

ACADEMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITE MONTPELLIER II

----- SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC -----

**T H E S E**

présentée à l'Université de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc  
pour obtenir le diplôme de DOCTORAT

SPECIALITE : PHYSIOLOGIE VEGETALE

Formation Doctorale : Bases de la production végétale

Ecole Doctorale : Biologie des systèmes intégrés-Agronomie-Environnement

**EMBRYOGENESE SOMATIQUE DU CACAOYER *Theobroma cacao* L. :  
CONSTRAINTES, PROGRES ET PERSPECTIVES.**

par

Laurence ALEMANNIO

Soutenue le 21 Décembre 1995 devant le jury composé de :

M. CORNU D., Directeur de Recherches INRA Orléans	Rapporteur
M. VASSEUR J., Professeur, Université Lille	Rapporteur
M. ANDARY C., Professeur, Faculté de Pharmacie Montpellier	Examineur
M. BERTHOULY M., Chercheur CIRAD Montpellier	Examineur
M. MACHEIX J.J., Professeur, Université Montpellier II	Président
Mme MICHAUX-FERRIERE N., Chercheur CNRS/CIRAD Montpellier	Directeur de Thèse

## -RESUME-

Le cacaoyer *Theobroma cacao* L. est une espèce pérenne, préférentiellement allogame, pour laquelle l'embryogenèse somatique à partir de tissus sporophytiques constitue un espoir pour la multiplication et distribution de matériel végétal. Une première réussite d'embryogenèse somatique à partir de boutons floraux a servi de point de départ à cette étude.

Dans un premier temps, le procédé a été testé sur 25 génotypes présents dans les serres du CIRAD à Montpellier. Dans des conditions de culture définies, des variations génotypiques ont été mises en évidence. L'obtention d'embryons somatiques n'a pu être réalisée que sur 5 génotypes qui appartiennent tous au groupe des Forastero Haut-Amazoniens. Les staminodes et les filets d'anthers sont les explants qui ont présenté la meilleure aptitude à la callogenèse, quel que soit le génotype considéré. Seuls les cals issus de ces explants ont régénéré des embryons somatiques. Un suivi histologique de l'ontogenèse des embryons somatiques a montré qu'ils sont d'origine pluricellulaire. La comparaison des teneurs endogènes en AIA et ABA des explants et cals d'un clone embryogène et d'un clone non embryogène a montré que les cals sont très riches en AIA, et particulièrement pour le génotype non embryogène.

Dans le but d'améliorer les conditions de culture, plusieurs paramètres ont été étudiés. Le premier point concerne les polyphénols, substances dont le cacaoyer est naturellement riche. Il a été montré que ces composés constituent un facteur limitant en culture *in vitro*. Une étude histochimique a été menée au sein des explants ainsi que des cals pendant les phases d'induction et d'expression de l'embryogenèse. Dès les premiers jours de culture, la plupart des cellules synthétisent de nouveaux composés, conférant à l'explant cultivé *in vitro*, un profil phénolique qui lui est propre. Ces composés ont été caractérisés par chromatographie sur couche mince bidimensionnelle, et les trois polyphénols quantitativement les plus importants ont été isolés et identifiés comme étant des amides d'acides hydroxy-cinnamiques. Une analyse quantitative a montré que les cals de cacaoyer, quels que soient le génotype et la capacité à l'embryogenèse, sont très riches en polyphénols avec une tendance plus ou moins marquée à l'augmentation des concentrations de tous les groupes de polyphénols étudiés lorsque les conditions de culture sont défavorables à l'embryogenèse somatique.

Des modifications des milieux de culture ont été entreprises en milieu solide. La recherche de conditions favorables à la sélection et à l'entretien des cellules méristématiques (à l'origine des embryons somatiques) et embryogènes, par la culture en milieu liquide en Système à Immersion Temporaire a été envisagée. Un cal friable embryogène a été obtenu. A partir de tels cals, des suspensions de cellules embryogènes cultivées en erlenmeyer ont été initiées et entretenues.

L'ontogenèse, la maturation, la germination et la conversion des embryons somatiques d'origine pluricellulaire ont été étudiées. La majorité de ces embryons montre des anomalies morphologiques. Afin d'améliorer le déroulement des phases tardives des embryons somatiques, une étude morphologique, histologique, biochimique (sucres solubles) et physiologique (paramètres hydriques) de l'embryogenèse zygotique a été réalisée. Elle est caractérisée par une période de croissance des embryons, puis par une période d'accumulation de réserves amyliques, protéiques et lipido-protéiques, pendant laquelle se produit une dessiccation lente et modérée des embryons de même qu'une modification de leur composition glucidique. L'introduction dans le protocole d'embryogenèse somatique d'une phase de croissance, ainsi que la définition d'un milieu de maturation contenant de l'ABA a permis d'améliorer la maturation des embryons.

**MOTS-CLES :** *Theobroma cacao* L., Embryogenèse somatique, Histologie, Polyphénols, Cal friable, Maturation.

## -SUMMARY-

*Theobroma cacao* L. is a perennial and allogamous crop. Somatic embryogenesis from sporophytic tissues is a great hope for the multiplication and the distribution of material. A recent work which described somatic embryogenesis from flower buds, was the starting point of this study.

Firstly, the process was tested on 25 genotypes. With the defined culture conditions, genotypic variations were observed. Somatic embryos were obtained with only 5 genotypes all belonging to the Upper-Amazonian Forastero group. Stamines and stamens were the only explants to show the best callogenesis response, whatever the genotype. Only calli produced from these explants were able to regenerate somatic embryos. An histological study showed that somatic embryos were of multicellular origin. A comparison between endogenous concentrations of IAA and ABA of the explants and calli from an embryogenic clone and a non-embryogenic one, showed that calli were very IAA rich, especially for the non-embryogenic genotype.

In order to improve culture conditions, several parameters were studied. Polyphenolics is one of those. Cocoa-tree is naturally polyphenol rich. It has been shown that these components are a limiting factor in *in vitro* culture. An histochemical study was performed at the explant level as well as in calli during induction and expression phases. Since the first culture days, most of the cells synthesize new compounds, giving to the explant cultured *in vitro*, its own phenolic profile. These compounds were characterized by bidimensional thin layer chromatography, and the three most concentrated phenolics were isolated and identified as amides of hydroxy-cinnamic acids. A quantitative analysis showed that cacao calli, whatever the genotype and the embryogenic capacity, were polyphenol rich. There was a tendency, more or less important, to an increase of all phenolic groups into calli when the conditions are unfavourable to embryogenesis.

Modifications of the culture medium were studied in solid medium. The seeking of favourable conditions of selection and maintenance of meristematic and embryogenic cells by culture in liquid medium using the Temporary Immersion System were studied. A friable embryogenic callus was obtained. From that type of calli, embryogenic cell suspensions cultivated in erlenmeyers were initiated and maintained.

Ontogenesis, maturation, germination and conversion of somatic embryos from multicellular origin were studied. The majority of these embryos show morphological abnormalities. In order to improve the late phases of somatic embryogenesis, morphological, histological, biochemical (soluble sugars) and physiological (hydric parameters) factors of zygotic embryogenesis were considered. It was characterized by a growing phase of the embryos, followed by an accumulation of storage molecules: starch, proteins and lipids. During this second phase, a slow and moderate desiccation took place, as well as a modification of the soluble sugar composition. Introduction into the method of somatic embryogenesis of a growing phase, as well as the definition of a maturation medium containing ABA allowed somatic embryos maturation to be improved.

**KEY-WORDS:** *Theobroma cacao* L., Somatic embryogenesis, Histology, Polyphenolic compounds, Friable callus, Maturation.