

Embryogenèse somatique de cacaoyer *Theobroma cacao* L. à partir de pièces florales

ORLANDO LOPEZ-BAEZ, HÉLÈNE BOLLON, ALBERTUS ESKES, VINCENT PETIARD

Somatic embryogenesis and plant regeneration from flower parts of cocoa *Theobroma cacao* L.

BIOLOGIE DE LA
REPRODUCTION ET
DU DÉVELOPPEMENT

Reproduction
and development
biology

O. L.-B., H. B., V. P. : Francereco,
101, av. Gustave-Eiffel,
37390 Notre-Dame-d'Oe, France.
A. E. : CIRAD, av. du
Val-de-Montferrand,
34032 Montpellier, France.
Reprints : O. Lopez-Baez

ABSTRACT

Somatic embryogenesis was induced on explants from immature flower buds of *Theobroma cacao* L. The influence of hormonal composition and duration of induction have been evaluated. Embryogenesis rate was variable among explants from various genotypes. Leaved and rooted plantlets transferred in greenhouse were developed from somatic embryos. ▲

RÉSUMÉ

L'embryogenèse somatique a été induite à partir de pièces florales prélevées sur des boutons immatures de *Theobroma cacao* L. L'influence de la composition hormonale et la durée nécessaire à l'induction de l'embryogenèse ont été étudiées. Des taux d'embryogenèse variables ont été observés selon les génotypes. Des plantules acclimatées en serre ont pu être développées à partir des embryons. ▲

Mots clés : embryogenèse somatique, pièces florales, régénération.

Key words : somatic embryogenesis, flower parts, regeneration.

Abréviations : 2,4-D : acide 2,4 dichlorophénoxyacétique; AIB : acide 3-indolbutyrique; AIA : acide 3-indolacétique; ANA : acide naphthyl-1-acétique; 2iP : 2-isopentényladénine; BAP : 6-benzylaminopurine; ABA : acide abscisique; GA3 : acide gibbérélique; MS : Murashige et Skoog (1962).

Abbreviations : 2,4-D : 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; AIB : 3-indolbutyric acid; AIA : 3-indol-acetic acid; ANA : 1-naphthylacetic acid; 2iP : N6-(2-isopentenyl)adenine; BAP : 6-benzylaminopurine; ABA : abscisic acid; GA3 : gibberellic acid; MS : Murashige and Skoog medium (1962).

ABRIDGED VERSION

Cocoa (*Theobroma cacao* L.) is an allogamous, diploid ($2n=20$) tropical crop of great economic importance. Multiplication of this plant by tissue culture has been often attempted previously but it has been found to be recalcitrant. Although somatic embryogenesis has been reported from immature zygotic embryos [1, 3, 7] from leaf tissue [2] and from nucellar and petal explants [4, 5], plantlets derived from these somatic embryos have rarely been obtained.

In this paper we report the successful regeneration of *T. cacao* via somatic embryogenesis induced from explants of flower buds. The different steps of regeneration protocol are described in Figure 1.

Excised explants obtained from immature flower buds were cultured on induction basal medium (MI) as described by Murashige and Skoog [6] (mineral salts, iron and vitamins) supplemented with different auxins and cytokinins. After 3 weeks, explants were transplanted on hormone-free basal medium containing coconut water

(100 ml/l) and subcultured every 3 weeks (Fig. 1). An embryogenic callus first became apparent from petals, staminods and anther filaments after 6-8 weeks of culture (Fig. 2A, 2B and 2C). A somatic embryogenesis ratio of 2% of explants was observed on 528 explants previously cultured into MI medium added with 2,4-D (1.5 mg/l) and 2iP (0.25 mg/l); a ratio of 6.7% was observed on 1,068 cultured explants into MI medium added with 2,4-D (2 mg/l) and kinetin (0.25 mg/l). The optimum time and the concentration of 2,4-D and kinetin for induction were studied (Fig. 3). The highest embryogenesis rate was obtained from explants cultured in 2,4-D (1 mg/l) and kinetin (0.25 mg/l) for 3 weeks. No somatic embryo was formed from explants maintained more than 3 weeks or subcultured in the induction medium. Among explants from 9 genotypes the embryogenesis ratio varied from 1.3 to 18.7%.

Somatic embryos at the end of the globular stage were transferred on maturation conditions (maturation medium MM) for 4-5 weeks, then cultured on the germination conditions. Among 419 embryos from 7 genotypes, 313 have germinated and 280 have developed into plantlets with stem, roots and leaved aerial part (Fig. 2E) after transfer in conversion and growing conditions. To induce hardening, young plants with leaves were transferred to a culture chamber. They were

Note présentée par Henri Duranton.

Note remise le 1^{er} mars 1993, acceptée après révision le 26 avril 1993.

placed on a mixture of vermiculite, sand and perlite (2/2/1), and watered with MS/4 medium without sugar. A relative humidity of 90-95 % was maintained. After 5-6 weeks each plant was transferred to a small pot (7 × 7 × 6 cm) containing soil and perlite (3/1). A

frequency of transfer survival of 76/111 was observed. At least for the first stages the subsequent growth and development of plants from somatic embryos looked normal as compared to seedlings. First plants have recently been transferred to field for further observations. ▲

Le cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) est une plante tropicale, pérenne, allogame, diploïde ($2n=20$) d'une grande importance économique. Les maladies qui attaquent la plante et le rendement faible des variétés cultivées limitent la production de cette espèce. Des programmes de sélection ont abouti à l'obtention de variétés performantes, clones et hybrides interclonaux, mais l'absence de méthodes de multiplication conforme, efficaces à grande échelle, a limité leur distribution aux producteurs. Le bouturage et le greffage horticoles présentent de nombreux désavantages.

Le développement d'une technique de multiplication par embryogenèse somatique a été tenté dans plusieurs travaux précédant cette étude. Différents tissus tels que les tiges, les feuilles, les pétioles, les ovules, les nucelles, les pédoncules floraux, les pétales et les embryons zygotiques immatures ont été mis en culture [1-4].

Jusqu'à présent, l'embryogenèse somatique a été rapportée et confirmée à partir de fragments d'embryons zygotiques

immatures âgés de 120 à 150 jours. Néanmoins, le développement des embryons somatiques en plantes pose toujours de nombreux problèmes et a rarement été obtenu. Le potentiel embryogène de tissus somatiques de plante adulte a été signalé à partir de feuilles [2], de nucelles et de pétales [4, 5]. Néanmoins, cette espèce s'est généralement montrée récalcitrante et la régénération par embryogenèse somatique est loin d'être complètement maîtrisée.

Dans cette publication sont rapportées l'induction de l'embryogenèse somatique et la régénération de plantes à partir de pièces florales de *Theobroma cacao* L.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Plusieurs expériences ont été réalisées en utilisant des boutons floraux obtenus sur des arbres âgés de 2 à 3 ans. Ces arbres sont issus de graines récoltées sur des génotypes hybrides (EET 48, EET 64, EET 94, EET 228 et CC 260). Ils

Tableau I
Composition des milieux de culture

Composant		MI	ME	MM	MG	MC
Milieu de base	MS	X1	X1	X0,5	X0,5	X0,5
L-leucine	mg/l	0,4	0,2	0,4	0,4	0,4
L-lysine	mg/l	0,4	0,2	0,4	0,4	0,4
L-tryptophane	mg/l	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2
L-arginine	mg/l	0,4	0,2	0,4	0,4	0,4
2,4-D	mg/l	1				
Kinétine	mg/l	0,25				
AIA	mg/l			0,05		
AIB	mg/l			0,05		
ANA	mg/l				0,01	
GA3	mg/l			0,02	0,02	
2iP	mg/l				0,2	
ABA	mg/l				1	
Adénine-sulfate	mg/l			0,5	0,5	
Glycine	mg/l	3	1			
Lait de coco	ml/l	50	100			
Charbon act.	g/l				1	0,15
Saccharose	g/l	40	40			
Maltose	g/l			40	80	
Glucose	g/l				40	5
Gelrite	g/l	2	2	2	3	3
pH		5,5	5,5	5,6	5,8	5,8

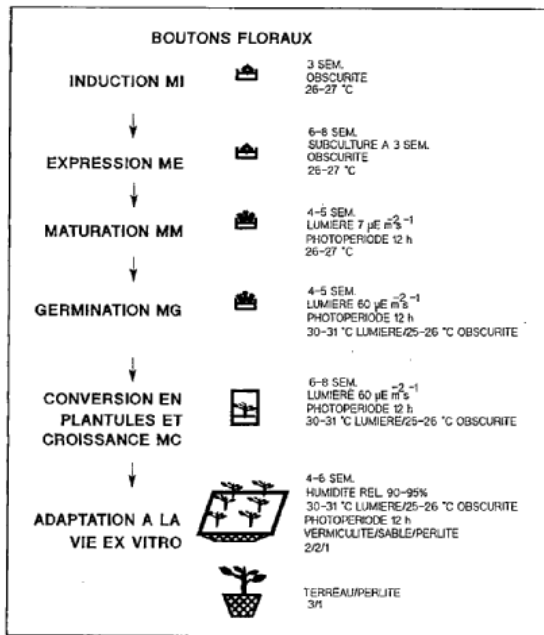


Figure 1. *Protocole de régénération de Theobroma cacao L.*

sont cultivés en serre à une température moyenne de 26 °C et une humidité relative de 80 à 90 %. Les boutons floraux de 3 à 6 mm de longueur sont stérilisés par immersion pendant 7 min dans une solution d'hypochlorite de calcium (70 % chlore actif) à 10 g/l suivie de 3 rinçages dans l'eau stérile. Puis, sous conditions aseptiques, les différentes parties (pédoncule, sépales, pétales, étamines, staminodes et ovaires) sont séparées et mises en culture.

Milieux

La composition du milieu de base correspond aux sels minéraux, au fer et aux vitamines du milieu MS [6]. Les valeurs du pH ont été ajustées, selon les milieux (*Tableau I*) avec KOH avant autoclavage. Les milieux sont stérilisés par autoclavage à 115 °C pendant 20 min.

Protocole de régénération

Les étapes successives de la régénération (induction et expression de l'embryogenèse, maturation et germination des embryons, conversion en plantules et adaptation en serre) sont réalisées selon les conditions et les durées indiquées dans la *Figure 1*. La composition des milieux nécessaires à chaque phase est présentée dans le *Tableau I*.

Induction et expression de l'embryogenèse

Lors des premières expérimentations menées pour rechercher les meilleurs milieux d'induction, on a utilisé le milieu de base supplémenté avec différentes concentrations de 2,4-D, AIA, ANA, zéatine, BAP, 2iP, kinétine, adénine et lait de noix de coco (*Cocos nucifera L.*) immature. Après 3 semaines de culture dans le milieu d'induction (MI), les explants ont été transférés sur le milieu d'expression (ME) sans hormones, avec les acides aminés réduits de moitié et complémenté avec 100 ml/l de lait de noix de coco immature. Sur la base des résultats

préliminaires seuls le 2,4-D et la kinétine ont été retenus pour le milieu MI.

Maturation et germination

A la fin du stade globulaire les embryons sont transférés dans le milieu de maturation (MM), puis dans le milieu de germination (MG). Jusqu'à la fin de la phase de germination les cultures sont réalisées en boîtes de Pétri de 55 mm de diamètre contenant 12 ml de milieu et scellées avec 2 tours de Cellophane.

Conversion en plantules et croissance

A la fin de la phase de germination, les embryons qui ont une longueur de l'axe hypocotyle d'au moins 1 cm sont transférés dans des flacons du type *baby food jar* de 140 ml contenant 35 ml de milieu de conversion (MC). Les couvercles ne sont pas fermés hermétiquement et ils sont entourés d'un tour de Cellophane.

Acclimatation en serre

Pour l'adaptation à la vie *ex vitro*, les plantes avec 2 ou 3 feuilles sont transférées en chambre de culture. Les plantes sont sevrées sur un substrat de vermiculite/sable/perlite (2/2/1), imbibé avec une solution nutritive de MS/4 sans sucre. Après 5 à 6 semaines chaque plante est transférée dans un petit pot de culture (7 × 7 × 6 cm) contenant terreau et perlite (3/1).

Résultats

Embryogenèse somatique

Dans des expériences préliminaires de recherche des meilleurs milieux pour l'induction de l'embryogenèse, 25 milieux de compositions hormonales différentes ont été ensemencés avec 1031 boutons floraux découpés. L'embryogenèse a été observée sur 2 % des explants (11/528) cultivés avec 2,4-D (1,5 mg/l) et 2iP (0,25 mg/l) et sur 6,7 % des explants (72/1068) cultivés avec 2,4-D (2,0 mg/l) et kinétine (0,25 mg/l). Cette réaction a été observée à partir de pétales, staminodes, étamines et à la base des pièces florales. Sur la base de ces résultats, le milieu complémenté avec 2,4-D et kinétine a été retenu.

La formation de structures embryogènes (*Fig. 2A, 2B et 2C*) est visible 6 à 8 semaines après mise en culture et après un deuxième repiquage dans le milieu d'expression ME. Dans la plupart des cas on observe la formation d'un cal à aptitude embryogène dans les parties basales des explants. Le cal embryogène se présente sous la forme d'une masse de couleur jaune crémeux ou marron, et formant des granules ou des nodules.

Effet de la durée d'induction et de l'équilibre hormonal

Pour l'optimisation de la phase d'induction, la quantité de kinétine a été fixée à 0,25 mg/l; la variation de la concentration de 2,4-D et la durée d'induction ont été étudiées. 56 à 70 explants ont été ensemencés par condition expérimentale. Les résultats présentés dans la *Figure 3* montrent que la meilleure induction de l'embryogenèse est obtenue avec 2,4-D 1,0 mg/l et kinétine 0,25 mg/l pendant une période de 2 à 3 semaines suivie d'un transfert dans le milieu d'expression. Une concentration de 0,5 mg/l de 2,4-D et 0,25 mg/l de kinétine pendant une période courte (1 semaine) n'est

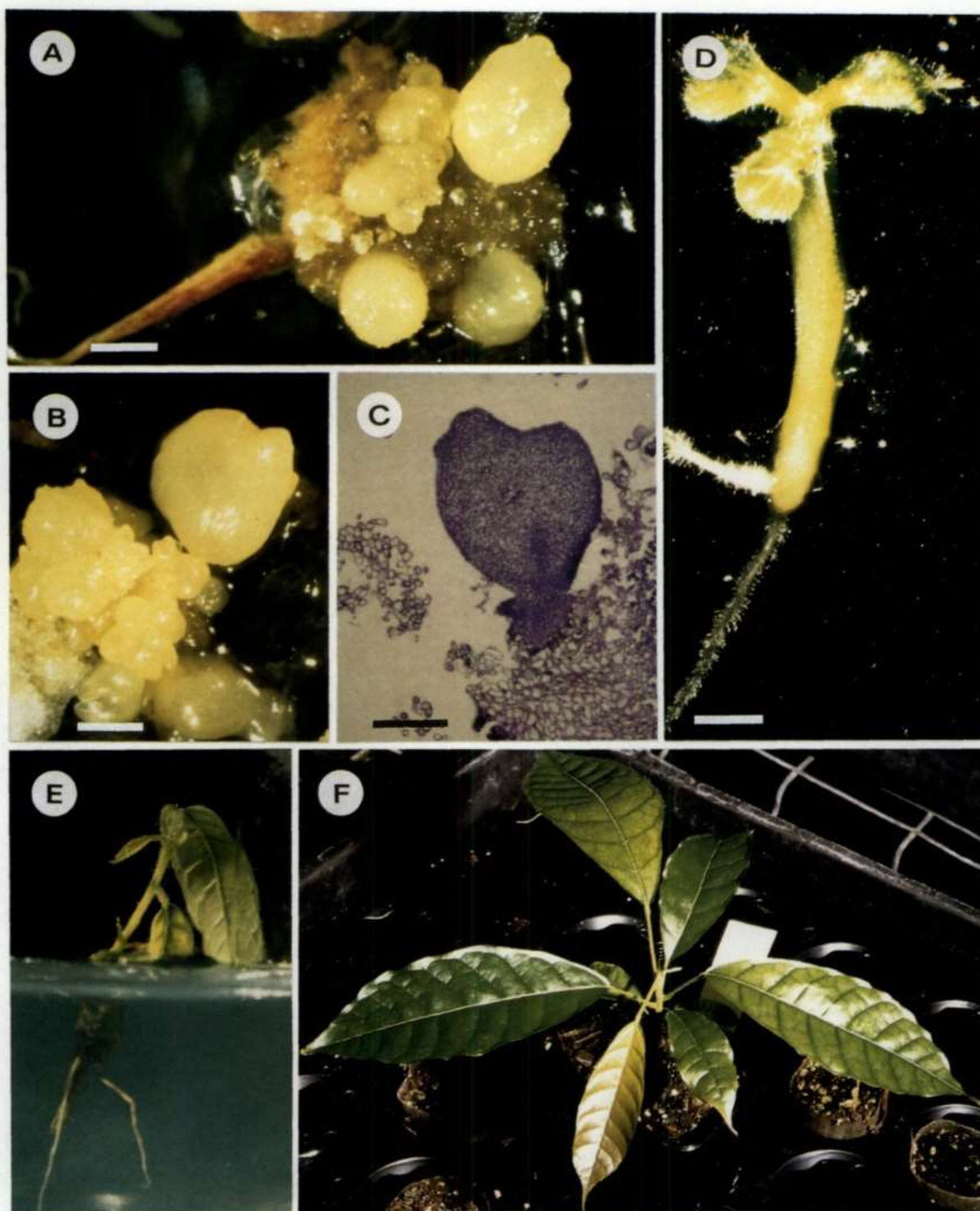


Figure 2. **Régénération de plantes de cacao par embryogenèse somatique.** A) Cal embryogène sur staminodes (barre=1 mm), B) Cal embryogène sur pétale (barre=1 mm), C) Coupe longitudinale d'embryon (barre=300 µm), D) Embryon en fin de germination (barre=2 mm), E) Plantule in vitro, F) Plante acclimatée en serre.

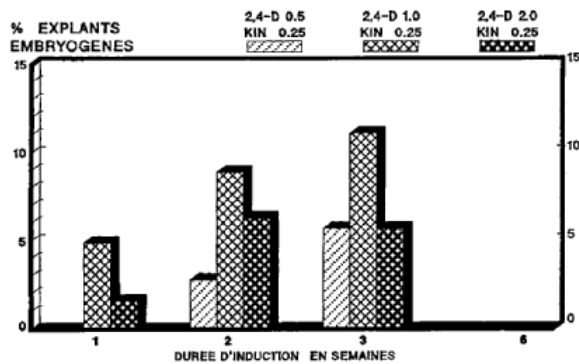


Figure 3. Effets des concentrations (mg/l) de 2,4-D et kinétine et de la durée de l'induction sur l'embryogenèse somatique de *Theobroma cacao* (EET 48).

pas suffisante pour l'induction de l'embryogenèse. Une concentration de 2 mg/l de 2,4-D réduit le pourcentage d'explants embryogènes.

Embryogenèse somatique testée sur différentes plantes

Afin d'évaluer l'aptitude embryogène de différentes plantes, le protocole a été appliqué à 9 arbres descendants de 5 clones. Les résultats montrent que chacun de ces arbres présente une aptitude embryogène; celle-ci varie de 1,3 à 18,7% selon le génotype. Néanmoins on ne peut pas affirmer que l'état physiologique des boutons floraux prélevés sur chacune des plantes était strictement similaire. Ces différences de réactivité embryogène peuvent donc être d'origine génétique ou physiologique.

Développement des embryons et conversion en plantules

La croissance normale des embryons est obtenue dans les conditions et le milieu de maturation puis de germination. L'allongement de l'axe hypocotyle et la différenciation des pôles caulinaires et racinaires ainsi qu'un développement réduit des cotylédons ont été observés (Fig. 2D). Parmi 419 embryons provenant de 7 génotypes, 313 ont germé et 280 se sont développés en plantules formant une tige, des racines et une partie aérienne avec feuilles (Fig. 2E) après transfert en milieu et conditions de conversion et de croissance. Les premières plantes transférées en chambre de culture pour leur adaptation à la vie *ex vitro* ont montré une croissance normale (Fig. 2F) avec le développement d'un axe orthotrope et des feuilles placées dans la même phyllotaxie que celle d'une plante issue de graine. Parmi 111 plantes transférées, 76 ont ainsi repris leur croissance. Les premières plantes obtenues ont été récemment transférées au champ pour des études de conformité complémentaires.

RÉFÉRENCES

- Dublin P. 1984. Cocoa. In : Ammirato P. V. et al. eds. *Handbook of plant cell culture*, vol. 3. New York : MacMillan, 541-63.
- Litz R. E. 1986. Tissue culture studies with *Theobroma cacao*. In : *Cocoa Biotechnology Symposium Proceedings*, Dimick P. S. ed., University Park, PA, Pennsylvania State University Press, 111-20.
- Pence V. C. 1989. Cocoa (*Theobroma cacao* L.). In : *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 5. Bajaj Y. P. S. ed., Berlin : Springer-Verlag, 203-21.
- Sondahl M. R., Sereduk Th. B., Bellato C. M., Chen Z. 1988. Somatic embryogenesis and plant regeneration of cacao. *European Patent Application*, Publication 0293598 A2. München. 11 p.

Discussion et conclusions

Chez *Theobroma cacao* L., le potentiel embryogène de pièces florales a déjà été mentionné par Sondahl et al. [4], aptitude qui est confirmée par les résultats de cette étude qui, cependant, utilise un protocole largement modifié par rapport à celui préalablement décrit. Le potentiel embryogène de pièces florales que nous avons obtenu varie de 1,3 à 18,7%. Récemment Sondahl et al. [5] communiquent un taux de régénération de pétales de 4,3%. Notre protocole souligne l'importance de l'équilibre hormonal et de la durée de la phase d'induction avant le transfert en milieu d'expression. Il permet aussi l'embryogenèse à partir de plusieurs types de tissus floraux tels les pétales, les staminodes et les filets d'anthers.

Bien que, dans nos conditions, l'embryogenèse somatique ait été obtenue à partir de 9 génotypes différents, il n'est pas encore possible d'extrapoler ces conclusions aux 3 grands groupes de cacao : Forastero, Criollo et Trinitario. Il faudrait pour cela des expériences complémentaires sur de nouveaux génotypes.

Des études antérieures concernant le développement des embryons somatiques du cacaoyer ont montré que la germination ne se déroule pas de façon normale. La callogenèse, l'oxydation ainsi que la croissance excessive des cotylédons empêchant la sortie de l'apex ont été signalées [3, 7, 8]. La présence d'inhibiteurs de la germination a été également suggérée [9]. Sauf dans quelques cas, un nombre très limité de plantes a pu être obtenu après l'excision des cotylédons [7, 8], par microgreffage *in vitro* de l'embryon somatique sur une plante issue de graine [10] ou par la culture en milieu liquide [11]. Les résultats obtenus dans cette étude montrent que de nouvelles conditions de culture ainsi que de nouveaux milieux utilisés pour la germination et la croissance des embryons ont permis de résoudre ces difficultés. Les embryons se sont développés de façon normale jusqu'à la conversion en plantes acclimatées à la culture *ex vitro*.

Ces résultats qui constituent l'une des premières obtentions de plantes de cacaoyer par embryogenèse à partir de tissu somatique de plante adulte permettent d'envisager la multiplication de clones améliorés de *Theobroma cacao* L. Actuellement, d'autres recherches sont en cours afin d'optimiser cette voie de multiplication sur des génotypes d'intérêt pratique. D'après des résultats préliminaires récents, il est possible d'entretenir l'embryogenèse somatique à partir de structures embryonnaires déjà formées qui prolifèrent en embryons secondaires aptes à se développer jusqu'au stade plantule. Des travaux sont actuellement en cours afin de maintenir ces souches de tissus à aptitude embryogène et d'améliorer la conversion des embryons en plantes. ▼

5. Sondahl M. R., Liu S., Bellato C. M., Bragin A. 1992. Cacao Somatic Embryogenesis from non-sexual tissues. In : *Biotechnology for Crop Improvement in Latin America*. Caracas, Venezuela. Abstract Book CTR 37.
6. Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-9.
7. Adu-Ampomah Y., Novak F. J., Afza R., Van Duren M., Perea-Dallos M. 1988. Initiation and growth of somatic embryos of cacao (*Theobroma cacao* L.). *Café Cacao Thé* 32(3): 187-200.
8. Duhem K., Le Mercier N., Boxus Ph. 1989. Données nouvelles sur l'induction et le développement d'embryons somatiques chez *Theobroma cacao*. L. *Café Cacao Thé* 33(1): 9-14.
9. Wang Y. C., Janick J. 1984. Inducing precocious germination in asexual embryos of cacao. *Hort Science* 19(6): 839-41.
10. Aguilar M. E., Villalobos V. M., Vasquez N. 1992. Production of cacao plants (*Theobroma cacao* L.) via micrografting of somatic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28: 15-9.
11. Wen M. C., Kinsella J. E. 1991. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration of *Theobroma cacao*. *Food Biotechnology* 5(2): 119-37.