

SOMMAIRE

1. PRESENTATION GENERALE DU SUJET ET OBJECTIFS	1
2. INTRODUCTION	4
2.1. Le cacaoyer	4
2.1.1. Biologie et morphologie	4
2.1.2. Origine et classification	6
2.1.3. L'amélioration génétique	7
2.2. L'embryogenèse somatique	9
2.2.1. Définition et concepts	9
2.2.2. Protocole théorique de l'embryogenèse somatique <i>in vitro</i>	10
2.2.3. Aptitude génétique à l'embryogenèse	13
2.2.4. Applications et potentialités de l'embryogenèse somatique	14
2.3. La culture <i>in vitro</i> du cacaoyer	15
2.3.1. Le microbouturage <i>in vitro</i>	15
2.3.2. L'embryogenèse somatique	16
3. MATERIELS ET METHODES	19
3.1. Matériel végétal et explants	19
3.2. Désinfection des explants	19
3.3. Protocole expérimental	19
3.4. Milieux de culture	20
3.5. Etudes histologiques	20
3.6. Estimation de la teneur en eau	21
3.7. Détermination de l'osmolarité	21
3.8. Mesure du CO ₂ et de l'éthylène	21
3.9. Analyse de la teneur en ADN nucléaire et du degré de ploïdie	23
3.10. Dispositif expérimental et traitement statistique	23
4. ETUDES CONCERNANT L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE	25
4.1. Induction de l'embryogenèse somatique	25
4.1.1. L'aptitude des tissus	25
4.1.1.1. Matériel végétal et explants	25
4.1.1.2. Milieux de culture	26
4.1.1.3. Protocole expérimental	26
4.1.1.4. Observations et variables mesurées	27
4.1.1.5. Résultats	27
4.1.2. Effet de l'équilibre hormonal et de la durée d'induction	29

4.1.3. Embryogenèse somatique et lait de noix de coco immature <i>Cocos nucifera</i>	33
4.1.4. Etude histologique de l'embryogenèse	36
4.1.5. Génotype et potentiel embryogène	39
4.1.6. Tentatives d'amélioration de l'induction de l'embryogenèse	40
4.1.7. Discussion.....	42
4.2. Embryogenèse somatique continue.....	49
4.2.1. Protocole expérimental	49
4.2.2. Induction d'une embryogenèse secondaire	49
4.2.3. Multiplication et entretien de souches embryogènes	55
4.2.4. Production d'embryons.....	57
4.2.4.1. Production d'embryons en milieu semi-solide	57
4.2.4.2. Production d'embryons en milieu liquide	59
4.2.5. Extrapolation du procédé à d'autres génotypes	60
4.2.6. Discussion.....	62
5. DEVELOPPEMENT ET CONVERSION D'EMBRYONS SOMATIQUES EN PLANTULES..	65
5.1. Matériel et méthodes.....	65
5.1.1. Matériel végétal et embryogenèse somatique	65
5.1.2. Protocole expérimental	65
5.1.3. Observations et variables mesurées.....	67
5.2. Maturation des embryons	68
5.2.1. Effet du milieu de culture	68
5.2.2. Effet de la lumière.....	70
5.2.3. Conclusions	71
5.3. Germination et conversion des embryons	71
5.3.1. Effet du substrat carboné	71
5.3.2. Effet de la taille de l'embryon	74
5.3.3. Effet de l'ABA.....	74
5.3.4. Effet du charbon actif.....	75
5.3.5. Effet des cytokinines.....	77
5.3.6. Conclusions	79
5.4. Conversion en plantules.....	79
5.4.1. Effet du confinement de l'atmosphère.....	80
5.4.2. Effet de la thermopériode.....	80
5.4.3. Etude de l'atmosphère de culture	83
5.4.3.1. CO ₂ et éthylène en confinement partiel	83
5.4.3.2. Etude de l'accumulation d'éthylène et de CO ₂ après addition d'ACC..	85
5.4.3.3. Thermopériode et éthylène.....	87
5.4.4. Croissance de plantules en présence d'ACC	88

5.4.5. Effet des inhibiteurs d'éthylène.....	89
5.4.6. Culture de plantules en atmosphère renouvelée.....	90
5.4.7. Conclusions.....	93
5.5. Germination et conversion d'embryons somatiques.....	94
5.6. Discussion.....	96
 6. ACCLIMATATION DES PLANTES A LA VIE <i>EX VITRO</i> ET ETUDE PRELIMINAIRE DE LA CONFORMITE.....	 107
6.1. Adaptation des plantes à la vie <i>ex vitro</i>	107
6.1.1. Culture en serre.....	107
6.1.2. Comportement des plantes cultivées au champ.....	111
6.2. Analyse de la ploïdie et de la teneur en ADN nucléaire.....	114
6.3. Discussion.....	118
6.4. Conclusions.....	121
 7. CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES.....	 122
7.1. Conclusions générales.....	122
7.2. Perspectives.....	127
 8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	 129

EMBRIOGENESIS SOMATICA Y REGENERACION DE PLANTAS DE CACAO *Theobroma cacao* L. A PARTIR DE PIEZAS FLORALES.

Resumen:

Un método de regeneración de plantas de cacao por embriogénesis somática a partir de pétalos, estaminodios y filamentos de estambres ha sido desarrollado. La obtención de explantes embriogénicos está basada en una inducción hormonal acompañada de una expresión en un medio sin hormonas. La importancia de la composición hormonal, de la concentración y de la duración de la inducción sobre la expresión y la calidad de la embriogénesis han sido puestas en evidencia. Entre 9 genotipos estudiados, una inducción del 1.3% al 18.7% de explantes embriogénicos ha sido observada. La producción continua de embriones en medio semi-sólido o líquido ha sido desarrollada sea a partir de estructuras embriogénicas primarias, sea por la inducción de una nueva embriogénesis a partir de embriones somáticos formados. Un estudio preliminar de la producción en medio líquido indica que un rendimiento promedio de 4000 embriones por litro de cultivo es posible cada 5 semanas.

Las condiciones y medios de cultivo necesarios para la maduración, la germinación y la conversión en plantulas han sido definidos. Entre los factores estudiados, la talla del embrión, la composición y la concentración del substrato de carbono, el carbón activo, el tipo y la concentración de citoquininas, la atmósfera sin confinamiento y la temperatura en ciclos variables luz/obscuridad han sido determinantes para el buen desarrollo de los embriones. Tasas de germinación del 76.4% y de conversión en plantulas *in vitro* del 60% fueron calculadas a partir de 966 embriones de 8 genotipos.

Un rendimiento en invernadero de 57.1% ha sido obtenido a partir de 508 plantulas transplantadas para su aclimatación *ex vitro*. Las plantas presentan un desarrollo normal formando un tallo ortotrópico, nuevas hojas y nuevas raíces.

Un estudio preliminar de la conformidad del nivel de ploidía y del ADN nuclear de 98 plantas regeneradas indica que estos caracteres no son modificados por la embriogénesis somática. 96 plantas establecidas en campo en Ecuador para estudios de conformidad muestran en todos los casos una morfología y un desarrollo normales, similares a una planta originada de semilla. Algunas de ellas, después de 15 meses de cultivo *ex vitro*, han formado ya la primera corona de ramas plagiotrópicas.

Estos resultados que constituyen una de las primeras obtenciones de plantas de cacao a partir de tejidos somáticos presentan nuevas perspectivas para el mejoramiento genético y la propagación de genotipos seleccionados de *Theobroma cacao* L.

Palabras claves: *Theobroma cacao* L., embriogénesis somática, regeneración, piezas florales.