2 kd proteic marker that discriminates the two types of calli. The decrease of intensity of the 21.5 kd is interesting; this could be an equilibrium between the two polypeptides. These results are important because of the great correlation between the type of calli used and the conformity of the regenerated plant.

Studies on calli at the hormonal level show a perturbation of the cytokinin metabolism only for type CCR [10]. The association of our proteic study with hormonal results will help us to know if the presence of the 22.2 kd protein is correlated to the hormonal perturbation and so to the abnormality due to *in vitro* culture.

---

INTRODUCTION. — La régénération du Palmier à Huile à partir d'explants foliaires fait intervenir une phase d'embryogenèse somatique indirecte [1]. Deux types de cals peuvent s'orienter vers l'embryogenèse (*fig. 1*) : des cals nodulaires compacts et des cals appelés cals à croissance rapide (CCR) pouvant apparaître de façon spontanée sur des cals nodulaires [2]. Le type « cal nodulaire » choisi dans le procédé ORSTOM-IRHO permet la production en masse de plants dont la conformité est aujourd'hui vérifiée en plantation alors qu'inversement, le type « CCR », non retenu pour la production en masse de plants, donne des vitroplants qui présentent tous une malformation des inflorescences [3].

Les cals de type CCR, d'une couleur blanchâtre, possèdent une texture plus granuleuse et friable que les cals nodulaires de couleur brunâtre [1]. Des coupes histologiques ont révélé que les cals nodulaires ont une différenciation tissulaire avec une assise méristématique de type cambium alors que les cals de type CCR sont un ensemble de massifs de cellules méristématiques en division ([4], [5]). Dans cette étude, nous nous proposons de comparer sur trois clones les profils protéiques des deux types de cals.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — *Matériel végétal.* — Trois clones sont étudiés : A et C sont des clones de cals obtenus respectivement sur un individu normal et anormal, planté en Côte-d'Ivoire, régénéré à partir de cals nodulaires. B est un cal obtenu lors du clonage d'un individu normal, lui aussi planté en Côte-d'Ivoire. Les cals, nodulaire ou CCR, sont conservés sous lumière 12 h par jour à 40 µE/m<sup>2</sup>/s, sur un milieu dit d'embryogenèse contenant une auxine (2-4D) et une cytokinine (BAP) [6]. Les cals de type CCR sont

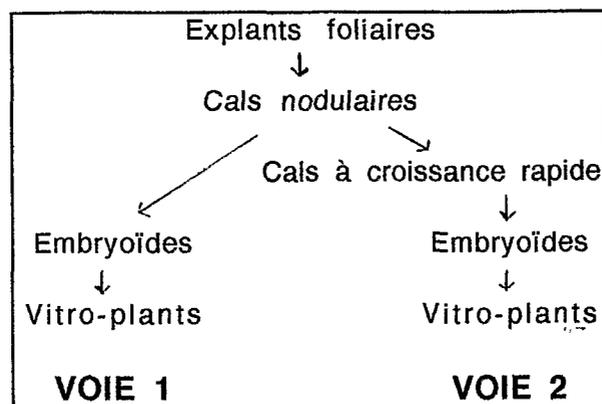


Fig. 1. — Les deux voies de régénération du Palmier à Huile par embryogenèse somatique.

Fig. 1. — The two procedures of regeneration of oil palm tree through somatic embryogenesis.

repiqués tous les mois, deux fois plus souvent que les cals nodulaires. L'extraction des protéines des cals a lieu 2 mois après isolement des deux types de cals, quand les CCR ont une masse suffisamment importante pour une extraction des protéines.

*Extraction et dosage des protéines.* — Le cal est broyé à l'aide d'un mortier dans l'azote liquide, puis homogénéisé avec un polytron à 4°C avec le tampon d'extraction [50 mM Tris/HCl; 10 mM NaCl; 1 mM Dithiothreitol (DTT); 2 mM Phénylméthylsulphonylfluoride (PMSF)]. Le broyat est ensuite centrifugé à 10 000 g pendant 30 mn à 4°C pour ne garder que le surnageant (conservé à -20°C). Les protéines sont dosées selon la méthode de Bradford [7].

*Electrophorèse mono-dimensionnelle de protéines.* — Les gels polyacrylamides mono-dimensionnels utilisés correspondent au système modifié par Laemmli [8]. Le pourcentage d'acrylamide est respectivement de 15 et 7% pour le gel analytique et le gel de peigne. 20 µg d'extrait protéique sont disposés dans chaque puits après un temps d'ébullition de 5 mn. Les marqueurs de masses moléculaires couvrent la gamme 14,4-94 kd (Pharmacia). Après migration, les gels sont colorés au nitrate d'argent [9], puis fixés 1 h dans une solution aqueuse (45% méthanol; 9% acide acétique) puis séchés.

**RÉSULTATS.** — Les deux types de cal, qui ont un aspect morphologique différent (fig. 2), présentent également des différences au niveau des protéines solubles. Les résultats montrent que les cals de type nodulaire sont de deux à quatre fois plus riches en protéines que les cals de type CCR (tableau).

La figure 3 présente les profils protéiques des deux types de cals pour différents clones (clones A, B et C) avec pour le clone C migration de deux extraits protéiques pour chaque type de cal. Deux différences sont répétées entre profils des cals nodulaires et profils des cals de type CCR. La bande observée à 22,2 kd est uniquement présente chez les profils protéiques des cals CCR. La bande estimée à 21,5 kd est présente dans les profils de cals nodulaires diminue d'intensité dans les profils des cals de type CCR. Ces deux observations sont vérifiées pour deux autres clones.

**DISCUSSION. CONCLUSION.** — L'étude électrophorétique met en évidence un marqueur protéique d'une masse moléculaire estimée à 22,2 kd discriminant les deux types de cals. La diminution d'intensité d'une bande estimée à 21,5 kd est intéressante car il pourrait s'agir d'un équilibre entre les deux polypeptides cités ci-dessus. Ces résultats deviennent

TABLEAU

Comparaison des concentrations en protéines des deux types de cals pour les trois clones étudiés (concentration en milligrammes de protéines par gramme de matière fraîche de cal). Moyenne de deux répétitions  $\pm$  SE.

*Comparison of proteins concentration of the two types of callus for three clones (concentration in mg of proteins per g of fresh weight of callus). Data are means of two replicates  $\pm$  SE.*

clone type	A	B	C
cal nodulaire	2,71 $\pm$ 0,14	2,66 $\pm$ 0,13	1,55 $\pm$ 0,08
cal type CCR	0,73 $\pm$ 0,04	0,87 $\pm$ 0,04	0,71 $\pm$ 0,04

déterminant quand on connaît la forte corrélation entre le type de cal de départ et la conformité des plantes régénérées au niveau des inflorescences.

Les études sur cals des équilibres hormonaux montrent une perturbation du métabolisme des cytokinines uniquement chez les cals de type CCR [10]. La confrontation des

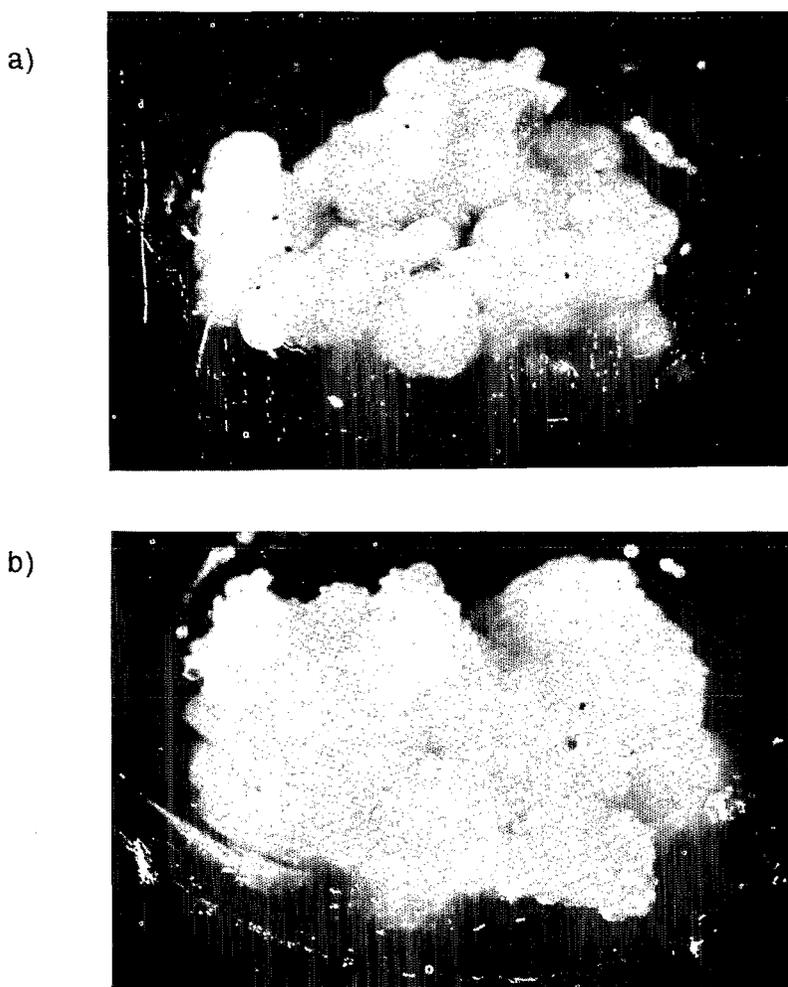


Fig. 2. — Aspect des deux types de cal sur le même milieu de culture  
(a) cal de type nodulaire; (b) cal de type CCR.

*Fig. 2. — View of the two types of callus on the same culture medium (a) Nodular callus; (b) CCR callus.*

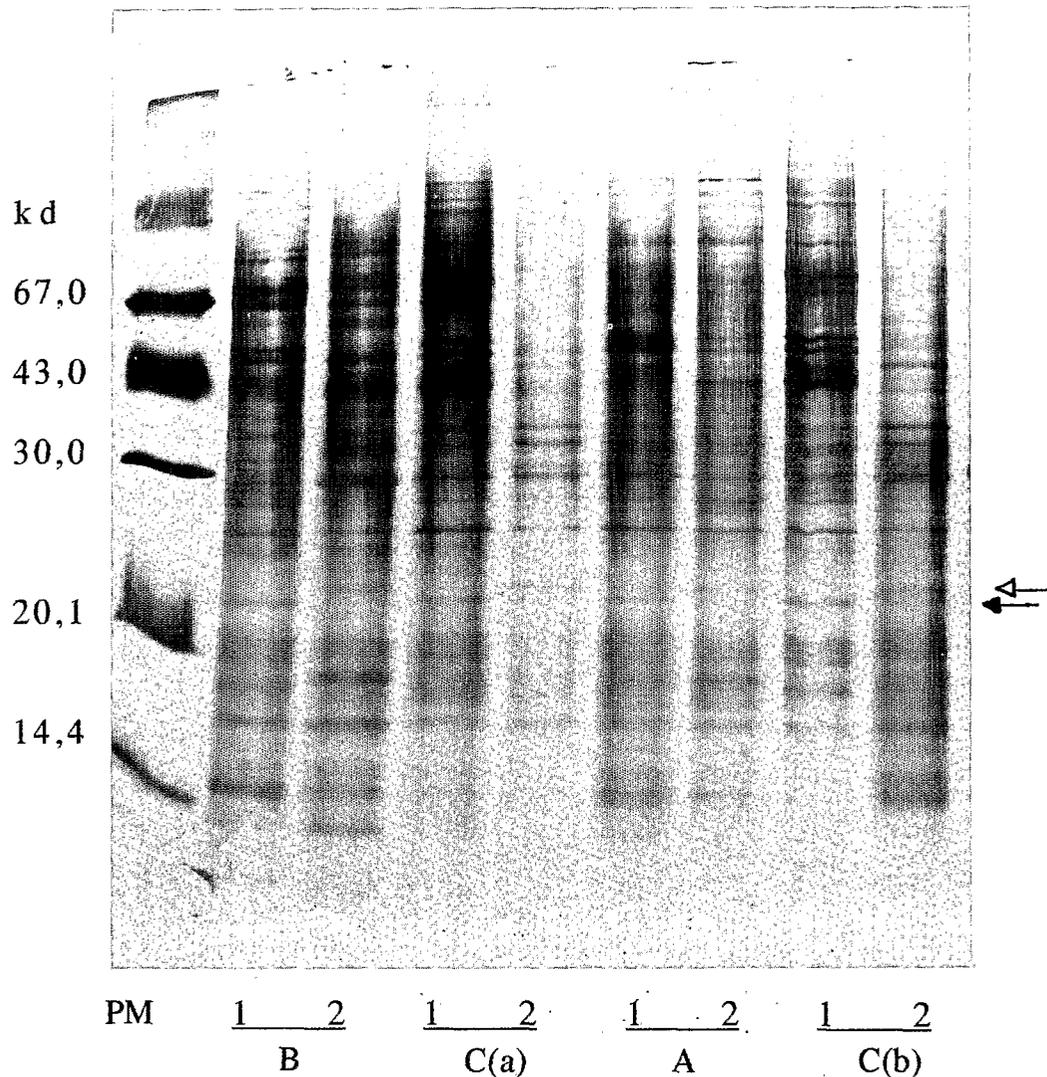


Fig. 3. — Profils protéiques sur gel de polyacrylamide. Comparaison des deux types de cals pour différents clones A, B et C avec une répétition de cals (a) et (b) pour le clone C. Mise en évidence d'une protéine spécifique (←) et de la diminution en intensité d'une bande (→) chez les cals de type CCR. 1=cal nodulaire; 2=cal de type CCR; PM=marqueur de masse moléculaire.

Fig. 3. — Polyacrylamide gel of proteins. Comparison of the two types of calli for different clones A, B and C with a repetition of calli (a) and (b) for the clone C. Characterization of a specific protein (←) and the diminution of intensity of a band (→) for the CCR calli. 1=nodular callus; 2=CCR callus; PM=molecular weight marker.

résultats de notre étude préliminaire avec l'étude des dosages hormonaux nous permettra de savoir si la présence de la protéine de 22,2 kd est liée à la perturbation hormonale, et donc à l'anomalie induite par culture *in vitro*.

Note remise le 4 mars 1991, acceptée après révision le 22 juillet 1991.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] C. PANNETIER, P. ARTHUIS et D. LIEVOUX, *Oléagineux*, 36, n° 3, 1981, p. 119-122.
- [2] H. RABECHAUT et J. P. MARTIN, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 283, série D, 1976, p. 1735-1737.
- [3] Y. DUVAL, T. DURAND GASSELIN, K. KONAN et C. PANNETIER, *Oléagineux*, 43, 1988, p. 39-47.

- [4] J. AHÉE, P. ARTHUIS, G. CAS, Y. DUVAL, G. GUENIN, J. HANOWER, D. LIEVOUX, C. LIORET, B. MALAURIE, C. PANNETIER, D. RAILLOT, C. VARECHON et I. ZUCKERMAN, *Oléagineux*, 36, n° 3, 1981, p. 113-114.
- [5] J. SCHWENDIMAN, C. PANNETIER et N. MICHAUX-FERRIERE, *Annals of Botany*, 62, 1988, p. 43-52.
- [6] J. HANOWER et C. PANNETIER, *Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture*, Tokyo, 1982, p. 745-746.
- [7] M. M. BRADFORD, *Analytical Biochemistry*, 72, 1976, p. 248-253.
- [8] U. K. LAEMMLI, *Nature*, 227, 1970, p. 680-685.
- [9] B. R. OAKLEY, D. R. KIRSH et N. R. MORRIS, *Analytical Biochemistry*, 105, 1980, p. 361-363.
- [10] I. BESSE, J. L. VERDEIL, Y. DUVAL, B. SOTTA, R. MALDINEY et E. MIGINIAC, *Proc. 14th Intl. Cong. Plant Growth Substances* (sous presse), Amsterdam, 1991.

---

P. M. : L.R.G.A.P.T. (Laboratoire des Ressources génétiques et Amélioration des Plantes tropicales  
ORSTOM (Institut français de Recherche scientifique pour le Développement en Coopération),  
B.P. n° 5045, 34032 Montpellier Cedex 1;  
I. B. et J.-L. V. : L.R.G.A.P.T., ORSTOM-I.R.H.O./C.I.R.A.D.,  
B.P. n° 5045, 34032 Montpellier Cedex 1.

---