

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE
Union - Discipline - Travail
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT
SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE DE COCODY-ABIDJAN



UFR BIOSCIENCES

LABORATOIRE DE GENETIQUE

N° d'ordre :.....

THESE

Présentée à l'UFR BIOSCIENCES pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Cocody.

Spécialité : Génétique.

Option : Amélioration des productions végétales.

Par

Auguste Emmanuel ISSALI

THEME :

**ANALYSE DE L'INFLUENCE DE QUELQUES
PARAMETRES CLIMATIQUES, PHENOLOGIQUES
ET GENETIQUES SUR L'EMBRYOGENESE
SOMATIQUE CHEZ LE CACAOYER : *Theobroma
cacao* L. (Malvaceae).**

Soutenue publiquement le 12 janvier 2008 devant le jury composé de :

M. TIO TOURE Bakary, Professeur Titulaire, Université de Cocody.	Président
M. AKE Sévérin, Professeur Titulaire, Université de Cocody.	Rapporteur
M. SANGARE Abdourahamane, Directeur de Recherches, Centre National de Recherche Agronomique.	Directeur de thèse
M. TRAORE Abdoulaye, Schatz Research Fellow in Genetic Engineering, the Pennsylvania State University USA.	Codirecteur de thèse
Mme NGORAN Jeanne, Maître de Recherches, Centre National de Recherche Agronomique.	Examineur
M. COULIBALY Manga Yahya, Chargé de Recherches, Université de Cocody.	Examineur

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE
Union - Discipline - Travail
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT
SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE DE COCODY-ABIDJAN

UFR BIOSCIENCES



LABORATOIRE DE GENETIQUE

N° d'ordre :

THESE

Présentée à l'UFR BIOSCIENCES pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Cocody.

Spécialité : Génétique.

Option : Amélioration des productions végétales.

Par

Auguste Emmanuel ISSALI

THEME :

**ANALYSE DE L'INFLUENCE DE QUELQUES
PARAMETRES CLIMATIQUES, PHENOLOGIQUES
ET GENETIQUES SUR L'EMBRYOGENESE
SOMATIQUE CHEZ LE CACAOYER : *Theobroma
cacao* L. (Malvaceae).**

Soutenue publiquement le 12 janvier 2008 devant le jury composé de :

M. TIO TOURE Bakary, Professeur Titulaire, Université de Cocody.	Président
M. AKE Sévérin, Professeur Titulaire, Université de Cocody.	Rapporteur
M. SANGARE Abdourahamane, Directeur de Recherches, Centre National de Recherche Agronomique.	Directeur de thèse
M. TRAORE Abdoulaye, Schatz Research Fellow in Genetic Engineering, the Pennsylvania State University USA.	Codirecteur de thèse
Mme NGORAN Jeanne, Maître de Recherches, Centre National de Recherche Agronomique.	Examineur
M. COULIBALY Mangoa Yahya, Chargé de Recherches, Université de Cocody.	Examineur

*A mes enseignants du primaire, secondaire et supérieur
Pour m'avoir donné le goût des études*

*A mes parents : ISSALI Auguste (défunt)
MAHONDI Louise (défunte)
MOUENIE Marie Paulette
BILIMBA Augustine (défunte)
Pour l'éducation et l'instruction que vous m'avez données*

*A mes enfants : ISSALI GNAMIE Yann Eric
ISSALI GNAMIE Régis Césaire
Pour mes absences involontaires exigées par les contraintes des travaux de laboratoire*

*A ma fiancée : GNAMIE Aney alex Gertrude
Pour ton amour, ton soutien et tes conseils*

AVANT-PROPOS

Les présents travaux sont le fruit de la convention établie entre l'Université de Cocody / Abidjan et le Centre National de Recherche Agronomique. Le Laboratoire Central de Biotechnologies du CNRA ainsi que celui de Génétique de l'Université de Cocody ont étroitement collaboré à leur aboutissement. Ces travaux ont été réalisés à l'Unité des Ressources Génétiques du Laboratoire Central de Biotechnologies, grâce au soutien financier du BCCCA, de l'IPGRI et du CNRA.

Je voudrais remercier d'entrée Monsieur TIO TOURE Bakary, professeur titulaire de Génétique pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse. Mes remerciements vont également à Monsieur AKE sévérin, professeur titulaire de Phytopathologie, à double titre. D'abord, pour avoir consenti d'être le rapporteur du jury de ma thèse. Ensuite, pour la formation reçue, les conseils et les encouragements qu'il n'a jamais cessés de me prodiguer.

A Monsieur SANGARE Abdourahamane, professeur de Génétique moléculaire et Directeur du Laboratoire Central de Biotechnologies (LCB) du Centre National de Recherche Agronomique (CNRA), j'exprime ma reconnaissance. La formation et la direction qu'il a assumées, en dépit de ses innombrables occupations, sont pour moi un motif de satisfaction. Ma gratitude va également à Monsieur TRAORE Abdoulaye, co-directeur de ces travaux, spécialiste de la culture de tissus du cacaoyer. Sa rigueur scientifique liée à ses grandes qualités humaines m'ont permis de faire aboutir mes travaux de recherche.

Mes remerciements spéciaux vont à Madame NGORAN, née ANDI KOHI Jeanne, responsable de l'Unité de Coopération Internationale du CNRA et du projet IPGRI. D'abord, pour avoir accepté de juger ce travail. Ensuite, pour le soutien et l'aide qu'elle m'a apportés durant le déroulement de mes travaux de recherche. Sa bonne connaissance du cacaoyer, sa disponibilité ainsi que son sens élevé du partage ont contribué grandement à l'aboutissement de mes travaux. C'est à elle que nous devons les 13 génotypes de cacaoyer choisis pour nos travaux.

Je voudrais aussi témoigner ma gratitude à Monsieur COULIBALY Manga Yahya, un des pionniers de l'embryogenèse somatique chez le riz. Son acceptation pour juger de la qualité scientifique de mes travaux est pour moi un grand motif de satisfaction.

Au Professeur Marie MONDEIL, pour la formation qu'elle m'a dispensée et la direction qu'elle a assumée au début de mes travaux de thèse, veuillez trouver ici l'assurance de ma profonde gratitude.

Au Directeur Général du CNRA défunt, Dr SIE Koffi Joseph, à qui je rends hommage. Au Directeur Général actuel du CNRA, Dr YO Tiémoko, j'exprime ma profonde gratitude. Au Directeur des Programmes de Recherches et de l'Appui au Développement, Dr ADIKO Amoncho, j'exprime ma reconnaissance. Au Directeur de l'Innovation et des Systèmes d'Information, Dr KEDRO Diomandé, j'adresse mes remerciements.

A monsieur N'DA Arsène, responsable de l'exécution des programmes de recherche à la Direction des Programmes de Recherches et de l'Appui au Développement, j'exprime ma reconnaissance. Ma reconnaissance va aussi au Dr KOFFI Kouablan Edmond pour les conseils avisés et l'encadrement qu'il a assurés. Aux Dr DIAN Kouadio, KOFFI Kouassi II Nazaire, TAHI Gnon Mathias et LIDA Yéhili Justin défunt pour la collaboration et l'intérêt qu'ils ont portés à mes travaux, je leur manifeste ma gratitude.

Au Dr KOUAME Brou, responsable du service météorologique du CNRA, qui a mis à notre disposition les données météorologiques. Celles-ci nous ont permis de tester les corrélations entre le climat et l'embryogenèse. A son technicien M. DALEBA Tapé Lazare, je tiens à adresser mes remerciements.

Aux chercheurs de Bouaké, Monsieur AMANI, Dr NZUE Boni, Dr ZOHOURI et Dr GNAORE née YAPI Valentine, j'exprime ma reconnaissance. Au personnel de l'URG du LCB : Mlle Touré Mah, messieurs ASSOVI Kouakou Claude, OHOUEU Allé Emmanuel, ZRAN Emmanuel, COMOIE Boko, TIEHI Maurice, SEA Alain ainsi que les déplacés de Bouaké, j'exprime ma gratitude.

Au personnel de l'unité de biologie moléculaire du LCB, en particulier messieurs LIADE Emile et AFFIAN Nathanaël, pour l'aide et l'assistance qu'ils m'ont portées, j'adresse mes remerciements les plus sincères. A tous nos responsables du Laboratoire de Génétique de l'Université de Cocody, particulièrement Dr KOUASSI Auguste, Dr LOLO, Dr GNANGBE, Dr TIEKOURA et Pr NGUETTA Assanvo Simon Pierre, je tiens à leur exprimer ma gratitude.

A tous mes collègues thésards, en particulier ALLOU Désiré qui m'a aidé à analyser statistiquement les données collectées, j'exprime ma reconnaissance. Mesdames ASSOVI née BOTE Yolande, KAKOU née YAO Thérèse et ATINDEHOU née DJENKO Elise pour la disponibilité et le soutien qu'elles m'ont témoignés, je leur exprime ma gratitude.

Mes remerciements vont au personnel de la Direction de l'Innovation et des Systèmes d'Information, notamment Messieurs DIOMANDE Mamadou, IRIE Gaston, GBAYA Kipré, BREDOU Etienne et COULIBALY Kafolodié Mamadou, N'CHO Franck. Il en est de même de Mesdames COULIBALY Amina et TAHOUO Odile pour leur disponibilité.

Auguste Emmanuel ISSALI

SOMMAIRE

	Pages
SECTION 1 : INTRODUCTION ET GENERALITES.....	1
INTRODUCTION.....	2
1. GENERALITES.....	7
1.1. Le cacaoyer	7
1.1.1. Importance socio-économique de la cacaoyer dans le monde et en Côte d'Ivoire	7
1.1.2. Développement et évolution de l'industrie cacaoyer	7
1.1.3. Origine et taxonomie	8
1.1.4. Biologie	10
1.1.4.1. Croissance du plant	10
1.1.4.2. Floraison et fructification	10
1.1.5. Génétique du cacaoyer	12
1.1.5.1. Différentes méthodes de sélection.....	12
1.1.5.2. Cytogénétique.....	12
1.1.5.3. Incompatibilité	12
1.2. Climats de la zone cacaoyer	13
1.2.1. Facteurs climatiques	13
1.2.1.1. Température	13
1.2.1.2. Lumière	14
1.2.1.3. Humidité atmosphérique	14
1.2.1.4. Pluviosité.....	14
1.3. Embryogenèse somatique chez le cacaoyer	14
1.3.1. Etat des connaissances sur l'embryogenèse somatique chez le cacaoyer	14
1.3.1.1. Production d'embryons somatiques à partir d'anthères, d'ovules, de nucelles et d'embryons zygotiques sur le milieu MS.....	15
1.3.1.2. Production d'embryons somatiques à partir d'embryons zygotiques sur le milieu MS	15
1.3.1.3. Maturation des embryons somatiques par le métabolisme des acides gras..... produits sur le milieu MS	15
1.3.1.4. Germination des embryons somatiques sur les milieux MS et de Renewal.....	16
1.3.1.5. Production d'embryons somatiques à partir d'explants de feuilles sur le..... milieu MS	16
1.3.1.6. Production, conversion en plantules d'embryons somatiques à partir de	16
cotylédons et d'axes embryonnaires d'embryons zygotiques immatures sur le milieu MS	16
1.3.1.7. Production et conversion en plantules d'embryons somatiques à partir d'explants	17
floraux sporophytiques sur les milieux MS, Kao et DKW	17
1.3.2. Importance de l'embryogenèse somatique	19
1.3.3. Relation entre l'embryogenèse somatique et les phytohormones	20
1.3.4. Relation entre l'embryogenèse somatique et certains facteurs climatiques	20
1.3.5. Relation entre l'embryogenèse somatique et certains caractères phénologiques	20

SECTION 2 : MATERIEL ET METHODES	22
1. MATERIEL.....	23
1.1. Site expérimental.....	23
1.2. Matériel végétal.....	23
1.3. Instruments météorologiques	24
2. METHODES	26
2.1. Préparation des milieux de culture des tissus.....	26
2.2. Prélèvement des boutons floraux et préparation des explants.....	26
2.3. Influence de différents paramètres sur l’embryogenèse somatique	28
2.3.1. Dispositif expérimental utilisé	28
2.3.2. Repiquage sur les milieux SCG et ED	29
2.4. Méthodes d’observations.....	33
2.4.1. Paramètres climatiques mesurés.....	33
2.4.2. Définition des périodes climatiques	33
2.4.3. Paramètres phénologiques mesurés et codés.....	35
2.4.4. Variables mesurées pour la culture des tissus	35
2.5. Approche méthodologique ou philosophie	37
2.5.1. Influence de quelques paramètres climatiques sur l’embryogenèse somatique	37
du cacaoyer.....	37
2.5.2. Influence de quelques paramètres phénologiques sur l’embryogenèse somatique	37
du cacaoyer.....	37
2.5.3. Relation entre le climat et la phénologie	38
2.5.4. Influence de quelques paramètres génétiques sur l’embryogenèse somatique	38
du cacaoyer.....	38
2.6. Méthodes d’analyse des données	39
2.6.1. Statistiques élémentaires	39
2.6.2. Comparaison de moyennes.....	39
2.6.2.1. Comparaison de moyennes incorporée à l’analyse de variance.....	40
2.6.2.2. Comparaison multiple de moyennes	40
2.6.2.3. Comparaison de moyennes de facteurs à 2 variantes.....	40
2.6.2.4. Comparaison de moyennes de variantes de la combinaison de facteurs.....	41
2.6.3. Corrélation linéaire de Pearson	41
2.6.4. Analyse en Composantes Principales (ACP)	41
2.6.5. Régression multiple.....	42
2.6.5.1. Identification des modèles linéaires de chacune des années d’étude	42
2.6.5.2. Pertinence et suffisance des conclusions tirées à partir des données collectées	42
sur 2 années d’étude	42
SECTION 3 : RESULTATS	43
1. INFLUENCE DE QUELQUES PARAMETRES CLIMATIQUES SUR L’EMBRYOGENESE SOMATIQUE DU CACAOYER.	44
1.1. Variations annuelles des paramètres climatiques mesurés.....	45
1.2. Meilleurs paramètres de la variation climatique	45
1.3. Structuration des meilleurs paramètres climatiques en fonction des mois.....	50

1.4. Organisation des paramètres en périodes climatiques stables.....	52
1.4.1. Périodes stables de pluviosité.....	52
1.4.2. Périodes stables de température maximale.....	53
1.4.3. Périodes stables de température minimale	53
1.4.4. Périodes stables d'écart de température.....	53
1.4.5. Périodes stables d'insolation	54
1.5. Meilleure variable de la culture des tissus	54
1.6. Relation entre les périodes climatiques et l'embryogenèse somatique	57
1.6.1. Relation entre les périodes de pluviosité et l'embryogenèse somatique	57
1.6.2. Relation entre les périodes de température maximale et l'embryogenèse somatique	57
1.6.3. Relation entre les périodes de température minimale et l'embryogenèse somatique.....	57
1.6.4. Relation entre les périodes d'écart de température et l'embryogenèse somatique	61
1.6.5. Relation entre les périodes d'insolation et l'embryogenèse somatique.....	61
1.7. Contribution des paramètres climatiques à la variation de l'embryogenèse	64
1.7.1. Modélisation de la variation de l'embryogenèse somatique en fonction des	64
paramètres climatiques	64
2. INFLUENCE DE QUELQUES PARAMETRES PHENOLOGIQUES SUR L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE DU CACAOYER.	66
2.1. Influence de l'année sur les variations des paramètres phénologiques.....	67
2.2. Structuration des 2 paramètres phénologiques les plus variables en fonction des mois.....	67
2.3. Organisation des paramètres en classes phénologiques stables	69
2.3.1. Classes stables de niveau de floraison.....	69
2.3.2. Classes stables de niveau de fructification.....	69
2.4. Lien entre les classes phénologiques stables et l'embryogenèse somatique.....	69
2.4.1. Lien entre les classes stables du niveau de floraison et l'embryogenèse somatique	69
2.4.2. Lien entre les classes stables du niveau de fructification et l'embryogenèse somatique.....	69
2.5. Contribution des paramètres phénologiques, puis climatiques et phénologiques à.....	72
la variation totale de l'embryogenèse somatique	72
2.5.1. Modélisation de la variation de l'embryogenèse somatique en fonction des.....	72
paramètres phénologiques	72
2.5.2. Modélisation de la variation de l'embryogenèse somatique en fonction des.....	74
paramètres climatiques et phénologiques.....	74
2.6. Pertinence et suffisance des données collectées sur 2 années d'expérimentation	76
3. RELATIONS ENTRE LE CLIMAT ET LA PHÉNOLOGIE DU CACAOYER.	77
3.1. Influence du climat sur la phénologie	78
3.2. Relation entre les 3 paramètres phénologiques	79
4. INFLUENCE DE QUELQUES PARAMETRES GENETIQUES SUR L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE DU CACAOYER.	82
4.1. Effet de l'année sur les variables de culture des tissus mesurées.....	83
4.2. Caractérisation des aptitudes callogènes et embryogènes des génotypes, de	85
l'effet de l'explant et du milieu d'induction	85
4.2.1. Pertinence des descripteurs primaires	85
4.2.2. Caractérisation des aptitudes callogènes et embryogènes des hybrides et.....	91
effet du milieu d'induction par analyse séparée des facteurs.....	91
4.2.2.1. Caractérisation des aptitudes callogènes des hybrides.....	91
4.2.2.2. Caractérisation des aptitudes embryogènes des hybrides	92

4.2.3. Caractérisation des aptitudes callogène et embryogène des clones de géniteurs.....	93
des hybrides par analyse séparée des facteurs	93
4.2.3.1. Aptitudes callogènes des clones de géniteurs	93
4.2.3.2. Aptitudes embryogènes des clones de géniteurs	93
4.2.3.3. Caractérisation des aptitudes embryogènes des 13 génotypes par combinaison	95
des facteurs en fonction des descripteurs secondaires	95
4.2.4. Ressemblance entre hybrides et géniteurs.....	95
4.2.5. Influence réciproque entre les staminodes et pétales en culture mixte	99
4.2.5.1. Caractérisation du potentiel embryogène des explants et des variantes de la.....	99
combinaison explant et disposition	99
SECTION 4 : DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES	105
DISCUSSION	106
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	126
REFERENCES CITEES	129
PUBLICATIONS	135
ANNEXES	136

LISTE DES ABREVIATIONS

ABA : Acide abscissique.

AIA : Acide indole-3-acétique.

ANA : Acide naphtylacétique.

b : coefficient de régression.

BA ou BAP : Benzyladénine ou 6-Benzylaminopurine.

BCCA : Biscuit Cake Chocolate and Sugar Confectionery Association.

CV : coefficient de variation.

DKW : Milieu de base des plantes pérennes décrit par Driver et Kuniyuki (1984), modifié par Tulecke et Mc Granahan (1985).

ED : Embryo Development medium.

GA₃ : Acide gibbérellique.

ha : Hectare.

HCl: Acide chlorhydrique.

H/J : Heure par jour.

ICCO : International Cocoa Organization.

IPGRI : International Plant Genetic Resources Institute.

KOH : Hydroxyde de potassium.

LCB : Laboratoire Central de Biotechnologies.

L_xA_y : Ligne x Arbre y : Hybride en cours d'évaluation, non encore certifié, non inscrit au catalogue, identifié par sa position sur la parcelle expérimentale (indice x) et par son rang sur la ligne, relativement au croisement dont il est issu.

MS : Milieu de base de Toshio Murashige et Folke Skoog.

min : Minute

Num. : Numois : Numéro représentant chacun des 12 mois de l'année.

PCG : Primary Callus Growth medium.

Pt : Pétales.

PIB : Produit Intérieur Brut.

R² : Coefficient de détermination, traduisant la qualité de l'ajustement des données à la courbe décrite par le modèle.

SCG : Secondary Callus Growth medium.

St : Staminodes.

TDZ : Thidiazuron ou 1-phényl-3-(1, 2, 3 thiadiazol-5-yl) urea.

2,4 D : Acide 2,4 dichlorophénoxyacétique.

2ip : 2 isopentényladénine.

LISTE DES FIGURES

	Pages
Figure 1 : Pied fructifère de cacaoyer.	9
Figure 2 : Boutons floraux sur un pied de cacaoyer.....	27
Figure 3 : Fleur épanouie de cacaoyer.	27
Figure 4 : Différentes phases d’initiation de culture, de croissance d’explants callogènes, d’embryons somatiques et de vitroplants.	31
Figure 5 : Dispositions des staminodes et des pétales du génotype C151-61 cultivés sur le même milieu d’induction PCG3, pour mettre en évidence leur influence réciproque.	32
Figure 6: Qualité de la représentation des 6 paramètres climatiques sur le plan 1-2 du cercle de corrélation de l’Analyse en Composantes Principales au cours de la première année d’étude.....	48
Figure 7: Qualité de la représentation des 6 paramètres climatiques sur le plan 1-2 du cercle de corrélation de l’Analyse en Composantes Principales au cours de la seconde année d’étude.....	49
Figure 8: Représentativité des 5 variables de culture des tissus sur le plan 1-2 du cercle de corrélation de l’Analyse en Composantes Principales au cours de la première année d’étude.....	56
Figure 9: Représentativité des 5 variables de culture des tissus sur le plan 1-2 du cercle de corrélation de l’Analyse en Composantes Principales au cours de la seconde année d’étude.....	56
Figure 10 : Pourcentage d’embryogenèse associé à chacune des périodes de pluviosité durant les 2 années d’étude.....	58
Figure 11 : Pourcentage d’embryogenèse relatif à chacune des périodes de température maximale sur les 2 années d’étude.....	59
Figure 12 : Pourcentage d’embryogenèse relatif à chacune des périodes de température maximale sur les 2 années d’étude.....	60
Figure 13 : Pourcentage d’embryogenèse de chacune des périodes d’écarts de température durant les 2 années d’étude.	62
Figure 14 : Pourcentage d’embryogenèse de chacune des périodes d’insolation pendant les 2 années d’étude.	63
Figure 15 : Pourcentage d’embryogenèse associé à chacune des classes phénologiques du niveau de floraison sur les 2 années d’étude.	70
Figure 16 : Pourcentage d’embryogenèse correspondant à chacune des classes phénologiques du niveau de fructification durant les 2 années d’étude.....	71
Figure 17 : Structuration des paramètres climatiques et phénologiques dans l’espace représenté par le plan 1- 2 de l’ACP de la première année d’étude.	80
Figure 18 : Structuration des paramètres climatiques et phénologiques dans l’espace représenté par le plan 1-2 de l’ACP de la seconde année d’étude.	80
Figure 19 : Relation entre les performances moyennes callogènes des hybrides et des géniteurs.	98

Figure 20 : Relation entre les performances moyennes embryogènes des hybrides et des géniteurs.	98
Figure 21 : Dispositif d'évaluation de l'influence réciproque entre les staminodes et les pétales cultivés sur le même milieu d'induction PCG3.	103
Figure 22 : Dispositif d'évaluation de l'influence réciproque entre les staminodes et les pétales cultivés sur le même milieu d'induction PCG3.	104

LISTE DES TABLEAUX

	Pages
Tableau I : Récapitulatif sur l'origine et les caractéristiques de chaque génotype (Lockwood and Gyamfi, 1979 ; Ngoran et Paulin, 1988 ; Ngoran, 1996).	25
Tableau II : Dispositif d'évaluation de l'influence réciproque entre les staminodes et les pétales cultivés en culture mixte sur le milieu d'induction PCG3.	32
Tableau III : Récapitulatif des étapes successives de l'analyse des données climatiques.	34
Tableau IV : Variables mesurées pour l'étude des effets de la phénologie sur l'embryogenèse somatique.	36
Tableau V : Variables mesurées pour l'étude des potentiels callogènes et embryogènes des génotypes utilisés.	36
Tableau VI : Classification des moyennes de chacun des paramètres climatiques en fonction de l'année.	47
Tableau VII : Relationship entre les 6 paramètres climatiques et les 4 axes factoriels à travers leur cosinus carré durant les 2 années d'étude	47
Tableau VIII : Relations entre les 6 paramètres climatiques au moyen des corrélations de Pearson au cours des 2 années d'étude.....	48
Tableau IX : Classification de moyennes des paramètres climatiques représentatifs en fonction des mois.....	51
Tableau X : Relation entre les Composantes Principales et les variables de culture des tissus durant les 2 années d'étude.	55
Tableau XI : Relation entre les variables de culture de tissus au cours des 2 années d'expérimentation.....	55
Tableau XII : Classification des moyennes du pourcentage d'embryogenèse en fonction des périodes de pluviosité.....	58
Tableau XIII : Classification des moyennes du pourcentage d'embryogenèse en fonction des périodes de température maximale.....	59
Tableau XIV : Classification des moyennes du pourcentage d'embryogenèse en fonction des périodes de température minimale.	60
Tableau XV : Classification des moyennes du pourcentage d'embryogenèse en fonction des périodes d'écart de température.....	62
Tableau XVI : Classification des moyennes du pourcentage d'embryogenèse en fonction des périodes d'insolation.	63
Tableau XVII : Effet de la température minimale, des écarts de température et de l'insolation sur le pourcentage d'embryogenèse durant la première année d'étude.	65
Tableau XVIII : Effet de la pluviosité, de la température maximale, de la température minimale, des écarts de température et de l'insolation sur le pourcentage d'embryogenèse durant la seconde année d'étude.....	65
Tableau XIX : Classification des moyennes de chaque paramètre phénologique des 2 années d'étude.	68
Tableau XX : Classification de moyennes des niveaux de floraison et de fructification en fonction des mois sur les 2 années d'étude.....	68

Tableau XXI : Classification des moyennes du pourcentage d'embryogenèse selon les classes phénologiques du niveau de floraison au cours des 2 années d'étude.	70
Tableau XXII : Classification des moyennes du pourcentage d'embryogenèse en fonction des classes phénologiques du niveau de fructification sur les 2 années d'étude.....	71
Tableau XXIII : Influence des niveaux de floraison et de fructification sur l'embryogenèse somatique durant la première année d'étude.....	73
Tableau XXIV : Effet des niveaux de floraison et de fructification sur l'embryogenèse somatique durant la seconde année d'étude.....	73
Tableau XXV : Influence des écarts de température, de l'insolation, des niveaux de floraison et de fructification sur l'embryogenèse somatique au cours de la première année d'étude.....	75
Tableau XXVI : Effet des écarts de température, de l'insolation, des niveaux de floraison et de fructification sur l'embryogenèse somatique pendant la seconde année d'étude.	75
Tableau XXVII : Relation entre les Composantes Principales et les paramètres climatiques et phénologiques au cours des 2 années d'étude.....	81
Tableau XXVIII : Relation entre les paramètres climatiques et phénologiques à travers les corrélations linéaires de Pearson.	81
Tableau XXIX : Classification des moyennes de variables de culture des tissus en fonction des 2 années d'expérimentation.	84
Tableau XXX : Examen des effets individuels et des interactions entre les facteurs du dispositif d'évaluation de la callogenèse et de l'embryogenèse au cours de la première année d'étude. 87	87
Tableau XXX (Suite) : Examen des effets individuels et des interactions entre les facteurs du dispositif d'évaluation de la callogenèse et de l'embryogenèse au cours de la première année d'étude.....	88
Tableau XXXI : Examen des effets individuels et des interactions entre les facteurs du dispositif d'évaluation de la callogenèse et de l'embryogenèse durant la seconde année d'expérimentation.....	89
Tableau XXXI (Suite) : Examen des effets individuels et des interactions entre les facteurs du dispositif d'évaluation de la callogenèse et de l'embryogenèse durant la seconde année d'expérimentation.....	90
Tableau XXXII : Classification de moyennes de callogenèse et d'embryogenèse des hybrides en fonction du génotype, de l'effet de l'explant et du milieu d'induction.	94
Tableau XXXIII : Classification de moyennes de callogenèse et d'embryogenèse des clones de géniteurs.	96
Tableau XXXIV : Caractéristiques des aptitudes callogènes et embryogènes des hybrides par analyse combinée des facteurs durant la première année d'étude.....	96
Tableau XXXV : Caractéristiques des aptitudes callogènes et embryogènes des hybrides et des géniteurs par analyse combinée des facteurs au cours de la seconde année d'étude	97
Tableau XXXVI : Examen des effets individuels et de l'interaction entre les facteurs explant et disposition à travers l'analyse de variance.....	101
Tableau XXXVII : Classification de moyennes d'embryogenèse en fonction de l'effet des explants et de leur disposition sur le milieu d'induction.....	101

Tableau XXXVIII : Classification des moyennes d'embryogenèse en fonction de variantes de la combinaison du type et de la disposition des explants sur le même milieu d'induction. 102

SECTION 1

INTRODUCTION ET GENERALITES

INTRODUCTION

Le cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) est une plante pérenne de la famille des Malvacées (Whitlock *et al.* 2001), originaire des forêts humides d'Amérique tropicale. Sa culture est pratiquée en Afrique, Asie, Amérique et Océanie (Braudeau, 1969; Mossu, 1990; Lieberei et Rohsius, 2002).

Les rendements moyens en cacao marchand, de l'ordre de 250 à 500 Kg / ha, obtenus dans les plantations sont relativement faibles (Braudeau, 1969; Mossu, 1990), contre 2,5 t / ha en stations de recherche (Clément *et al.* 1996). Ces faibles rendements sont dus à l'existence dans la plupart de cacaoyères de plants non sélectionnés issus de semis tout venant (Guiltinan et Maximova, 2000 ; Anonyme 1, 2003). En effet, le haut niveau d'hétérozygotie lié au mode de reproduction préférentiellement allogame chez le cacaoyer explique l'hétérogénéité du niveau de production des génotypes plantés et celle de leur sensibilité aux parasites (Guiltinan et Maximova, 2000). L'amélioration de ces rendements requiert non seulement l'identification des génotypes élites, mais également leur multiplication et leur vulgarisation.

L'identification de génotypes élites a lieu au cours du processus de sélection, qui classiquement chez le cacaoyer se base sur les croisements de géniteurs. Ceux-ci sont choisis selon leurs performances dont les recombinaisons favorables sont attendues dans la descendance (Braudeau, 1969; Mossu, 1990). Du fait de la forte hétérozygotie du cacaoyer, les descendances expriment un large spectre de variabilité. Cette variabilité concerne la vigueur, la précocité, la productivité, la résistance aux maladies et attaques d'insectes ainsi que la qualité du cacao (Braudeau, 1969; Mossu, 1990). Les sélections familiale et individuelle chez le cacaoyer portent sur les descendances hybrides de clones. Ainsi, les meilleures familles ou descendances choisies selon les performances individuelles des arbres qui les composent, sont recrées à travers des champs semenciers biclonaux. Elles sont distribuées en mélange aux producteurs sous forme de semences hybrides élites. Parmi les descendances créées, certains individus performants ou génotypes élites, sont choisis en fonction de leur productivité ou leur résistance, pour la multiplication végétative. Cependant, une perte significative du gain génétique additif est enregistrée chez les seedlings et les clones d'individus élites s'ils sont de

nouveau reproduits par graine (Maximova *et al.* 2002). D'où l'utilité de produire des semences issues de la multiplication végétative des individus élites.

Les méthodes classiques de multiplication des génotypes élites, que sont le bouturage et le greffage, ne produisent pas de résultats satisfaisants. En effet pour le bouturage, le taux moyen de réussite des boutures est variable entre 40 – 90 % (Kouamanan, 2001). Une telle variation est fonction du génotype et du substrat de culture en Côte d'Ivoire et en station de recherche (Kouamanan, 2001). Par ailleurs, les boutures orthotropes et plagiotropes couramment utilisées présentent certes des avantages mais surtout des inconvénients qui rendent leur exploitation difficile. En effet, si les boutures orthotropes développent facilement un enracinement pivotant nécessaire au bon ancrage, elles sont en nombre réduit naturellement sur les arbres. Les boutures plagiotropes, quant à elles, sont certes très nombreuses, mais leur enracinement fasciculé les rend vulnérables à la sécheresse et aux chablis. Ceci compromet leur reprise surtout pendant la période d'établissement des plantules (Guiltinan et Maximova, 2000). Les arbres qui sont issus des boutures plagiotropes présentent un système aérien déséquilibré, sans tronc, des branches charpentières fragiles devant être soutenues au moment de la fructification (Bertrand et Agbodjan, 1989). Dans le cas du greffage, les plants greffés donnent des arbres à port déséquilibré ne formant pas de vraie couronne (Bertrand et Dupois, 1992).

Pour pallier ces insuffisances, la micropropagation par embryogenèse somatique a été envisagée comme solution complémentaire aux méthodes classiques de multiplication. Car les plants régénérés à partir d'embryons somatiques appelés régénérants se comportent comme des plantules issues de graines (Santos *et al.* 2002 ; Tan et Furtek, 2003). De nombreux travaux ont permis l'obtention d'embryons somatiques primaires à partir de tissus d'origines diverses (Esan, 1975 ; Li *et al.* 1998 ; Tan et Furtek, 2003). Certains de ces travaux ont amélioré l'efficacité de leur production (Alemanno, 1995 ; Li *et al.* 1998 ; Tan et Furtek, 2003). D'autres travaux ont amélioré la maturation (Kononowicz et Janick, 1984 ; Alemanno, 1995 ; Li *et al.* 1998) et la germination d'embryons somatiques primaires (Wang et Janick, 1984 ; Duhem *et al.* 1989 ; Li *et al.* 1998). D'autres travaux encore ont amélioré leur conversion en plantules avec des taux variant de 30 à 80 % (Wen et Kinsella, 1991 ; Li *et al.* 1998 ; Tan et Furtek, 2003).

Néanmoins, en dépit des progrès enregistrés, on observe que la production d'embryons somatiques et / ou d'explants callogènes n'est pas toujours stable et constante (Esan, 1975 ; Alemanno, 1997 ; Tan et Furtek, 2003). Elle semble varier en fonction des facteurs externes tels que les saisons, les écarts de température, la pluviosité, l'insolation, etc. (Esan, 1975 ; Li *et al.* 1998 ; Antunez de Mayolo *et al.* 2003). Le milieu de culture est aussi un des facteurs externes susceptibles d'induire une telle variation (Esan, 1975 ; Li *et al.* 1998 ; Tan et Furtek, 2003). La variation de la production d'embryons somatiques et / ou d'explants callogènes semble dépendre également des facteurs internes tels que la phénologie (Augé *et al.* 1984). Le génotype est aussi un des facteurs internes à l'origine de la variation de la production d'embryons somatiques et / ou d'explants callogènes (Adu-Ampomah *et al.* 1988 ; Li *et al.* 1998 ; Tan et Furtek, 2003). De la même manière, l'explant est un des facteurs internes capable de susciter la variation dans la production d'embryons somatiques et / ou d'explants callogènes (Esan, 1975 ; Alemanno, 1995 ; Tan et Furtek, 2003). Cette variation pourrait expliquer la faiblesse de la production d'embryons somatiques et / ou d'explants callogènes (Adu-Ampomah *et al.* 1988 ; Alemanno, 1995 ; Tan et Furtek, 2003).

Récemment, la gamme des génotypes embryogènes a été élargie. L'embryogenèse primaire et secondaire a été intégrée pour en accroître l'efficacité (Maximova *et al.* 2002). En dépit de tels élargissement et intégration, la production commerciale du matériel élite reste limitée (Alemanno *et al.* 2003).

Aucune étude, à notre connaissance, n'a analysé les effets du climat et de la phénologie sur l'embryogenèse somatique. Aucune étude n'a caractérisé complètement les aptitudes callogènes et embryogènes des génotypes du cacaoyer. Car les caractérisations *in vitro* rapportées ont porté sur moins de 3 descripteurs. En plus, elles ont analysé séparément le potentiel du génotype, de la nature de l'explant et du milieu de culture (Adu-Ampomah *et al.* 1988 ; Alemanno 1995 ; Tan et Furtek, 2003). Ces caractérisations paraissent incomplètes et pourraient être un handicap dans la connaissance et l'exploitation du potentiel réel des génotypes étudiés. En effet, en culture les facteurs n'agissent pas isolement. Bien souvent les réponses obtenues sont le fruit de synergie, inhibition et / ou compétition entre les facteurs en présence (Heller *et al.* 1993). D'où la nécessité de

caractériser complètement le potentiel des génotypes en combinant les facteurs. De la même manière, aucune étude n'a analysé l'influence réciproque exercée par les staminodes et les pétales quand ils sont cultivés sur le même milieu d'induction.

L'analyse de l'influence du climat et de la phénologie pourrait permettre l'identification des périodes climatiques et des classes phénologiques propices à la production d'embryons somatiques. Par ailleurs, la caractérisation complète de chaque génotype pourrait aider à mieux connaître et exploiter le potentiel réel de chaque génotype. De la sorte, elle pourrait permettre la connaissance de l'explant et du milieu d'induction à travers lesquels chaque génotype s'exprime le mieux. L'analyse de l'interaction entre staminodes et pétales pourrait permettre de proposer leur meilleure disposition sur les milieux de culture. Cette analyse pourrait aussi faciliter l'identification du meilleur descripteur pour la caractérisation *in vitro* des génotypes de cacaoyer. Enfin, la vulgarisation à grande échelle des régénérants pourrait accroître la productivité des cacaoyères.

Les présents travaux visent à optimiser l'embryogenèse somatique en analysant principalement :

- 1) l'influence du climat sur la production d'embryons somatiques ;
- 2) l'influence de la phénologie sur la production d'embryons somatiques ;
- 3) l'influence du génotype, des effets de l'explant et du milieu d'induction sur la production d'explants callogènes et / ou d'embryons somatiques.

Le présent rapport comprend 4 sections :

La première section présente l'introduction et les généralités sur le cacaoyer.

La deuxième section traite des matériels et des méthodes utilisés pour générer et analyser les données.

La troisième section qui rapporte les résultats est subdivisée en 4 parties :

1) La première partie traite de l'influence de quelques paramètres climatiques sur l'embryogenèse somatique. Pour cela, l'influence de l'année sur la variation des paramètres climatiques a été évaluée. Au terme d'une telle évaluation, les paramètres les moins variables ont été éliminés. Les plus variables ont été soumis à l'Analyse en Composantes Principales pour en identifier les plus meilleurs. Les meilleurs ainsi identifiés ont été organisés en intervalles de temps appelés périodes. La relation entre ces périodes et les niveaux d'embryogenèse somatique a été établie. Par la suite, la part de la variation de l'embryogenèse attribuable aux paramètres climatiques a été mesurée.

2) La deuxième partie rapporte l'influence de la phénologie sur l'embryogenèse somatique. En s'inspirant de la méthode d'organisation des paramètres climatiques en périodes, les paramètres phénologiques ont été structurés en classes phénologiques. Après, un lien a été établi entre les classes phénologiques et l'embryogenèse somatique. La contribution des paramètres phénologiques aux fluctuations de l'embryogenèse somatique a d'abord été analysée. Ensuite la contribution commune de la variation des paramètres climatiques et phénologiques à la variation de l'embryogenèse somatique a été évaluée.

3) La troisième partie analyse les relations entre le climat et la phénologie.

4) La quatrième partie étudie l'influence des paramètres génétiques sur la callogenèse et l'embryogenèse somatique. Du fait de l'appartenance du génotype, de l'explant et du milieu d'induction au même dispositif d'évaluation, ces trois facteurs ont été analysés dans cette partie. Une telle analyse a débouché sur la caractérisation des aptitudes callogènes et embryogènes des 6 hybrides, 2 clones témoins et 5 géniteurs de ces hybrides. De même l'influence réciproque exercée par les staminodes et les pétales lorsqu'ils sont cultivés sur le même milieu d'induction de la callogenèse, a été examinée.

La quatrième section présente la discussion, la conclusion et les perspectives.

L'article intitulé " Characterization of callogenic and embryogenic abilities of some genotypes of cocoa (*Theobroma cacao* L.) under selection in Côte d'Ivoire", tiré des travaux de cette thèse, a été publié dans la revue *Biotechnology*. Cette publication a été jointe à la présente thèse dans la partie publication.

1. GENERALITES

1.1. Le cacaoyer

1.1.1. Importance socio-économique de la cacaoculture dans le monde et en Côte d'Ivoire

La cacaoculture constitue une source importante de devises pour de nombreux pays en développement (ICCO, 2005). A l'échelle mondiale, la vente de cacao rapporte environ 2,9 milliards de dollars US annuellement aux pays producteurs (Gray, 2000). Les graines mures extraites de cabosses sont fermentées et séchées puis transformées industriellement en produits de chocolaterie semi-finis tels que la pâte, le beurre et la poudre de cacao. De même, les produits finis de chocolaterie appelés chocolats sont obtenus par cette industrie. Les surfaces cultivées couvrent près de 5 millions d'hectares (Gray, 2000). La production mondiale de fèves, au cours de la campagne 2004-2005, a été de 3,3 millions de tonnes (ICCO, 2005). Sept pays producteurs fournissent près de 75 % de la production mondiale et font partie de l'alliance de pays producteurs de cacao. Il s'agit de la Côte d'Ivoire (premier producteur avec 44,25 % de la production), le Ghana (13,35 %), le Nigeria (5,94 %), le Brésil (4,67 %), le Cameroun (4,26 %), la République Dominicaine (1,44 %), la Malaisie (1,31 %; ICCO, 2005). En Côte d'Ivoire, la cacaoculture couvre 2 176 000 ha, soit 6 % du territoire national. Six millions de personnes vivent directement ou indirectement du cacao, soit 30 % de la population active (Anonyme 2, 2004). La cacaoculture procure environ 30 % des recettes globales d'exportation. Elle participe à plus de 15 % au produit intérieur brut (ICCO, 2000).

1.1.2. Développement et évolution de l'industrie cacaoyère

Les Mayas et les Aztèques d'Amérique ont été certainement les premiers à utiliser les fèves du cacaoyer comme produit de consommation et monnaie d'échange (Lanaud *et al.* 1999). Ils avaient attribué une origine divine au cacaoyer. C'est certainement pour rappeler cette légende que Linné donna au cacaoyer cultivé le nom de *Theobroma cacao* (du grec Theos = dieux, et bromo = nourriture : « breuvage des dieux » (Mossu, 1990).

Les Espagnols ont eu l'ingéniosité de remplacer certains ingrédients utilisés par les Aztèques dans leur breuvage, par le sucre de canne et la vanille. Ils ont ainsi considérablement amélioré la qualité du breuvage au point d'en répandre l'usage dans toutes leurs colonies. Dès la fin du XVIe siècle, le cacaoyer est cultivé dans la plupart des régions tropicales

d'Amérique Centrale et du Sud ainsi que dans les Antilles.

En Afrique, le cacaoyer est cultivé au début du XIXe siècle dans les îles de Fernando Poo (Malabo) par un Britannique et de Sao Tomé par les Hollandais et les Portugais. Il a été introduit par les Français à Madagascar en 1800. Les premières semences introduites sur le continent africain en 1857 provenaient de Surinam et ont été importées au Ghana par des missionnaires Suisses (Braudeau, 1969; Mossu, 1990). Des nouvelles importations ont été faites ensuite à Sao Tomé en 1886. Dès la fin du XIXe siècle, la culture prospère rapidement au Ghana. Le cacaoyer fût introduit également à cette époque au Nigeria, au Cameroun et en Côte d'Ivoire.

Les Espagnols, les Hollandais et les Portugais introduisirent cette culture dans toutes leurs colonies d'outre mer et dans le Sud-Est asiatique (Mossu, 1990). Par ailleurs, l'impulsion donnée à la culture du cacaoyer au cours du XIXe siècle est liée au développement de l'industrie du chocolat en Europe. De grandes firmes naissent à cette époque. Ainsi, le XX^e siècle est caractérisé par un développement considérable de la production, qui atteint 1,5 millions de tonnes en 1964 et dépasse aujourd'hui 2 millions de tonnes. L'Afrique fournit à elle seule près de 55 % de cette production (Mossu, 1990).

1.1.3. Origine et taxonomie

Le cacaoyer est un arbre originaire des forêts d'Amérique tropicale (Figure 1). Il se rencontre à l'état naturel dans les forêts humides d'Amérique centrale et du sud, ainsi que dans le bassin amazonien. Le centre de diversification primaire et d'origine du cacaoyer se trouve à l'endroit où naît le bassin de Haute-Amazonie (Wood et Lass, 1985 ; Paulin, 1994). L'Amérique Centrale est considérée comme le centre de domestication (Paulin, 1994)

Les cacaoyers cultivés appartiennent à la classe des Magnoliopsida, à la sous-classe des Dilleniidae, à la famille des Malvaceae (Whitlock *et al.* 2001), au genre *Theobroma*, à l'espèce *Theobroma cacao*. Cette espèce fut décrite pour la première fois par Linné et classée dans la famille des Sterculiacées. Cependant, Whitlock *et al.* (2001) l'ont déclassée dans la famille des Malvacées. Les cultivars Criollo, Forastero et Trinitario constituent les 3 groupes génétiques identifiés au sein de cette espèce.



Figure 1 : Pied fructifère de cacaoyer.

Des espèces du genre *Theobroma* autres que *Theobroma cacao* L., sont exploitées localement. Elles peuvent être des sources importantes de résistance contre les agents biotiques qui affectent la productivité du cacaoyer. Ce sont *Theobroma angustifolium*, *Theobroma bicolor*, *Theobroma grandiflorum*, *Theobroma glaucum*, *Theobroma gileri*, *Theobroma speciosum*, *Theobroma cirmolinoe* etc.

1.1.4. Biologie

1.1.4.1. Croissance du plant

Le fruit du cacaoyer est une cabosse dans laquelle les graines sont enveloppées d'une pulpe mucilagineuse. Le mucilage contient un inhibiteur de germination, qui retarde la celle-ci à l'intérieur de la cabosse. Les cabosses saines peuvent mûrir entre 5 à 7 mois et gardées intactes 3 à 4 semaines sans perte de viabilité. Les graines n'ont pas de dormance. Une fois la cabosse ouverte, le mucilage se décompose rapidement et la germination des graines commence. Cette germination est épigée et se produit 4 à 6 jours après le semis. La racine blanchâtre, s'allonge assez rapidement tandis que les cotylédons sont soulevés de 5 à 7 cm à cause du développement de l'hypocotyle. Ce développement correspond à la première phase de croissance appelée stade soldat. De même, la deuxième phase de développement commence avec l'ouverture des cotylédons, puis l'émergence d'une tige surmontée par 4 premières petites feuilles pubescentes aux entrenœuds courts. La croissance verticale se poursuit pour atteindre une taille de 1 à 2 m. A ce stade, la plante entre dans sa troisième phase de croissance marquée par l'arrêt de la croissance verticale et l'émergence sur le bourgeon terminal de la tige de 3 à 5 bourgeons axillaires disposés en verticille avec de très courts entrenœuds. Ils croissent latéralement et simultanément pour former la couronne de l'arbuste. Ainsi chez le cacaoyer, le dimorphisme de croissance se manifeste par le développement de la tige verticale orthotrope et des branches latérales plagiotropes. Si le tronc continue sa croissance en épaisseur, il atteint au moment de la formation de la couronne sa hauteur définitive avoisinant 1,50 m (Braudeau, 1969; Mossu, 1990).

1.1.4.2. Floraison et fructification

Le cacaoyer peut fleurir toute l'année. Les fleurs apparaissent sur les parties défeuillées du bois âgé, aussi bien sur le tronc, sur les branches principales que sur les ramifications

secondaires. Une telle floraison est appelée cauliflorie. La première floraison peut se produire entre 18 et 24 mois, après le plantage, pour des variétés très précoces. Généralement, cette floraison a lieu la troisième ou la quatrième année. La répartition des époques de floraison dépend cependant des conditions climatiques. Cette floraison est favorisée par des températures moyennes élevées et des pluies abondantes.

A l'aisselle de chaque feuille existe un bourgeon axillaire principal. Ce bourgeon avorte peu de temps après la chute de la feuille s'il ne s'est pas développé pour donner un axe végétatif. A côté de ce bourgeon axillaire principal se forment successivement plusieurs bourgeons latéraux secondaires. Généralement, ces bourgeons latéraux peuvent éventuellement se substituer au bourgeon axillaire principal dégénéré pour former un rameau végétatif. Cependant, ils restent dormants pendant plusieurs années pour former finalement des inflorescences. Les zones où apparaissent chaque année les inflorescences sont visibles sur les arbres. Les inflorescences y forment de petits massifs renflés appelés coussinets floraux, lesquels peuvent porter chacun plusieurs fleurs en même temps.

L'inflorescence est une cyme bipare aux ramifications très courtes, de 1 à 2 mm, dont la fleur est supportée par un pédoncule de 1 à 3 cm. La fleur est de petite taille, régulière, pentamère, composée de 5 sépales soudés à leur base. Son diamètre varie de 0,5 à 1 cm. Elle est blanche ou teintée de rosé. Les 5 pétales alternent avec les sépales et sont très étroits à la base. Ils s'élargissent et deviennent concaves pour former un petit capuchon de couleur blanche appelé cuculle. L'ovaire, supère, comprend 5 loges contenant chacune 6 à 10 ovules disposés autour de l'axe central de l'ovaire. Celui-ci est surmonté par un style tubulaire, terminé par 5 stigmates. L'androcée est composé de 5 étamines alternant avec 5 staminodes stériles soudés à leur base pour former un tube très court. Les anthères sont logées à l'intérieur des cuculles de chacun des pétales correspondants. Chaque étamine est double, provenant en réalité de la fusion de 2 étamines. Les anthères comportent 4 sacs polliniques. L'épanouissement du bouton floral débute l'après-midi. Celui-ci est complet aux premières heures de la matinée suivante.

La pollinisation du cacaoyer est essentiellement entomophile. Les fleurs qui n'ont pas été pollinisées tombent au bout de 48 H. Après la germination du grain de pollen sur le stigmate, le tube pollinique pénètre dans le style et progresse jusqu'au sac embryonnaire

de l'ovule. Ceci a lieu 24 H après la pollinisation. Les tubes polliniques pénètrent presque simultanément dans tous les ovules de la fleur. Dans le sac embryonnaire de l'ovule, le premier anthérozoïde fusionne avec l'oosphère pour former le zygote tandis que le second anthérozoïde s'accole aux deux noyaux polaires pour former le noyau triploïde de l'endosperme. Après la fusion des gamètes, le développement du fruit est amorcé. Le cacaoyer est préférentiellement allogame (Braudeau, 1969; Mossu, 1990). Le taux d'allogamie n'est pas stable et dépend de l'environnement. On l'estime généralement à 75 % (Paulin, 1994).

1.1.5. Génétique du cacaoyer

1.1.5.1. Différentes méthodes de sélection

Trois principales méthodes de sélection sont utilisées chez le cacaoyer. Il s'agit de la sélection clonale, la sélection d'hybrides de clones et l'amélioration des populations par sélection récurrente réciproque (Paulin, 1994; Clément *et al.* 1996).

1.1.5.2. Cytogénétique

Le niveau de ploïdie de l'espèce *Theobroma cacao* L. est celui du genre *Theobroma*. Dans ce genre, les noyaux diploïdes contiennent toujours 20 chromosomes ($2n = 20$). Les chromosomes sont tous de très petite taille, les plus grands ont une longueur de 2 microns (Lanaud *et al.* 1999). Le génome du cacaoyer est petit et sa taille a été estimée à 0,4 picogramme par génome haploïde (Lanaud *et al.* 1999).

Des essais de polyploïdisation, par traitement de graines en germination avec la colchicine, ont permis d'obtention des tétraploïdes. Ces tétraploïdes présentent des feuilles plus épaisses, de couleur plus foncée, pourvues de stomates de plus grande taille mais en nombre réduit (Braudeau, 1969; Mossu, 1990).

1.1.5.3. Incompatibilité

L'incompatibilité est la réaction de rejet du pollen par les tissus femelles avant la fécondation ou la non viabilité de l'embryon hybride formé (Demarly, 1977 ; Bonnet – Masimbert et Villar, 1986). Elle peut être gamétophytique, sporophytique ou gamétosporophytique (Demarly, 1977 ; Wood et Lass, 1985 ; Lanaud *et al.* 1999). Chez le cacaoyer, l'incompatibilité est gamétosporophytique. Les tubes polliniques se développent normalement dans tous les cas, mais quand le mélange est incompatible, le gamète mâle ne fusionne pas avec le gamète

femelle (Knight et Rogers, 1955 ; Cope, 1962; Lanaud *et al.* 1999). En conséquence, l'ovaire ne se développe pas et la fleur tombe 3 à 4 jours après la pollinisation. L'incompatibilité renforce l'allogamie dans certaines espèces.

L'auto-incompatibilité a l'avantage de maintenir dans une population une grande variabilité génétique et la sélection clonale a plus de chance de succès dans cette population. Elle présente également un grand avantage pour la réalisation d'un programme de sélection par hybridation. Pour cela, il suffit, pour obtenir des graines hybrides de parents auto-incompatibles de planter en mélange, en champ semencier isolé, les 2 clones parents (Braudeau, 1969; Mossu, 1990).

1.2. Climats de la zone cacaoyère

Le genre *Theobroma* se rencontre à l'état naturel dans les étages inférieurs des forêts humides d'Amérique tropicale. Les latitudes de ces forêts sont comprises entre 18° Nord et 15° Sud. L'altitude est généralement inférieure à 1250 m. Il exige des températures relativement élevées avec une moyenne annuelle située entre 30 - 32 °C au maximum et 18 - 21 °C au minimum. Une forte humidité et un couvert le protégeant de l'insolation directe et de l'évaporation lui conviennent très bien. Une pluviométrie annuelle, supérieure à 2 m, bien répartie sur l'année, permettent une bonne expression de ses potentialités (Braudeau, 1969; Mossu, 1990).

1.2.1. Facteurs climatiques

1.2.1.1. Température

La chaleur commande les rythmes biologiques et leur intensité. Ainsi, les flux de croissance, la floraison, la fructification, la germination sont sous la dépendance de la température. Elle a une action majeure sur la circulation de l'eau. Ses valeurs élevées sont rapidement limitantes surtout s'il y a déficit hydrique. Dans les différenciations végétales sous les tropiques, les températures agissent davantage par leurs écarts (Groulez *et al.* 1989). Les fluctuations saisonnières ou quotidiennes de la température affectent plusieurs processus physiologiques du cacaoyer comme le rythme des poussées foliaires et la surface foliaire totale. Ces fluctuations affectent aussi la croissance du tronc en épaisseur, la floraison, la pourriture brune des cabosses et la décomposition de la matière organique (Braudeau, 1969; Mossu, 1990).

1.2.1.2. Lumière

Elle est l'agent essentiel de la photosynthèse et son action la plus importante concerne l'assimilation chlorophyllienne. Celle-ci dépend de la quantité de lumière reçue (Groulez *et al.* 1989). La lumière influe sur le développement des poussées foliaires, la morphologie du feuillage, l'ouverture des stomates, la croissance, la nutrition et la production du cacaoyer (Braudeau, 1969; Mossu, 1990).

1.2.1.3. Humidité atmosphérique

Elle provient de l'évaporation du sol, des nappes d'eau et des vents humides. Elle a une action directe sur l'évaporation de l'eau contenue dans le sol, la transpiration et l'évaporation végétale (Groulez *et al.* 1989). Le cacaoyer s'accommode bien d'une atmosphère chaude et humide. Cependant, une telle atmosphère est aussi favorable aux maladies cryptogamiques. L'humidité élevée convient parfaitement au cacaoyer lorsque l'eau utilisable du sol devient insuffisante. Une telle élévation de l'humidité permet alors de diminuer l'évapotranspiration (Braudeau, 1969; Mossu, 1990).

1.2.1.4. Pluviosité

La liaison de la pluie avec la température est la conséquence du refroidissement de masses d'air humide. La distribution de la pluie est liée à la circulation des masses d'air. La pluie est l'élément de différenciation climatique le plus marquant (Groulez *et al.* 1989).

1.3. Embryogenèse somatique chez le cacaoyer

1.3.1. Etat des connaissances sur l'embryogenèse somatique chez le cacaoyer

Plusieurs dates ont marqué les progrès réalisés sur l'embryogenèse somatique du cacaoyer. Ces progrès ont été réalisés suivant les étapes du développement embryonnaire. Il s'agit de la production, la maturation, la germination et la conversion d'embryons somatiques en plantules. Ces progrès ont été effectués également en fonction de la nature de l'explant. De la sorte, les étapes du développement embryonnaire et la nature de l'explant utilisé ont servi de jalons relativement au progrès réalisés au cours du temps.

1.3.1.1. Production d'embryons somatiques à partir d'anthères, d'ovules, de nucelles et d'embryons zygotiques sur le milieu MS

1975 : Esan a complété le milieu MS par la vitamine B, la glycine, le myo-inositol (100 mg / l), la tryptone, le Bacto agar (0,8 %), le sucrose (5-20 %), l'ANA (0,3 – 3 mg / l) et le GA3 (50 mg / l).

1.3.1.2. Production d'embryons somatiques à partir d'embryons zygotiques sur le milieu MS

1989 : Pence *et al.* ont additionné l'hydrolysate de caséine (2000 mg / l), le lait de coco (10 %), l'AIA (13,6 mg / l) où l'ANA (1,5 – 6 mg / l) au milieu MS.

1989 : Dos Santos et Machado ont produit et scanné des embryons somatiques. Les images obtenues ont montré des anomalies affectant la taille, la forme et le nombre de cotylédons. Ces anomalies ont affecté aussi le nombre de cellules formant les poils glandulaires appelés trichomes ainsi que la présence du suspenseur. Le milieu MS a été complété par la zéatine (1-1,5 mg / l) et de la gelrite (2 g / l).

1991 : Pence a produit des embryons somatiques et les a prétraités avec du sucrose à 3 % - 21 % avec ou sans l'ABA puis cryoconservés dans de l'azote liquide.

1992 : Chatelet *et al.* ont ajouté les vitamines de Morel, le 2,4D (4,5 μ M) et la BAP (0,4 μ M) au milieu MS. Le nucelle et le tégument interne des graines immatures ont été utilisés comme source d'explants.

1.3.1.3. Maturation des embryons somatiques par le métabolisme des acides gras produits sur le milieu MS

1981 : Pence *et al.* ont confirmé le métabolisme des acides gras chez les embryons somatiques pendant leur maturation. En effet, chez les embryons zygotiques la maturation est caractérisée par la conversion des acides gras polyinsaturés en insaturés et saturés. Le saccharose a été utilisé comme substance régulatrice. La maturation en embryogenèse se traduit souvent par la transformation et / ou l'accumulation des substances de réserve telles que l'amidon et les protéines au sein de l'embryon.

1984 : Kononowicz A. K. et J. Janick, ont réussi à accroître simultanément le métabolisme des lipides, des anthocyanes et des alcaloïdes chez les embryons zygotiques *in vitro*, *in vivo*. Cet accroissement a été également constaté chez les embryons somatiques. Pour

analyser la maturation, des dosages aux stades 100 jours et 150 jours ont été réalisés. L'hydrolysate de caséine (1000 mg / l), le myo-inositol (100 mg / l), la glycine (2 mg / l), la pyridoxine-HCl (0,5 mg / l) ont été ajoutés au milieu MS à l'état liquide. Ici également, le saccharose a été utilisé comme substance régulatrice.

1.3.1.4. Germination des embryons somatiques sur les milieux MS et de Renewal

1984 : Wang et Janick ont réussi à induire la germination d'embryons somatiques sur le milieu MS dilué de moitié et sur le milieu de Renewal. La germination en embryogenèse est toujours marquée par l'émission et l'élongation racinaires chez l'embryon.

1.3.1.5. Production d'embryons somatiques à partir d'explants de feuilles sur le milieu MS

1986 : Litz a produit des embryons somatiques sur le milieu MS dilué de moitié. Le sucre (6 %), le charbon actif (0,2 %), la BA (100-140 mg / l) et le 2,4 D (5-20 mg / l) ont été ajoutés à ce milieu MS.

1.3.1.6. Production, conversion en plantules d'embryons somatiques à partir de cotylédons et d'axes embryonnaires d'embryons zygotiques immatures sur le milieu MS

1986 : Novak *et al.* ont produit et converti en plantules des embryons somatiques. L'hydrolysate de caséine (2000 mg / l) et l'ANA (1,8 mg / l) dans un premier temps, la zéatine (0,22 mg / l) et l'ANA (0,0018 mg / l) dans une seconde phase ont été additionnés au milieu MS. La conversion en plantules en embryogenèse est caractérisée par l'élongation des feuilles néoformées, donc le début de l'édification de l'appareil aérien chez l'embryon.

1988 : Adu-Ampomah *et al.* ont produit et converti en plantules des embryons somatiques directs et indirects à partir d'explants extraits d'embryons zygotiques immatures. Ces explants constitués d'axes embryonnaires et de cotylédons ont été cultivés sur 3 milieux de base MS dont l'un ne contenait pas d'hormone. Par ailleurs, les embryons somatiques cultivés sur le milieu solide ont connu un arrêt de développement. Néanmoins, ils ont formé des cals. Par contre, ceux cultivés sur le milieu liquide ont développé de grands cotylédons.

1989 : Duhem *et al.* ont produit et converti en plantules des embryons somatiques directs et indirects à partir de cotylédons et d'axes d'embryons zygotiques. Pour induire

l'embryogenèse somatique, le milieu de base MS a été additionnés de 2 types distincts de composés. Le premier est formé de la thiamine (1 mg / l), l'ANA (10,75 μ M) et l'hydrolysate de caséine (2000 mg / l). Le second est constitué de la BAP (4,42 μ M), l'AIA (0,57 μ M) et la GA3 (0,029 μ M). Le saccharose (30 g / l) a été utilisé comme source de carbone. Les embryons somatiques ont été développés sur le milieu MS, entier ou dilué de moitié, complété par la BAP, la zéatine et le 2ip. Les concentrations de ce dernier ont varié de 0,6 à 5 μ M avec ou sans l'ANA (0,0108 μ M). Un protocole d'induction de l'embryogenèse secondaire a aussi été développé.

1991 : Wen et Kinsella ont produit et converti en plantules des embryons somatiques. La composition en acides gras de ces embryons somatiques a été similaire à celle d'embryons zygotiques immatures. Mais cette composition en acides gras a été différente de celle d'embryons zygotiques matures. Le milieu MS a été additionné de sucrose (30 g / l), de la glycine, des vitamines MS, de l'ANA (32 μ M), de l'hydrolysate de caséine (0,10 %).

1993 : Figueira et Janick ont confirmé l'embryogenèse somatique nucellaire. Ils ont développé un protocole améliorant la conversion d'embryons somatiques nucellaires en plantules. Pour cela, la variation de la teneur en CO₂ de la chambre de culture a été testée. Le milieu MS dilué de moitié, a été complété par la thiamine-HCl, la pyridoxine-HCl, le myo-inositol, l'acide nicotinique, la glycine, le sucrose (117 mM). L'eau de coco (10 %), le 2,4D (4 μ M), le 2ip (0,5 μ M), l'extrait de malt (0,5 g / l), la polyvinylpyrrolidone, l'hydrolysate de caséine (0,5 g / l), ont été également utilisés. Le pH a été ajusté à 5,3 avant la stérilisation des milieux de culture à l'autoclave.

1.3.1.7. Production et conversion en plantules d'embryons somatiques à partir d'explants floraux sporophytiques sur les milieux MS, Kao et DKW

1989 : Söndahl *et al.* ont produit des embryons somatiques à partir de pétales de jeunes boutons floraux.

1993 : Söndahl *et al.* ont produit et converti en plantules des embryons somatiques à partir de pétales extraits de boutons floraux et du nucelle. Pour les pétales, le taux de conversion de ces embryons en plantules a avoisiné 4,3 %. Pour le nucelle, le taux de conversion a été de 2 %. Les milieux MS et Kao ont été utilisés. Le milieu MS a été

complété par le sucrose (30 g / l), le 2,4D (10 μ M), la kinétine (1 μ M) et le Difco Bacto-Agar (0,8 g / l). Le milieu Kao a été additionné de la polyvinylpyrrolidone (PVP - 40, 5 g / l), l'eau de coco 5 %, le 2-(N-morpholino)-éthanesulfonic acid (MES ; 600 mg / l), le 2,4D (3 μ M), le sucrose 30 g / l et le Difco Bacto-Agar 0,8 g / l.

1993 : Lopez-Baez *et al.* ont produit et converti en plantules des embryons somatiques. Les pétales, les staminodes, les étamines et la base des pièces florales extraits de boutons floraux d'arbres âgés de 2-3 ans ont été utilisés comme source d'explants. Le milieu de base MS a été complété par des acides aminés tels que la L-leucine, la L-lysine, la L-tryptophane et la L-arginine. Le pourcentage d'embryogenèse somatique a été de 2 % pour les explants cultivés sur du 2,4D (1,5 mg / l) et du 2ip (0,25 mg / l). Ce pourcentage a été de 6,7 % pour les explants cultivés sur du 2,4D (2 mg / l) et de la Kinétine (0,25 mg / l).

1997 : Alemanno *et al.* ont déterminé des facteurs pouvant être limitants et susceptibles d'expliquer les faibles taux de germination et de conversion en plantules d'embryons somatiques. Pour cela, des techniques exploratoires histologiques, biochimiques et physiologiques ont été réalisées chez les embryons zygotiques et somatiques. Les staminodes, les étamines et le milieu MS ont été utilisés respectivement comme explants et comme milieu de base. Des anomalies morphologiques affectant 80 % de la population totale d'embryons somatiques analysés ont été mises en évidence. Ceci, à partir des critères morphologiques, histologiques et physiologiques. L'augmentation de la concentration du sucrose et de l'acide abscissique dans le milieu de maturation a permis d'accroître la synthèse de substances de réserve (protéines et amidon). Cette augmentation a aussi permis d'améliorer la germination, la conversion et les taux d'acclimatation. Cependant, ces résultats sont restés insatisfaisants en raison du faible développement d'embryons somatiques et de l'insuffisance de leur conversion en plantules.

1998 : Li *et al.* ont produit des embryons somatiques et amélioré leur taux de production et de conversion en plantules à partir des staminodes. Le milieu de base DKW a été additionné de glucose (20 g / l), de 2,4D (9 mM), en association avec 6 concentrations variées de TDZ (0 ; 22,7 ; 45,5 ; 113,6 ; 227,3 ; 454,5 nM). Sur le milieu de callogenèse primaire (PCG) sans phytohormone, les taux d'embryogenèse ont varié de 0,6 à 44 %. Par

contre, sur le milieu PCG contenant des phytohormones (TDZ et 2,4D), des taux d'embryogenèse de 98 % voire 100 % ont été obtenus avec le génotype SCA6. C'est ainsi que la concentration 22,7 nM a été identifiée comme optimale pour la callogenèse et l'embryogenèse. De même, cette concentration a favorisé la production efficace d'embryons somatiques chez les divers génotypes évalués. Deux types d'embryons somatiques ont été mis en évidence. Il s'agit du type I (jaunâtre, translucide à grands cotylédons) et du type II (blanchâtre, opaque à petits cotylédons). Ceci, à partir de leur apparence et de leur comportement pendant la croissance. Seul le type II a produit des racines. Ces travaux ont significativement contribué à la recherche des méthodes de multiplication conforme des génotypes d'intérêt.

1.3.2. Importance de l'embryogenèse somatique

La multiplication conforme des génotypes d'intérêt de cacaoyer a une grande importance. En effet, chez les espèces allogames, au terme d'un programme de sélection, les hybrides créés ne peuvent être reproduits par voie sexuée. Cette voie entraîne une ségrégation des caractères portés par l'arbre. Il convient donc de les multiplier végétativement. La voie végétative permet de reproduire fidèlement une association intéressante de caractères présentés par l'arbre (Braudeau, 1969; Mossu, 1990).

L'importance de l'embryogenèse somatique chez le cacaoyer réside dans le fait que le mode de reproduction allogame ne permet pas une reproduction à l'identique d'un génotype. Les avantages de l'embryogenèse somatique sont :

- l'obtention de plants conformes au pied-mère ;
- l'architecture et le comportement des plants régénérés à partir d'embryons somatiques sont similaires à ceux des plants issus de graines (Li *et al.* 1998) ;
- le système racinaire est souvent pivotant et traçant ;
- la possibilité de création des variants somaclonaux désirables pouvant améliorer la résistance aux maladies (Adu-Ampomah *et al.* 1988) ;
- la possibilité d'accroissement des gains en champs (Alemanno *et al.* 2003).

A l'opposé, ses inconvénients sont :

- la possibilité de création de variants somaclonaux indésirables ;
- les pertes parfois élevées au moment de l'acclimatation du fait de la fragilité des

régénérateurs ;

- le coût élevé de la production des régénérateurs ;

- le temps s'écoulant entre l'initiation de la culture d'explants, la régénération d'embryons, leur maturation, leur germination, leur conversion en plantules ainsi que leur transfert à la serre, en moyenne supérieur à 12 mois.

1.3.3. Relation entre l'embryogenèse somatique et les phytohormones

L'embryogenèse somatique est un phénomène induit (Duhem *et al.* 1989) à partir de tissus déjà différenciés, grâce à la totipotence de la cellule végétale. La totipotence est la propriété que possèdent les cellules embryonnaires ou dédifférenciées de constituer ou reconstituer des tissus variés en fonction de diverses influences qu'elles subissent. Les phytohormones exogènes apportées en suppléments dans les milieux de culture (auxine, cytokinine, inhibiteurs de croissance et gibbérellines) sont les principaux responsables de l'embryogenèse somatique. Il en est de même des phytohormones endogènes, tels que l'AIA, produits pendant la culture de tissus (Alemanno, 1995). Grâce aux connaissances accumulées, il est maintenant possible de prévoir toute une séquence de milieux de culture qui pourrait produire, au terme de la culture, des embryons somatiques (Augé *et al.* 1984). Pour y arriver, il faut identifier une bonne balance hormonale exogène.

1.3.4. Relation entre l'embryogenèse somatique et certains facteurs climatiques

Les phytohormones telles que l'auxine, les gibbérellines, les cytokinines, l'éthylène, l'acide abscissique ont été trouvées chez toutes les plantes (Augé *et al.* 1984). Kofler (1969) a montré la variation de la production d'auxine endogène selon les saisons. Ainsi, un pic de la concentration en auxine chez le bourgeon et la pousse de pommier a été observé entre Mai et Juin. Du fait de l'effet morphogène de ces substances, l'embryogenèse somatique serait liée au climat. Ainsi, Alemanno (1995) et Tan et Furtek (2003) ont constaté des fluctuations dans la production d'embryons somatiques de cacaoyer en fonction des saisons.

1.3.5. Relation entre l'embryogenèse somatique et certains caractères phénologiques

Certains caractères phénologiques tels que la floraison, la fructification, les rythmes de

poussées foliaires sont régis par les phytohormones endogènes (Heller *et al.* 1995). Ces phytohormones endogènes agissent en relation avec les stimuli extérieurs et intérieurs à la plante. Le problème de l'époque de prélèvement des explants se pose chez certaines espèces pour lesquelles il existe un stade de vie active et un stade de vie ralentie. A ces stades, les réactions des tissus sur les milieux de culture sont souvent différentes. Par ailleurs, au cours du cycle annuel, les équilibres internes de la plante évoluent. C'est ainsi qu'au printemps, on assiste à une croissance des organes révélée par la présence de régulateurs comme l'auxine, les gibbérellines et les cytokinines. En été, par contre, ce flux de substances diminue puis, à l'automne, apparaissent des inhibiteurs (Augé *et al.* 1984). Il est donc évident que les tissus mis en culture présentent des réactions différentes s'ils sont placés sur des milieux de même composition (Augé *et al.* 1984). En conséquence, les caractères phénologiques peuvent influencer l'embryogenèse somatique à travers les phytohormones endogènes.

En somme, le procédé d'embryogenèse a commencé principalement par la culture d'explants issus d'embryons zygotiques sur le milieu MS. Du fait de la méconnaissance des potentialités réelles du génotype issu de la fécondation, ces explants ont été abandonnés. Par la suite, la recherche s'est orientée vers l'utilisation des tissus sporophytiques maternels. C'est ainsi que les staminodes, les pétales, les filets, les styles et la base des pièces florales ont été testés. Li *et al.* (1998) se sont inspirés des travaux de Lopez-Baez *et al.* (1993) et Söndahl *et al.*, (1993) pour améliorer l'efficacité de la production d'embryons somatiques, leur maturation, leur germination et leur conversion en plantules. En raison de la variation enregistrée dans la production d'embryons somatiques, selon les saisons, la phénologie, le génotype, l'explant et le milieu d'induction, nous avons décidé de contribuer à la compréhension de ce phénomène. En prenant appui sur les travaux de Li *et al.* (1998), nous avons conçu un protocole qui nous a permis d'analyser l'influence des paramètres sus-mentionnés sur l'embryogenèse somatique.

SECTION 2

MATERIEL ET METHODES

1. MATERIAL

1.1. Site expérimental

Les expériences ont été conduites sur 2 sites localisés dans 2 banlieues distinctes d'Abidjan. Il s'agit du site de prélèvement des boutons floraux et de celui d'initiation des cultures. Le site de prélèvement des boutons floraux est situé à environ 25 km à l'Est de la ville d'Abidjan. Il est domicilié à l'ancienne station de recherche sur le cacaoyer du CNRA localisé à Bingerville. Cette station abrite l'une des collections vivantes de génotypes de cacaoyer du CNRA. Elle est située à 3° 52' 59" de longitude Ouest et 5° 21' 42" de latitude Nord. Les boutons floraux, utilisés pour toutes les expériences, y ont été prélevés sur des pieds localisés dans 5 parcelles différentes. Il s'agit des parcelles B1A, B1B, B10, C2/1 et C2/3. Ce site a reçu durant les 2 premières années d'étude un total pluviométrique hebdomadaire de 4186,80 mm, une température maximale moyenne hebdomadaire de 30,63 °C. La température minimale moyenne hebdomadaire qui y a prévalu a été de 20,16 °C. Un éclaircissement de 77651,42 heures y a été reçu. L'humidité moyenne hebdomadaire de l'air qui y a prévalu a été de 82,13 %. Le site d'initiation de cultures de tissus extraits d'explants floraux est le Laboratoire Central de Biotechnologie du CNRA localisé à Adiopodoumé. Ce laboratoire est situé à 17 km à l'Ouest de la ville d'Abidjan. Trois expérimentations différentes ont y été conduites sur 2 années et demie. Pour la première expérimentation, les mises en culture de staminodes et pétales ont duré 2 années, d'abord de septembre 2002 à août 2003. Puis, de janvier 2004 à décembre 2004. Pour la deuxième, les mises en culture ont été effectuées pendant 17 semaines, de décembre 2003 à avril 2004. Ces 2 premières expérimentations ont été effectuées à raison d'une culture par semaine. Pour la troisième expérimentation, les mises en cultures ont été réalisées de janvier à février 2005. Ici, 2 cultures ont été initiées et conduites par semaine.

1.2. Matériel végétal

Treize génotypes dont 5 clones de géniteurs (IMC67, P19A, Pa13, Pa121 et Pa150), 6 hybrides (L330-A9, L232-A9, L233-A4, L231-A4, L126-A3 et L120-A2) et 2 clones témoins (C151-61 et SCA6) ont été utilisés (Tableau I). Lors de la première expérimentation, les 6 hybrides et les 2 clones témoins ont été utilisés pour :

- analyser les effets du climat et de la phénologie sur l'embryogenèse somatique ;
- analyser la relation entre le climat et la phénologie ;
- caractériser les aptitudes callogènes et embryogènes de ces 8 génotypes et analyser l'effet de l'explant et du milieu d'induction sur leur expression ;

Dans la deuxième expérimentation, 5 clones de géniteurs dont 2 mâles (IMC67 et Pa150) et 3 femelles (P19A, Pa13 et Pa121) ont été utilisés pour caractériser également leur potentiel callogène et embryogène.

Au cours de la troisième expérimentation, les 2 clones témoins (C151-61 et SCA6) ont été utilisés. Cette expérimentation visait à analyser l'influence réciproque exercée par les staminodes et les pétales, lorsqu'ils sont cultivés en co-culture sur le même milieu d'induction de la callogenèse.

1.3. Instruments météorologiques

Les thermomètres ont été utilisés pour relever la température, le pluviomètre pour mesurer la pluviosité, l'hygromètre pour relever l'humidité relative et l'héliographe pour mesurer l'insolation. En dehors des données d'insolation qui proviennent de la station d'Adiopodoumé, les 4 autres nous ont été fournies par le service météorologique de l'ancienne station expérimentale de Bingerville située à une quarantaine de kilomètres d'Adiopodoumé. L'héliographe de la station de Bingerville était hors d'usage.

Tableau I : Récapitulatif sur l'origine et les caractéristiques de chaque génotype (Lockwood and Gyamfi, 1979 ; Ngoran et Paulin, 1988 ; Ngoran, 1996).

Génotypes*		Origine	Caractéristiques
Clones de géniteurs	IMC67	Matériel clonal d'origine Haut Amazonienne décrit par Enriquez et Soria en 1967.	Un des dix meilleurs géniteurs; très tolérant au balai de sorcière; bon rendement ; vigoureux.
	P19A	Matériel clonal d'origine haut Amazonienne sélectionné par Posenette en 1943.	Précoce et vigoureux; rendement moyen, mais accru chez leurs hybrides en cas d'association avec Amelonado ou Trinitario.
	Pa13	Matériel clonal d'origine haut amazonienne.	Précoce et vigoureux; rendement moyen, mais accru chez leurs hybrides en cas d'association avec Amelonado ou Trinitario.
	Pa121	Matériel clonal d'origine haut amazonienne décrit par Enriquez et Soria en 1967.	Précoce et vigoureux. ; rendement moyen, mais accru chez leurs hybrides en cas d'association avec Amelonado ou Trinitario.
	Pa150	Collecté par Pound en Haute Amazonie.	Un des dix meilleurs géniteurs; précoce et vigoureux; bon rendement; résistant à la pourriture brune de cabosses.
Hybrides	L120-A2	Descendant hybride issu du croisement Pa13 x IMC67	Demi-frère de L232-A9, L126-A3 et L231-A4. Précoce et vigoureux. Bonnes forme et taille de cabosses; bon rendement.
	L126-A3	Descendant hybride issu du croisement Pa121 x IMC67	Plein-frère de L231-A4, demi-frère de L233-A4 et L120-A2. Précoce et vigoureux. Bonnes forme et taille de cabosses; bon rendement.
	L231-A4	Descendant hybride issu du croisement Pa121 x IMC67	Plein-frère de L126-A3, demi-frère de L233-A4 et L120-A2. Précoce et vigoureux. Bonnes forme et taille de cabosses; bon rendement.
	L232-A9	Descendant hybride issu du croisement Pa13 x Pa150	Demi-frère de L120-A2 et L330-A9. Précoce et vigoureux. Bonnes forme et taille de cabosses; bon rendement.
	L233-A4	Descendant hybride issu du croisement Pa121 x Pa150	Demi-frère de L231-A4, L126-A3, L330-A9 et L232-A9. Précoce et vigoureux. Bonnes forme et taille de cabosses.
	L330-A9	Descendant hybride issu du croisement P19A x Pa150	Demi-frère de L233-A4 et L232-A9. Précoce et vigoureux. Bonnes forme et taille de cabosses; bon rendement.
Clones témoins	C151-61	Matériel clonal venu du Vénézuéla. BC1* issu du croisement ICS1 x (ICS1 x SCA6).	Taux de nouaison très élevé. Beaucoup sensible à la pourriture brune, aux Mirides, aux malformations des cabosses dues au Wilt.
	SCAVINA 6 (SCA 6)	Collecté par Pound en Haute Amazonie près de l'Hacienda Sabina (Equateur) et décrit par Enriquez et Soria en 1967.	Un des dix meilleurs géniteurs; très tolérant à la maladie du balai de sorcière, résistant à Phytophthora, pourriture brune, mais produit de très petites fèves; bon rendement; vigoureux.

Légende

Génotypes* : **IMC67 :** Iquitos 67, génotype Haut-Amazonien, **Pa150 :** Parinari 150, génotype Haut-Amazonien. **Pa121 :** Parinari 121, génotype Haut-Amazonien. **Pa13 :** Parinari 13, génotype Haut-Amazonien. **P19A :** Pound 19A, génotype Haut-Amazonien. **SCA6 :** Scavina 6, génotype Haut-Amazonien. **BC1:** Back cross 1 obtenu à partir du récurrent ICS1 et du donneur SCA6.

2. METHODES

2.1. Préparation des milieux de culture des tissus

Trois milieux de culture différents ont été utilisés à chaque cycle de culture durant les expérimentations (Annexe I). Il s'agit des milieux de callogenèse primaire PCG, de callogenèse secondaire SCG1 et de développement d'embryons ED. Le milieu de base DKW entre dans la composition des milieux PCG et ED, tandis que le milieu de base Mc Cown constitue le milieu SCG1. Le DKW a été décrit par Driver et Kuniyuki (1984) et Tulecke et Mc Granahan, (1985), alors que le Mc Cown a été décrit par Lloyd et Mc Cown (1980). Ces milieux de base ont été complétés par divers éléments pour constituer les milieux de culture PCG, SCG1 et ED. Trois variantes PCG1, PCG3 et PCG4 du milieu d'induction de la callogenèse PCG, se différenciant par leurs concentrations en 2,4 D et TDZ ont permis d'évaluer les effets induits. Le protocole de préparation de ces milieux a été décrit par Li *et al.* (1998). Les milieux de culture ont été préparés 3 jours avant leur utilisation. Les valeurs du pH ont été ajustées avec du KOH (1M) et du HCl (1M) avant la désinfection à l'autoclave. Cette désinfection a été réalisée à 120 °C, équivalent à 1bar, pendant 18-20 min. Les milieux ont été solidifiés avec 2,0 g / l de phytigel et coulés dans des boîtes de Pétri stériles en verre. Le coulage a été fait sous une hotte à flux laminaire, à raison de 20 à 40 ml respectivement pour les boîtes de Pétri de 9,4 et 11,5 cm de diamètre.

2.2. Prélèvement des boutons floraux et préparation des explants

Les boutons floraux de 4 à 5 mm de longueur ont été prélevés tôt le matin, une fois par semaine, sur chaque génotype à la station de Bingerville. Quelques boutons floraux et une fleur épanouie ont été présentés (Figures 2 et 3). La surface de ces boutons a été stérilisée par immersion dans une solution d'hypochlorite de calcium à 1 % (Aldrich Chemical Company, Inc.) pendant 20 min. Par la suite, ces boutons floraux ont été rincés 3 fois avec de l'eau stérile, puis transférés dans des boîtes de Pétri stériles contenant du papier kleenex sec et stérile. Chaque bouton a été sectionné au niveau de son réceptacle perpendiculairement au grand axe en 2 fragments. Il s'agit des fragments proximal et distal relativement au pédoncule floral. Les milieux d'induction de la callogenèse ont étéensemencés avec les staminodes et les pétales extraits du fragment distal.



Figure 2 : Boutons floraux sur un pied de cacaoyer (1 barre = 0,20 mm. Photo ISSALI).

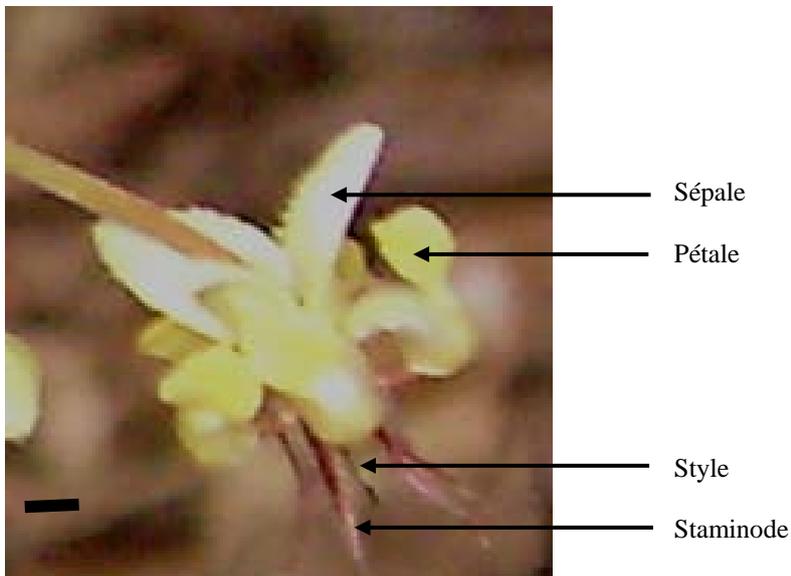


Figure 3 : Fleur épanouie de cacaoyer (1 barre = 0,20 mm. Photo ISSALI).

2.3. Influence de différents paramètres sur l'embryogenèse somatique

2.3.1. Dispositif expérimental utilisé

Les 13 génotypes utilisés se trouvaient pour certains dans des parcelles distinctes et appartenaient à un dispositif préexistant. Pour chaque génotype, un seul et même tête de clone a été utilisé lors des prélèvements de boutons floraux durant les expérimentations.

Pour les 2 premières expérimentations, un dispositif en randomisation totale modifiée avec arrangement factoriel des variantes de 3 facteurs a été utilisé. Les modifications ont porté sur la mise en co-culture des staminodes et des pétales. Les 3 facteurs utilisés ont été représentés par le génotype, l'explant et le milieu d'induction. Ainsi, pour chaque génotype (8 au total), 2 explants (staminodes et pétales) ont été extraits du fragment distal de chaque bouton floral sectionné et cultivés en vrac sur 3 milieux PCG1, PCG3 et PCG4 de callogenèse primaire (Figure 4). Une telle opération a été répétée 3 fois pour chaque génotype et une fois par semaine. Pour la première expérimentation, la combinaison de 35 staminodes et 35 pétales extraits de 7 boutons floraux, d'un génotype donné, cultivés sur un milieu d'induction a constitué un traitement. Un traitement est donc défini ici comme la combinaison de chaque variante des 3 facteurs précités. Chaque traitement étant répété 3 fois, 72 objets ont été obtenus au terme de chaque initiation hebdomadaire de culture pour les 6 hybrides et 2 clones témoins. Soient 3 traitements répétés 3 fois pour chacun des 8 génotypes.

Pour la deuxième expérimentation, les modifications du dispositif expérimental ont porté sur la nature des génotypes et le nombre des milieux d'induction. Les géniteurs IMC67, P19A, Pa13, Pa121 et Pa150 et les milieux d'induction PCG1 et PCG3 ont été utilisés. Chaque traitement étant répété 3 fois, 6 traitements ont été obtenus par génotype.

Pour la troisième expérimentation, les modifications du dispositif expérimental ont porté sur les nombres de génotypes, de répétitions et des milieux d'induction. Les clones témoins SCA6 et C151-61 et le milieu PCG3 ont été utilisés. Le nombre de répétitions de traitements a été porté à cinq. Au facteur "Explant" à 2 variantes (Staminodes et pétales), a été combiné le facteur "Disposition" à 3 variantes (vrac, cis et trans). La disposition trans a représenté le témoin absolu. Les dispositions des staminodes et des pétales du génotype C151-61 en co-culture sur le milieu d'induction PCG3 ont été

montrées (Figure 5 ; Tableau II). Au total, 20 objets ont été obtenus par génotype. L'expérimentation a duré 5 mois. Les aptitudes callogènes et embryogènes primaires des hybrides ont été évaluées dans un premier temps en comparaison de celles des 2 clones témoins, dans une seconde phase, de celles des 5 géniteurs.

Aux phases abondantes de floraison 7 boutons floraux ont été utilisés par boîte de Pétri. Toutefois, aux phases de faible floraison, le nombre de boutons floraux a été réduit en fonction de leur disponibilité. Néanmoins, le nombre de répétitions des traitements n'a pas varié.

Lors du repiquage des cals sur le milieu SCG1, des réarrangements ont été réalisés. Ils ont consisté soit à regrouper en lots les cals de staminodes et des pétales sur le même milieu, soit à les séparer dans des boîtes de Pétri distinctes du milieu SCG1.

2.3.2. Repiquage sur les milieux SCG et ED

Quatorze jours après la mise en culture, les explants callogènes issus des staminodes et des pétales ont été repiqués sur le milieu SCG1. A ce stade, les réarrangements signalés plus haut ont été matérialisés relativement à la disposition initiale des explants sur le milieu PCG.

Pour la première et la deuxième expérimentation, les explants callogènes de staminodes et de pétales initialement disposés en vrac, ont été regroupés en lots sur le milieu SCG1. Le lot d'explants callogènes de staminodes d'un côté, celui de pétales de l'autre maintenus dans la même boîte de Pétri. Seul un trait écrit au marker permanent sur le fond de la boîte de Pétri a concrétisé la séparation (Figure 4b).

Pour la troisième expérimentation, les explants callogènes de staminodes ont été repiqués séparément de ceux des pétales dans des boîtes de Pétri distinctes sur le milieu SCG1 (Figure 5 ; Tableau II). Une telle séparation a concerné les explants disposés en mélange (vrac) et ceux disposés de part et d'autre dans la même boîte (cis).

Quatorze jours plus tard, les explants callogènes développés ont été de nouveau repiqués sur le milieu ED, en maintenant les nouvelles dispositions de culture adoptées sur le milieu SCG1. Sur ce milieu ED, 3 repiquages successifs de 21 jours d'intervalle ont été réalisés avant la mesure des variables sur la callogenèse et l'embryogenèse. Ainsi, un cycle de culture a duré 3 mois après l'initiation. Un comptage systématique des explants callogènes,

embryogènes et des embryons produits a été fait avec la loupe binoculaire. Toutes les cultures ont été conduites à l'obscurité, entre 24 °C et 25 °C.

Les différentes étapes de mise en culture, de croissance d'explants callogènes primaires et secondaires sur les milieux PCG3 et SCG1 ont été illustrées. Il en est de même de l'émergence et de la croissance des embryons sur le milieu ED. La croissance des vitroplants régénérés à partir d'embryons somatiques a été aussi illustrée (Figure 4).

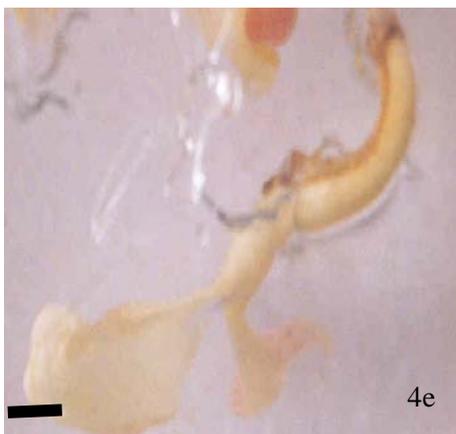
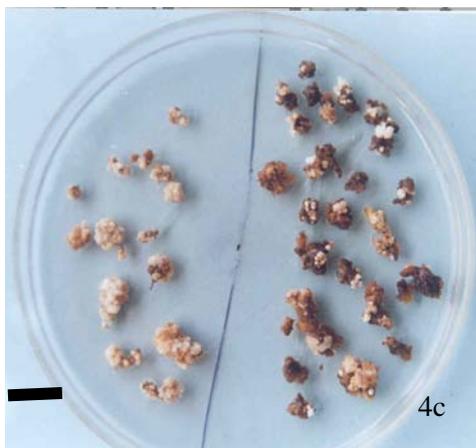
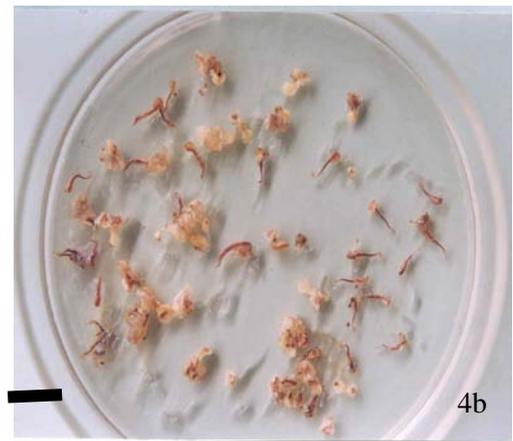
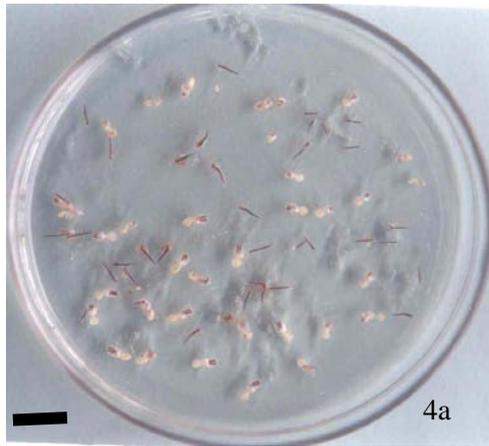


Figure 4 : Différentes phases d'initiation de culture, de croissance d'explants callogènes, d'embryons somatiques et de vitroplants. 4a, staminodes et pétales cultivés sur le milieu d'induction PCG3. 4b, explants callogènes de staminodes et pétales en fin de séjour sur le PCG3. 4c, explants callogènes de pétales et staminodes disposés en lots sur le milieu SCG1. 4d, embryons somatiques émergeant d'explants callogènes du génotype C151-61. 4e, embryon somatique du géniteur Pa13 en cours de croissance. 4f, vitroplants du génotype L233-A4 en croissance, régénérés à partir d'embryons somatiques (1 barre = 2,211 cm. Photos ISSALI).

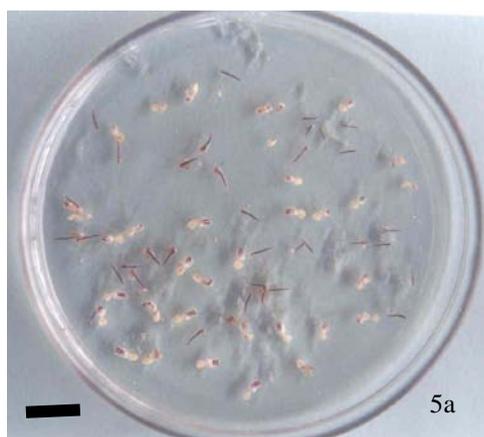


Figure 5 : Dispositions des staminodes et des pétales du génotype C151-61 cultivés sur le même milieu d'induction PCG3, pour mettre en évidence leur influence réciproque. 5a, staminodes et pétales de la disposition en vrac. 5b, staminodes et pétales en lots de la disposition cis. 5c1, pétales cultivés à part de la disposition trans (Témoin absolu positif). 5c2, staminodes cultivés séparément de la même disposition trans (Témoin absolu négatif. 1 barre = 1,769cm. Photos ISSALI).

Tableau II : Dispositif d'évaluation de l'influence réciproque entre les staminodes et les pétales cultivés en culture mixte sur le milieu d'induction PCG3.

Disposition	Mode d'ensemencement des milieux d'induction avec les explants
Vrac	Staminodes et pétales disposés en mélange sur le même milieu dans la même boîte de Pétri (Image 6a).
Cis	Staminodes et pétales disposés en lots de part et d'autre dans la même boîte de Pétri (Image 6b).
Trans	Staminodes et pétales séparés et disposés les uns les autres dans des boîtes de Pétri distinctes (Témoin absolu. Images 6c1 et 6c2).

2.4. Méthodes d'observations

2.4.1. Paramètres climatiques mesurés

La succession des saisons au cours de l'année est connue en Côte d'Ivoire. Néanmoins, ces saisons sont essentiellement caractérisées d'une année à l'autre par des variations aussi bien dans leur durée que dans leurs effets. L'utilisation directe des saisons aurait beaucoup simplifié l'analyse de leurs effets sur l'embryogenèse somatique. Cependant, l'existence des variations sus-mentionnées aurait inévitablement fourni des résultats erronés. En conséquence, pour tenir compte de cette réalité, nos études ont porté sur 5 données météorologiques journalières réelles mesurées. Il a donc fallu effectuer des analyses préalables sur ces données en les transformant en 7 données hebdomadaires, puis mensuelles (Tableau III). De telles transformations ont permis de tester leurs corrélations avec l'embryogenèse somatique à partir d'explants floraux somatiques du cacaoyer.

2.4.2. Définition des périodes climatiques

Pour étudier l'influence du climat sur l'embryogenèse somatique, les variations mensuelles des paramètres climatiques ont été analysées de manière à définir des périodes homogènes ($CV < 20\%$). Ces périodes ont été caractérisées par la fluctuation non significative du paramètre climatique. Le regroupement par classes de valeurs de ces périodes a permis de tester leur corrélation avec l'embryogenèse somatique. Ainsi, une période climatique stable a été définie comme un intervalle de temps constitué de un ou plusieurs mois, où l'on constate une stabilité ($CV < 20\%$) relative du paramètre mesuré. Une période favorable a été définie comme une période climatique stable marquée par une moyenne élevée de l'embryogenèse. En plus, cette période favorable doit être caractérisée par une signification de la régression de l'embryogenèse sur le paramètre climatique qu'elle représente. Par ailleurs, en raison des contaminations qui ont affecté les cultures au mois d'avril 2003, les données collectées durant ce mois n'ont pas été prises en compte.

Tableau III : Récapitulatif des étapes successives de l'analyse des données climatiques.

Données journalières brutes	Paramètre hebdomadaire dépouillé	Paramètre mensuel calculé et utilisé	Symbole	Transformation utilisée
Température maximale	Température maximale moyenne hebdomadaire	Moyenne mensuelle de la température maximale moyenne hebdomadaire	Tmax	Logarithme décimal $\log(x)$
Température minimale	Température minimale moyenne hebdomadaire	Moyenne mensuelle de la température minimale moyenne hebdomadaire	Tmin	Logarithme décimal $\log(x)$
Température moyenne	Moyenne de la température maximale et minimale hebdomadaire	Moyenne mensuelle de la moyenne de la température maximale et minimale hebdomadaire	Tmoy	Logarithme décimal $\log(x)$
Ecart de température	Moyenne des écarts de la température maximale et minimale hebdomadaire	Moyenne mensuelle de la moyenne des écarts entre la température maximale et minimale hebdomadaire	Etm	Logarithme décimal $\log(x)$
Pluviosité	Total pluviométrique hebdomadaire	Moyenne mensuelle du total pluviométrique hebdomadaire	Pluie	Logarithme décimal $\log(x+1)$
Insolation*	Insolation moyenne hebdomadaire	Moyenne mensuelle de l'insolation moyenne hebdomadaire	Insol	Logarithme décimal $\log(x+1)$
Humidité relative	Humidité relative moyenne hebdomadaire	Moyenne mensuelle de l'humidité relative moyenne hebdomadaire	Hrela	Arc sinus de la racine carrée du pourcentage

Légende :

Insolation* : on la définit ici comme le nombre d'heures par jour pendant lesquelles le soleil a réellement brillé et pour lequel le seuil minimal du rayonnement solaire incident qui rend sensible le diagramme enregistreur de l'héliographe est de 60 Wm^{-2} (6000 lux). Elle dépend de l'état de l'atmosphère, de l'enneigement du lieu et des obstacles physiques existant autour du site de mesure et n'est pas forcément corrélée à la longueur du jour.

2.4.3. Paramètres phénologiques mesurés et notés

Le niveau de fructification a été mesuré alors que le niveau de floraison et le rythme des poussées foliaires sont issus de notations. Ces mesures et notations ont été effectuées le jour du prélèvement hebdomadaire de boutons floraux (Tableau IV). Pour conférer un caractère quantitatif au niveau de floraison et au rythme des poussées foliaires, les observations ont été faites par appréciation visuelle à partir d'une échelle de 5 pourcentages (0 %, 25 %, 50 %, 75 % et 100 %). L'évaluation de ces paramètres a été réalisée selon le degré de couverture du tronc et de rameaux en fleurs et en nouvelles pousses foliaires de chacun des 8 génotypes précités. L'appréciation du niveau de fructification a été faite par dénombrement exhaustif des chérelles, cabosses vertes et mûres présentes sur chaque pied (Annexe II). L'organisation des paramètres phénologiques en classes mensuelles stables a été faite à partir des données transformées.

2.4.4. Variables mesurées pour la culture des tissus

A la fin de chaque cycle de culture de 3 mois, 5 variables ont été mesurées sur chaque génotype (Tableau V) :

- le nombre d'explants callogènes a été désigné Nexcal ;
- le nombre d'explants embryogènes a été abrégé Nexemb ;
- le nombre d'embryons par explant embryogène a été codé Nemb ;
- la moyenne d'embryons par explant embryogène a été désignée Mexemb ;
- le pourcentage d'embryogenèse a été codé Pe.

Tableau IV : Variables mesurées pour l'étude des effets de la phénologie sur l'embryogenèse somatique.

Paramètre phénologique	Transformation utilisée	Symbole de la variable
Rythme des poussées foliaires	Angulaire (arc sinus de la racine carrée)	Rythpf
Niveau de fructification	Racine carrée	Nivfru
Niveau de floraison	Angulaire (arc sinus de la racine carrée)	Nivflo

Tableau V : Variables mesurées pour l'étude des potentiels callogènes et embryogènes des génotypes utilisés.

Variables brutes mesurées	Transformation utilisée	Symbole de la variable
Nombre d'explants callogènes	Racine carrée	Nexcal
Nombre d'explants embryogènes	Racine carrée	Nexemb
Nombre d'embryons par explant embryogène	Racine carrée	Nemb
Moyenne d'embryons par explant embryogène	Racine carrée	Mexemb
Pourcentage d'embryogenèse	Angulaire (arc sinus de la racine carrée)	Pe

2.5. Approche méthodologique ou philosophie

2.5.1. Influence de quelques paramètres climatiques sur l'embryogenèse somatique du cacaoyer

Pour analyser cette influence, une fois par semaine, 3 milieux d'induction de la callogenèse sont ensemencés avec les staminodes et les pétales en co-culture. Les explants callogènes produits sont successivement repiqués sur un milieu de callogenèse secondaire, puis sur celui de développement d'embryons. Au terme de chaque cycle de culture de 3 mois, les variables de callogenèse et d'embryogenèse sont mesurées. Pour analyser statistiquement les résultats obtenus, les 7 paramètres climatiques mesurés sont classifiés au moyen de la comparaison de leurs moyennes annuelles. Les paramètres climatiques les moins variables, d'une année à l'autre, sont éliminés. Parmi les plus variables, les meilleurs sont recherchés grâce à l'Analyse en Composantes Principales. Ces meilleurs paramètres sont organisés en intervalles de temps appelés périodes climatiques stables. Par la suite, la meilleure variable de la culture de tissus est recherchée au moyen de l'Analyse en Composantes Principales. Ceci, pour analyser la relation entre les meilleurs paramètres climatiques et l'embryogenèse somatique et tester leurs corrélations. Dans un premier temps, pour chacune des périodes identifiées, la relation entre chaque paramètre climatique et l'embryogenèse somatique est analysée grâce à la comparaison de leurs moyennes. Pour cela, le sens de variation de chaque paramètre est apprécié relativement à celui de l'embryogenèse somatique. Dans une seconde phase, les corrélations entre les meilleurs paramètres climatiques et l'embryogenèse somatique sont testées grâce au coefficient de détermination R^2 de la régression linéaire multiple.

2.5.2. Influence de quelques paramètres phénologiques sur l'embryogenèse somatique du cacaoyer

Pour apprécier cette influence, les staminodes et les pétales sont cultivés en co-culture, une fois par semaine, sur 3 milieux d'induction de la callogenèse. Les explants callogènes développés sont successivement transférés sur un milieu de callogenèse secondaire, puis sur celui de développement d'embryons. Au terme de chaque cycle de culture de 3 mois, les variables de callogenèse et d'embryogenèse sont mesurées. Pour les analyses statistiques des données collectées, les moyennes annuelles des 3 paramètres phénologiques sont classifiées en les comparant. Ici également, les paramètres les moins variables, d'une année à l'autre, sont éliminés. Les plus variables sont structurés en intervalles de temps appelés classes phénologiques mensuelles

stables. De même, dans une première étape, pour chacune des classes phénologiques identifiées, la relation entre le paramètre phénologique et l'embryogenèse somatique est analysée à partir de la comparaison de leurs moyennes. Dans une seconde phase, les corrélations entre les meilleurs paramètres phénologiques et l'embryogenèse somatique sont testées grâce au coefficient de détermination R^2 de la régression multiple. Les corrélations sont également testées entre d'une part les meilleurs paramètres climatiques et phénologiques et d'autre part l'embryogenèse somatique.

2.5.3. Relation entre le climat et la phénologie

Pour expliquer l'origine de l'influence de la phénologie sur l'embryogenèse somatique, les paramètres climatiques et phénologiques sont structurés en groupes grâce à l'Analyse en Composantes Principales. Par ailleurs, la liaison entre les 3 paramètres phénologiques est également analysée au moyen des corrélations linéaires de Pearson.

2.5.4. Influence de quelques paramètres génétiques sur l'embryogenèse somatique du cacaoyer

Pour évaluer cette influence, les 13 génotypes utilisés sont caractérisés relativement à leurs aptitudes callogènes et embryogènes. Pour cela, les staminodes et les pétales sont cultivés en culture mixte, une fois par semaine, sur 3 milieux d'induction de la callogenèse. Les explants callogènes produits sont successivement repiqués sur un milieu de callogenèse secondaire, puis sur celui de développement d'embryons. A la fin de chaque cycle de culture de 3 mois, les variables de callogenèse et d'embryogenèse sont mesurées. Pour analyser statistiquement les résultats obtenus, d'abord, les descripteurs primaires les plus pertinents sont recherchés par analyse de variance. Ensuite, les descripteurs primaires pertinents identifiés sont utilisés pour caractériser les aptitudes callogènes et embryogènes des hybrides et des clones de géniteurs, grâce à l'analyse séparée des facteurs. Puis, l'effet des variantes de facteurs testés est combiné puis classifié, pour améliorer la caractérisation. Une telle classification permet l'identification des descripteurs secondaires. Enfin, un lien génétique est établi entre les clones parents et les hybrides en comparant leurs aptitudes callogènes et embryogènes. Par la suite, les performances callogènes et embryogènes des hybrides sont évaluées en comparaison de celles des clones de géniteurs ainsi qu'à celle des clones témoins. Par ailleurs, l'effet conjoint entre les staminodes et les pétales cultivés en co-culture est testé par analyse de variance.

2.6. Méthodes d'analyse des données

Certaines variables élémentaires mesurées ont été transformées à l'aide du logiciel Excel (Tableaux IV et V). Les logiciels SPSS version 12.0.1 et Xlstat version 7.5.3 ont été utilisés pour l'ensemble des analyses statistiques. La plupart des tests statistiques a été réalisée au seuil de probabilité de 5 %. Cinq méthodes d'analyse statistique ont été utilisées :

- 1) les statistiques élémentaires ;
- 2) la comparaison de moyennes ;
- 3) la corrélation linéaire de Pearson ;
- 4) l'Analyse en Composantes Principales (ACP) ;
- 5) la régression linéaire multiple.

2.6.1. Statistiques élémentaires

Elles ont permis d'analyser la tendance centrale et la dispersion, à travers la moyenne, l'écart type et le coefficient de variation. L'ébauche de l'organisation en périodes climatiques et classes phénologiques stables a été obtenue par la classification de moyennes. Cette classification a été réalisée dans un premier temps en comparant la moyenne mensuelle à la moyenne annuelle de chaque paramètre. Dans une seconde phase, pour affiner cette classification, le coefficient de variation mensuel de chaque paramètre a été comparé au seuil 20 %. Puis, les ébauches des périodes et classes ainsi obtenues ont été regroupées par des comparaisons progressives de moyennes du paramètre mesuré puis de celles de l'embryogenèse. Ces comparaisons ont abouti à l'identification des périodes et classes stables. Le coefficient de variation a aussi permis l'appréciation de la variabilité de chacun des paramètres climatiques et phénologiques. De même, avant d'analyser la relation entre l'embryogenèse somatique et le climat, la stabilité ($CV < 20 \%$) des réponses à l'embryogenèse a d'abord été testée. Il en a été de même de la relation entre l'embryogenèse et la phénologie (SPSS et Xlstat).

2.6.2. Comparaison de moyennes

Elle a permis la structuration des variantes de facteurs en classes distinctes. Pour cela, 4 méthodes de comparaison de moyennes ont été utilisées en fonction de la nature de la distribution des variables mesurées :

- 1) la comparaison de moyennes incorporées à l'analyse de variance ;
- 2) la comparaison multiple de moyennes ;
- 3) la comparaison de moyennes de facteurs à 2 variantes ;
- 4) la comparaison de moyennes de variantes de la combinaison de facteurs.

2.6.2.1. Comparaison de moyennes incorporée à l'analyse de variance

Elle a été utilisée lorsque la distribution des variables mesurées a été normale et d'égale variance. Elle a permis l'identification des descripteurs primaires les plus pertinents et structurer les variantes des facteurs génotype, explant et milieu chez les hybrides et les géniteurs. Un descripteur est pertinent s'il est indépendant des interactions d'ordre 1, génotype x explant, explant x milieu et génotype x milieu ainsi que de l'interaction d'ordre 2, génotype x explant x milieu. Elle a permis d'analyser l'influence réciproque exercée par les 2 explants cultivés sur le même milieu d'induction. Ceci grâce à l'analyse de l'interaction Disposition x Explant. Toutes les fois qu'un témoin a été associé à une expérimentation, le test de comparaison de moyennes de Dunnett T3 a été utilisé. Dans les autres cas, le test de Student-Newman et Keuls a été utilisé.

2.6.2.2. Comparaison multiple de moyennes

Elle a été utilisée lorsque la distribution des variables mesurées a été normale mais de variance inégale. Ceci pour les facteurs composés d'au moins 3 variantes. Elle a permis de structurer chaque paramètre climatique et phénologique en fonction des mois. Lorsqu'un témoin a été associé aux traitements testés, la structuration des variantes de facteurs a été réalisée à partir du test de Dunnett T3 (SPSS). Dans les autres cas, le test de Student-Newman et Keuls a été utilisé.

2.6.2.3. Comparaison de moyennes de facteurs à 2 variantes

Elle a été envisagée lorsque le facteur analysé n'a été constitué que de 2 variantes. Elle a permis de structurer les variantes de certaines périodes climatiques et classes phénologiques. Pour analyser la relation entre le climat et l'embryogenèse somatique, leur sens de variation a été comparé à partir de leurs moyennes. Il en a été de même entre la phénologie et l'embryogenèse somatique. La structuration des variations de l'année pour chacun des paramètres climatiques et phénologiques a été faite par cette méthode. Il en a été de même de la variation

des variables de la culture des tissus et des variantes des effets de l'explant et du milieu d'induction. La méthode des contrastes utilisant le test de Student-Newman et Keuls a permis cette structuration (SPSS et Xlstat).

2.6.2.4. Comparaison de moyennes de variantes de la combinaison de facteurs

Elle a été utilisée pour la caractérisation du potentiel embryogène des génotypes par analyse combinée des facteurs génotype et explant puis génotype et milieu d'induction. De telles structurations ont permis d'identifier 2 descripteurs secondaires que sont les explants et les milieux PCG favorables. Par contre, les aptitudes générales ont été utilisées comme premier descripteur secondaire de la caractérisation. La dénomination descripteurs primaires et secondaires est arbitraire. Elle a été utilisée seulement pour distinguer les 2 catégories de descripteurs. Les aptitudes générales procèdent des performances moyennes callogènes et embryogènes des génotypes. A ces performances a été associée la stabilité ($CV < 20 \%$) avec laquelle les cals et les embryons se sont développés sur les explants. Les explants favorables ont été identifiés grâce à la comparaison des moyennes des variantes de la combinaison de facteurs génotype et explant. Les milieux PCG favorables ont été identifiés également grâce à la comparaison des moyennes des variantes de la combinaison de facteurs génotype et milieu d'induction. Cette méthode de comparaison a permis également de structurer les variantes de la combinaison de facteurs explant et disposition. Pour cela, le test de Student- Newmann et Keuls a été utilisé (Xlstat).

2.6.3. Corrélation linéaire de Pearson

Pour analyser la relation entre 2 paramètres ou variables, le coefficient de corrélation linéaire bivarié de Pearson a été calculé au seuil 5 %. Il a été ainsi des relations entre les 3 paramètres phénologiques utilisés dans l'étude.

2.6.4. Analyse en Composantes Principales (ACP)

Elle a permis de structurer les paramètres climatiques et phénologiques. Ainsi, grâce à elle, les meilleurs paramètres de la variation climatique ont été identifiés. Pour bien décrire les corrélations entre d'une part le climat et la phénologie, et d'autre part l'embryogenèse somatique, la meilleure variable d'embryogenèse sur les 2 premières Composantes Principales a été

identifiée par cette méthode. De la même manière, elle a permis d'établir la relation entre le climat et la phénologie (SPSS et Xlstat).

2.6.5. Régression linéaire multiple

2.6.5.1. Identification des modèles linéaires de chacune des années d'étude

Elle a été utilisée pour quantifier l'intensité du lien entre d'une part le climat et la phénologie, et d'autre part l'embryogenèse somatique. Ceci grâce au coefficient de détermination de la régression multiple R^2 . Ce coefficient contient une part importante de l'information relative à la régression (Baradat, 1982). Les prédicteurs ont été choisis au moyen de la méthode ascendante. Cette régression a permis la modélisation des fluctuations d'embryogenèse en fonction des paramètres climatiques et phénologiques (Xlstat).

2.6.5.2. Pertinence et suffisance des conclusions tirées à partir des données collectées sur 2 années d'étude

Pour savoir si les conclusions tirées à partir des données collectées sur 2 années sont pertinentes et suffisantes, les coefficients R^2 ont été comparés. Pour cela, la régression de la meilleure variable d'embryogenèse sur la période favorable du / des paramètres climatiques et / ou phénologique a été réalisée. Ceci, aussi bien à partir d'une matrice de données équilibrées qu'avec une matrice de données filtrées. Nous entendons par matrice de données équilibrées, une matrice constituée à la fois des observations favorables et non favorables. Une matrice filtrée est composée uniquement des observations favorables.

SECTION 3

RESULTATS

**1. INFLUENCE DE QUELQUES PARAMETRES
CLIMATIQUES SUR L'EMBRYOGENESE
SOMATIQUE DU CACAOYER**

1.1. Variations annuelles des paramètres climatiques mesurés

Pour tester l'influence de l'année, les variations des 7 paramètres climatiques utilisés ont été analysées sur les 2 années d'étude (Tableau VI). Il est ressorti des résultats que la pluviosité, la température maximale, la température minimale, la température moyenne, les écarts de température et l'insolation enregistrent des variations significatives, alors que l'humidité relative ne varie pas, d'une année à l'autre. En raison de l'absence de variation de cette dernière, elle a été éliminée dans la suite de l'étude. Toutefois, pour les 6 premiers paramètres ci-dessus cités, les analyses ultérieures ont été faites année par année. Par ailleurs, la dispersion autour de chacune des moyennes des paramètres mesurés a oscillé de 0 à 1,81 %.

1.2. Meilleurs paramètres de la variation climatique

Pour identifier les meilleurs paramètres de la variation climatique, l'Analyse en Composantes Principales a été appliquée aux 6 paramètres précédents ayant enregistré chacun des variations significatives d'une année à l'autre (Tableaux VII et VIII, figures 6 et 7). Les résultats ont montré que, quelle que soit l'année, les 4 axes factoriels choisis expliquent 100 % de la variation totale. La première année, l'axe F1 explique 38,48 % de la variation, contre 42,20 % la seconde année. D'une année à la suivante, l'axe 1 décrit l'amplitude thermique et, est très bien représenté par les écarts de température et la température minimale. Ces 2 paramètres ne décrivent pas les mêmes phénomènes (Tableau VIII). De fait, ils ne sont pas significativement corrélés. La première année, l'axe F2 exprime 26,17 % de la variation, alors que la seconde année celui-ci explique 24 % de la variation résiduelle non prise en compte par l'axe F1. Quelle que soit l'année, l'axe F2 illustre l'optimum thermique. La température maximale et la température moyenne y sont très bien représentées. Ici, les 2 paramètres décrivent des phénomènes similaires (Tableau VIII). Ils sont significativement corrélés. La première année, l'axe F3 montre 16,95 % de la variation, tandis que la seconde année celui-ci exprime 16,87 % de la variation résiduelle non expliquée par l'axe F2. Au cours de chacune des années d'étude, l'axe F3 décrit les précipitations. D'une année à l'autre, la pluviosité y est saillante. De même, la première année, l'axe F4 explique 18,40 % de la variation

résiduelle non prise en compte par l'axe F4, contre 16,93 % la seconde année. D'une année à l'autre, l'axe F4 dépeint l'éclairement. L'insolation y est proéminente.

Sur la base de leur qualité de représentation sur les 4 axes factoriels et de leur valeur de corrélation, la température minimale, les écarts de température, la température maximale, la pluviosité et l'insolation ont été identifiées comme meilleurs paramètres de la variation climatique sur lesquels la suite de l'étude a porté.

Tableau VI : Classification des moyennes de chacun des paramètres climatiques en fonction de l'année.

Variable dépendante*	Année	Moyenne transformée*	CV (%)	Moyenne non transformée*
Pluie*	Année 1	0,829 a	1,81	5,745 mm
	Année 2	0,987 b	1,42	8,705 mm
Tmax*	Année 1	1,488 a	0,00	30,761 °C
	Année 2	1,481 b	0,00	30,269 °C
Tmin*	Année 1	1,319 a	0,08	20,845 °C
	Année 2	1,277 b	0,08	18,923 °C
Tmoy*	Année 1	1,412 a	0,07	25,823 °C
	Année 2	1,392 b	0,07	24,660 °C
Etm*	Année 1	0,972 a	0,31	9,376 °C
	Année 2	1,027 b	0,29	10,641 °C
Insol*	Année 1	0,794 a	0,50	5,223 H/J
	Année 2	0,705 b	0,57	4,070 H/J
Hrela*	Année 1	1,135 a	0,09	82,180 %
	Année 2	1,135 b	0,09	82,180 %

Légende :

Variable dépendante* : **Pluie*** : Moyenne annuelle du total pluviométrique hebdomadaire. **Tmax*** : Moyenne annuelle de la température maximale moyenne hebdomadaire. **Tmin*** : Moyenne annuelle de la température minimale moyenne hebdomadaire. **Tmoy*** : Moyenne annuelle entre la température maximale et la température minimale moyennes hebdomadaires. **Etm*** : Moyenne annuelle de la moyenne des écarts entre les températures maximale et minimale moyenne hebdomadaire. **Insol** : Moyenne annuelle de l'insolation moyenne hebdomadaire. **Hrela*** : Moyenne annuelle de l'humidité relative moyenne hebdomadaire. **Moyenne transformée*** : La moyenne de chaque paramètre mesuré a été obtenue en utilisant la fonction rapportée dans la partie matériel et méthodes (Tableau III). **Moyenne non transformée*** : Les valeurs ont été rangées par ordre croissant. Chaque moyenne non transformée a été obtenue en appliquant la fonction réciproque de celle utilisée pour sa transformation.

Tableau VII : Relationship entre les 6 paramètres climatiques et les 4 axes factoriels à travers leur cosinus carré durant les 2 années d'étude

Année	Paramètres climatiques	Axes factoriels*			
		F1	F2	F3	F4
Année 1	Pluie	0,002	0,001	0,983	0,015
	Tmax	0,005	0,853	0,001	0,140
	Tmin	0,983	0,003	0,001	0,013
	Tmoy	0,629	0,319	0,000	0,015
	Etm	0,630	0,263	0,002	0,105
	Insol	0,023	0,131	0,030	0,817
Année 2	Pluie	0,014	0,000	0,984	0,001
	Tmax	0,000	0,911	0,000	0,088
	Tmin	0,894	0,048	0,009	0,049
	Tmoy	0,612	0,295	0,007	0,087
	Etm	0,930	0,053	0,009	0,007
	Insol	0,081	0,133	0,003	0,783

Légende :

Axes factoriels* : Composantes principales obtenues par combinaison linéaire des variables initiales représentées par les 6 paramètres climatiques. **F1*** : Première composante principale non corrélée avec l'axe F2. **F2*** : Deuxième composante principale non corrélée avec l'axe F3. **F3*** : Troisième composante principale non corrélée avec l'axe F4. **F4*** : Quatrième composante non corrélée avec les trois axes précédents. **En gras** : Valeur des corrélations les plus fortes entre les Composantes Principales et les variables les mieux représentées.

Tableau VIII : Relations entre les 6 paramètres climatiques au moyen des corrélations de Pearson au cours des 2 années d'étude

Année	Paramètres climatiques	Pluie	Tmax	Tmin	Tmoy	Etm	Insol
Année 1	Pluie	1	0,008	-0,056	-0,040	0,052	-0,266
	Tmax	0,008	1	0,083	0,627	0,538	0,655
	Tmin	-0,056	0,083	1	0,828	-0,795	-0,226
	Tmoy	-0,040	0,627	0,828	1	-0,319	0,192
	Etm	0,052	0,538	-0,795	-0,319	1	0,590
	Insol	-0,266	0,655	-0,226	0,192	0,590	1
Année 2	Pluie	1	0,008	0,204	0,170	-0,206	-0,048
	Tmax	0,008	1	0,289	0,618	0,180	0,615
	Tmin	0,204	0,289	1	0,931	-0,890	0,539
	Tmoy	0,170	0,618	0,931	1	-0,662	0,677
	Etm	-0,206	0,180	-0,890	-0,662	1	-0,261
	Insol	-0,048	0,615	0,539	0,677	-0,261	1

Légende :

En gras : Valeurs significatives des corrélations selon le test de Pearson au seuil de risque 5 %.

Figure 6: Qualité de la représentation des 6 paramètres climatiques sur le plan 1-2 du cercle de corrélation de l'Analyse en Composantes Principales au cours de la première année d'étude

Figure 7: Qualité de la représentation des 6 paramètres climatiques sur le plan 1-2 du cercle de corrélation de l'Analyse en Composantes Principales au cours de la seconde année d'étude

1.3. Structuration des meilleurs paramètres climatiques en fonction des mois

Pour identifier les intervalles de temps susceptibles de servir de base au testage de corrélations entre l'embryogenèse somatique et le climat, les paramètres climatiques précédemment identifiés ont été structurés selon les mois (Tableau IX). Ainsi, pour la pluviosité, quelle que soit l'année d'expérimentation considérée, 7 groupes homogènes ont été enregistrés, avec néanmoins une différence dans leur composition. Lorsqu'on examine la température maximale, on note que la première année a généré 8 groupes homogènes, contre 9 la seconde année. Pour la température minimale, la première année d'étude, 7 groupes homogènes ont été observés, tandis que la deuxième année 8 en ont été enregistrés. En examinant les écarts de température, 6 groupes ont été identifiés la première année, contre 9 la seconde année. Pour l'insolation, on s'aperçoit que la première année 7 groupes homogènes ont été enregistrés, tandis que la seconde année d'expérimentation 8 en ont été observés. Le nombre relativement élevé de ces groupes et l'absence de concordance dans leur composition n'ont pas permis de les assimiler à des périodes climatiques stables.

Tableau IX : Classification de moyennes des paramètres climatiques représentatifs en fonction des mois.

Moyenne *										
Année 1						Année 2				
Mois*	Pluie* (mm)	Tmax* (°C)	Tmin* (°C)	Etm* (°C)	Insol* (H/J)	Pluie (mm)	Tmax (°C)	Tmin (°C)	Etm (°C)	Insol (H/J)
Septembre	0,828 c	1,455 b	1,297 c	0,871 b	0,680 c	1,183 d	1,465 c	1,314 g	0,900 d	0,576 c
Octobre	1,649 g	1,473 c	1,269 a	1,046 f	0,846 e	1,650 g	1,477 d	1,378 h	0,783 a	0,800 gh
Novembre	1,323 e	1,495 e	1,288 b	1,075 g	0,912 f	1,548 f	1,485 e	1,374 h	0,838 b	0,938 j
Décembre	0,795 c	1,494 e	1,284 b	1,078 g	0,826 e	0,160 a	1,495 h	1,377 h	0,873 c	0,859 i
Janvier	0,000 a	1,497 f	1,287 b	1,079 e	0,838 e	0,432 b	1,487 f	1,255 e	1,104 f	0,818 h
Février	0,799 c	1,503 g	1,336 e	1,008 e	0,948 g	0,518 b	1,493 g	1,253 e	1,121 g	0,725 f
Mars	0,665 b	1,515 h	1,358 f	0,999 de	0,906 f	1,089 d	1,500 i	1,268 f	1,115 g	0,664 e
Avril	-	-	-	-	-	1,169 d	1,499 i	1,252 e	1,134 h	0,791 g
Mai	1,208 d	1,504 g	1,359 f	0,958 c	0,908 f	1,311 e	1,499 i	1,243 d	1,148 i	0,862 i
Juin	1,443 f	1,498 f	1,340 e	0,984 d	0,627 b	1,443 f	1,477 d	1,229 c	1,116 g	0,419 b
Juillet	0,081 a	1,488 d	1,321 d	0,989 d	0,784 d	0,484 b	1,459 d	1,209 b	1,100 f	0,643 d
Août	0,578 b	1,450 a	1,383 g	0,595 a	0,462 a	0,858 c	1,433 a	1,186 a	1,071 e	0,313 a

Légende

Moyennes* : Les moyennes suivies de la même lettre dans une colonne sont statistiquement identiques au seuil de risque 5 % selon le test de Student-Newman et Keuls. **Mois *** : Septembre est le mois qui a marqué le début de nos travaux. Au cours de la première année d'étude, ces travaux se sont étendus de septembre 2002 à août 2003. Donc, cette première année d'étude a été à cheval sur deux années calendaires régulières. C'est la raison pour laquelle le mois de septembre a été considéré comme le point de départ de la structuration. **Pluie*** : Moyenne mensuelle du total pluviométrique hebdomadaire. **Tmax*** : Moyenne mensuelle de la température maximale moyenne hebdomadaire. **Tmin*** : Moyenne mensuelle de la température minimale moyenne hebdomadaire. **Etm*** : Moyenne mensuelle de la moyenne des écarts entre la température maximale et minimale moyennes hebdomadaires. **Insol** : Moyenne mensuelle de l'insolation moyenne hebdomadaire.

1.4. Organisation des paramètres en périodes climatiques stables

Parmi les 3 méthodes de comparaison utilisées pour organiser chaque paramètre climatique en périodes, aucune d'elles prise individuellement n'a donné satisfaction. Il s'agit de la comparaison multiple de moyennes, la comparaison de chaque moyenne mensuelle à la moyenne annuelle, la comparaison du coefficient de variation mensuel au seuil 20 %. En effet, les périodes obtenues ont été soit pléthoriques soit inexistantes. Une telle organisation en périodes est incompatible avec les objectifs de l'étude. Pour y remédier, la comparaison de moyennes mensuelles à la moyenne annuelle a été combinée à la comparaison du coefficient de variation mensuel au seuil 20 % pour chaque paramètre. Ainsi, 2 classes ont été identifiées en comparant la moyenne mensuelle à la moyenne annuelle. La classe de mois qui a enregistré une moyenne inférieure à la moyenne annuelle a été séparée de celle regroupant les mois dont la moyenne mensuelle a été supérieure à la moyenne annuelle. A l'intérieur de chaque classe, des sous groupes ont été identifiés relativement à leur coefficient de variation. Ainsi, les mois au cours desquels la valeur du paramètre mesuré est restée stable ($CV < 20 \%$) ont été séparés des mois qui ont enregistré des fortes fluctuations ($CV > 20 \%$). Cependant, ces structurations n'ont pas donné pleinement satisfaction. Elles ont constitué néanmoins des ébauches de périodes qui, par regroupement progressif, ont généré des intervalles de temps stables et distincts.

1.4.1. Périodes stables de pluviosité

D'une année à la suivante, 2 périodes différentes d'inégale longueur ont été observées. La première année, la période de basse pluviosité (P_1), incluant les mois de septembre, décembre 2002, janvier, février, mars, juillet et août 2003, s'est distinguée par une pluviosité moyenne stable de 2,199 mm ($CV = 3,17 \%$). La période de haute pluviosité P_2 , comprenant les mois d'octobre, novembre 2002, mai et juin 2003, s'est singularisée par une pluviosité moyenne de 25,303 mm ($CV = 1,55 \%$). La seconde année, la période de faible pluviosité (P_1), comprenant les mois de janvier, février, juillet, août et décembre, a été caractérisée par une pluviosité moyenne de 2,097 mm ($CV = 3,46 \%$). A l'opposé, la période de forte pluviosité (P_2), constituée des mois de mars, avril, mai, juin, septembre, octobre et novembre a été déterminée par une pluviosité moyenne de 21,029 mm ($CV = 1,12 \%$).

1.4.2. Périodes stables de température maximale

Deux périodes différentes ont été identifiées, d'une année à l'autre, avec néanmoins un décalage dans leur composition. En effet, la première année, la période de faible température maximale (T_{m1}), composée des mois de septembre, octobre 2002, juillet et août 2003, a été marquée par une moyenne relativement basse et stable de $29,376\text{ °C}$ ($CV = 0,00\%$). La période de forte température maximale moyenne (T_{m2}), constituée de mois allant de novembre 2002 à juin 2003, a été relativement chaude avec une température maximale moyenne de $31,696\text{ °C}$ ($CV = 0,00\%$). La seconde année d'étude, la période de basse température maximale moyenne (T_{m1}), constituée des mois allant de janvier à octobre, a été marquée par température maximale moyenne de $30,130\text{ °C}$ ($CV = 0,00\%$). Toutefois, la période de haute température maximale (T_{m2}), comprenant les mois de décembre et novembre, a été déterminée par une température maximale moyenne de $30,903\text{ °C}$ ($CV = 0,07\%$).

1.4.3. Périodes stables de température minimale

Ici, la première année a engendré 2 périodes distinctes. La seconde année n'a pas varié significativement d'un mois à l'autre. La première année, la période de basse température minimale (T_{n1}), couvrant les mois de septembre, octobre, novembre, décembre 2002 et janvier 2003, a été traduite par une température minimale moyenne de $19,265\text{ °C}$ ($CV = 0,08\%$). La période de haute température minimale (T_{n2}), constituée des mois s'étalant de mars à août 2003, a été marquée par une température minimale moyenne de $22,336\text{ °C}$ ($CV = 0,23\%$). La seconde année, la période unitaire de 12 mois a exprimé une température minimale moyenne de $18,923\text{ °C}$ ($CV = 0,08\%$).

1.4.4. Périodes stables d'écart de température

La première année d'étude a généré 2 périodes distinctes, alors que la seconde n'en a généré qu'une seule. Ainsi, la première année, la période de faibles écarts de température (E_1), incluant les mois de septembre 2002, mai et août 2003, a été caractérisée par des écarts moyens de température $6,310\text{ °C}$ ($CV = 0,63\%$). La période de forts écarts de température (E_2), couvrant les mois d'octobre 2002 à juillet 2003, a été marquée par des écarts moyens de température de $10,765\text{ °C}$ ($CV = 0,29\%$). La seconde année, la seule période de 12 mois a enregistré des écarts moyens de température de $10,641\text{ °C}$ ($CV = 0,29\%$).

1.4.5. Périodes stables d'insolation

Quelle que soit l'année, 2 périodes distinctes ont été identifiées. Pour la première année d'étude, la première période de faible insolation (I_1), couvrant les mois d'octobre à mai, a été marquée par une insolation moyenne de 3,395 H/J (CV = 0,01 %). La seconde période de forte insolation (I_2), s'étalant du mois de juin à celui de septembre, a été caractérisée par une insolation moyenne de 6,603 H/J (CV = 0,00 %). Cependant, pour la seconde année d'expérimentation, un décalage très important a été constaté relativement à leur composition en mois. En effet, la période de basse insolation (I_1), a couvert les mois de janvier, février, juin, juillet, août, septembre, octobre, novembre et décembre. Elle s'est traduite par une insolation moyenne de 3,797 H/J (CV = 0,27 %). Par contre la période de haute insolation (I_2), incluant les mois de mars à mai, a été caractérisée par une insolation moyenne de 4,929 H/J (CV = 0,62 %).

1.5. Meilleure variable de la culture des tissus

Pour déterminer la meilleure variable de la culture des tissus susceptible de bien décrire les corrélations entre les périodes climatiques identifiées et l'embryogenèse somatique, les 5 variables de culture de tissus mesurées ont été soumises à l'Analyse en Composantes Principales (Tableaux X et XI, Figures 8 et 9). Les résultats ont montré que la première année, le plan 1-2 explique 89,08 % de la variation totale, contre 92,44 % la seconde année. La première année, la Composante F1 explique 68,54 % de la variation, alors que la seconde année, elle en exprime 72,17 %. Quelle que soit l'année, la Composante F1 décrit le taux d'embryogenèse somatique. Le pourcentage d'embryogenèse et le nombre d'explants embryogènes y sont très bien représentés. En plus, ces 2 variables ont un comportement similaire (r / Année 1 / Pe-Nexemb = +0,982* ; r / Année 2 / Pe-Nexemb = +0,978*). La première année d'expérimentation, la Composante F2 montre 20,54 % de la variation, tandis que la seconde année, elle n'en explique que 20,27 %. D'une année à l'autre, elle représente la callogenèse. Seule le nombre d'explants callogènes y est saillant.

Sur la base de leur représentativité sur les Composantes Principales 1 et 2 et de leur valeur de corrélation, le pourcentage d'embryogenèse somatique a été choisi comme la meilleure variable pouvant bien décrire les corrélations entre l'embryogenèse somatique et le climat.

Tableau X : Relation entre les Composantes Principales et les variables de culture des tissus durant les 2 années d'étude.

Année	Variables de culture des tissus*	Composantes principales				
		F1	F2	F3	F4	F5
Année 1	Nexcal	0,008	0,990	0,001	0,000	0,000
	Nexemb	0,960	0,013	0,017	0,000	0,009
	Nemb	0,822	0,006	0,066	0,105	0,000
	Mexemb	0,667	0,010	0,320	0,003	0,000
	Pe	0,969	0,008	0,013	0,001	0,009
Année 2	Nexcal	0,004	0,996	0,000	0,000	0,000
	Nexemb	0,977	0,008	0,003	0,002	0,010
	Nemb	0,896	0,004	0,032	0,067	0,000
	Mexemb	0,752	0,004	0,243	0,001	0,000
	Pe	0,979	0,001	0,003	0,006	0,010

Legende :

En gras : Valeur des corrélations les plus fortes entre les Composantes Principales et les variables les mieux représentées. **Variables de culture des tissus* :** **Nexcal :** Nombre d'explants callogènes. **Nexemb :** Nombre d'explants embryogènes. **Nemb :** Nombre d'embryons par explant embryogène. **Mexemb :** Moyenne d'embryons par explant embryogène. **Pe :** pourcentage d'embryogénèse

Tableau XI : Relation entre les variables de culture de tissus au cours des 2 années d'expérimentation.

Année	Variables de culture des tissus*	Nexcal	Nexemb	Nemb	Mexemb	Pe
Année 1	Nexcal	1	0,207	0,175	0,193	0,183
	Nexemb	0,207	1	0,924	0,884	0,982
	Nemb	0,175	0,924	1	0,912	0,920
	Mexemb	0,193	0,884	0,912	1	0,877
	Pe	0,183	0,982	0,920	0,877	1
Année 2	Nexcal	1	0,150	0,127	0,124	0,098
	Nexemb	0,150	1	0,940	0,887	0,978
	Nemb	0,127	0,940	1	0,922	0,930
	Mexemb	0,124	0,887	0,922	1	0,886
	Pe	0,098	0,978	0,930	0,886	1

Légende :

En gras : Valeurs significatives des corrélations selon le test de Pearson au seuil de probabilité 5 %.

Figure 8: Représentativité des 5 variables de culture des tissus sur le plan 1-2 du cercle de corrélation de l'Analyse en Composantes Principales au cours de la première année d'étude

Figure 9: Représentativité des 5 variables de culture des tissus sur le plan 1-2 du cercle de corrélation de l'Analyse en Composantes Principales au cours de la seconde année d'étude

1.6. Relation entre les périodes climatiques et l'embryogenèse somatique

1.6.1. Relation entre les périodes de pluviosité et l'embryogenèse somatique

Le pourcentage d'embryogenèse a été variable d'une période à l'autre, quelle que soit l'année (Tableau XII). A l'intérieur de chaque période, l'embryogenèse a été stable ($CV < 20\%$). Le sens de variation des périodes de pluviosité relativement à celui de l'embryogenèse somatique a exprimé 2 tendances diamétralement opposées. De fait, la première année d'expérimentation, la période de faible pluviosité P_1 a été en relation avec une forte embryogenèse, alors que la période de haute pluviosité P_2 a été en rapport avec une basse embryogenèse somatique. Toutefois, la seconde année d'étude, la période de faible pluviosité P_1 a correspondu à une faible embryogenèse. De même, la période de haute pluviosité a été associée à une haute embryogenèse somatique. Cette relation a été représentée pour les 6 hybrides et les 2 clones témoins (Figure 10).

1.6.2. Relation entre les périodes de température maximale et l'embryogenèse somatique

L'embryogenèse a été différente d'une période à l'autre, quelle que soit l'année (Tableau XIII). A l'intérieur de chaque période, elle a été stable ($CV < 20\%$). Quelle que soit l'année d'expérimentation, le sens de variation des périodes de température maximale a été l'inverse de celui de l'embryogenèse somatique. En effet, la période Tm_1 de basse température maximale a été en liaison avec une haute embryogenèse somatique, tandis que la période Tm_2 de haute température maximale a été en rapport avec une basse embryogenèse somatique. La correspondance entre le sens de variation de l'embryogenèse somatique et les périodes de température maximale a été illustrée pour les 6 hybrides et les 2 clones témoins (Figure 11).

1.6.3. Relation entre les périodes de température minimale et l'embryogenèse somatique

Seule la première année d'expérimentation a enregistré une variation statistiquement différente de l'embryogenèse somatique entre les 2 périodes de température minimale identifiées (Tableau XIV). A l'intérieur de chaque période, elle a été stable ($CV < 20\%$). Au cours de cette année, le sens de variation de l'embryogenèse somatique a été comparable à celui des périodes de température minimale. En effet, la période Tn_1 de faible température minimale a été en relation avec une faible embryogenèse somatique, alors que la période Tn_2 de forte température minimale a été associée à une forte

embryogénèse somatique. La relation entre les 2 phénomènes étudiés a été représentée pour les 6 hybrides et les 2 clones témoins (Figure 12).

Tableau XII : Classification des moyennes du pourcentage d'embryogénèse en fonction des périodes de pluviosité.

Année	Période de Pluviosité*	Moyenne transformée*	CV (%)*	Moyenne non transformée (%) *
Année 1	P ₁	0,123 a	6,50	1,505
	P ₂	0,066 b	16,67	0,435
Année 2	P ₁	0,225 a	6,67	4,978
	P ₂	0,293 b	4,44	8,342

Légende :

Période de pluviosité* : P₁ : Période de faible pluviosité. P₂ : Période de forte pluviosité. **Moyenne transformée :** Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Student-Newman et Keuls au seuil de risque 5 %. **CV (%)* :** Coefficient de variation en pourcentage. **Moyenne non transformée (%) * :** Les valeurs ont été obtenues en utilisant la fonction réciproque de celle utilisée pour leur transformation.

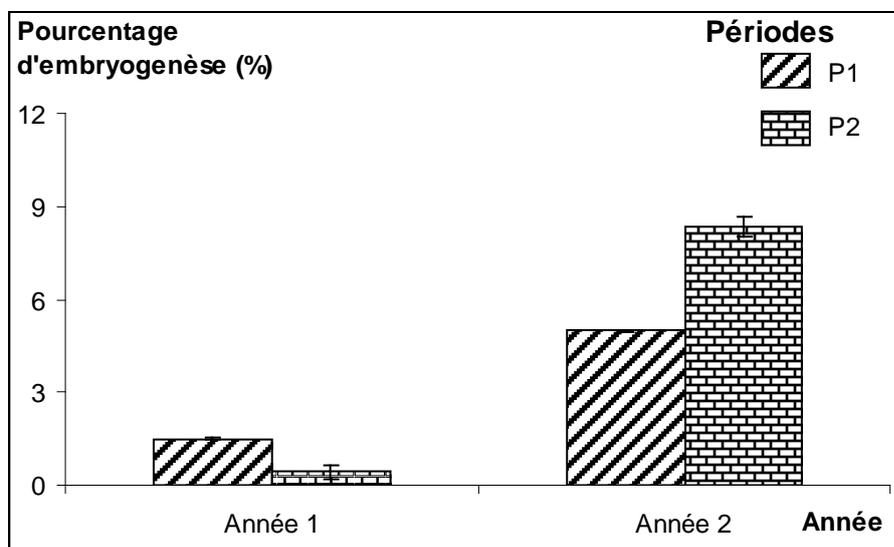


Figure 10 : Pourcentage d'embryogénèse associé à chacune des périodes de pluviosité durant les 2 années d'étude.

Légende :

P₁ : Période de faible pluviosité. P₂ : Période de forte pluviosité.

Tableau XIII : Classification des moyennes du pourcentage d'embryogenèse en fonction des périodes de température maximale.

Année	Périodes de température maximale*	Moyenne transformée*	CV (%)	Moyenne non transformée (%)
Année 1	Tm ₁	0,133 a	7,52	1,76
	Tm ₂	0,084 b	9,52	0,70
Année 2	Tm ₁	0,277 a	3,97	7,48
	Tm ₂	0,194 b	13,40	3,72

Légende :

Périodes de température maximale*: Tm₁ : Période de basse température maximale. Tm₂ : Période de haute température maximale. **Moyenne transformée*:** Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas statistiquement différentes selon le test de Student-Newman et Keuls au seuil de risque 5 %.

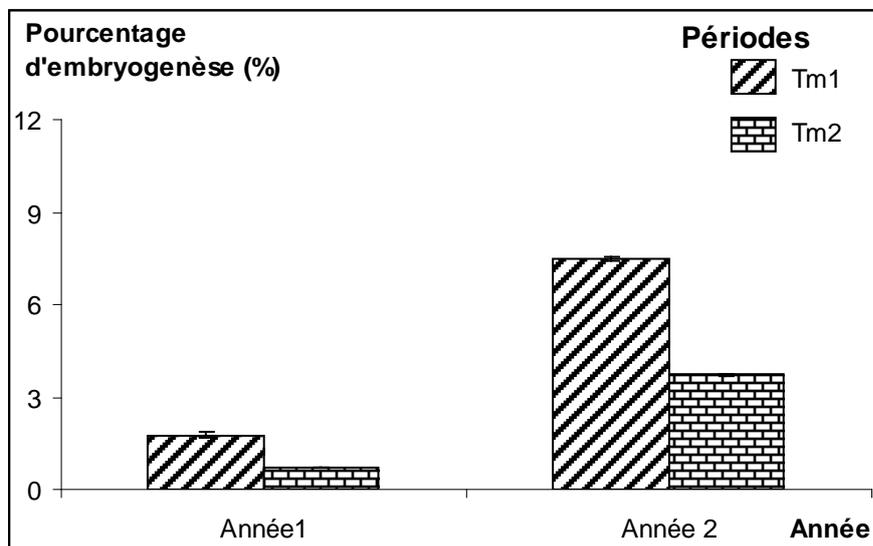


Figure 11 : Pourcentage d'embryogenèse relatif à chacune des périodes de température maximale sur les 2 années d'étude.

Légende :

Tm₁ : Période de basse température maximale. **Tm₂ :** Période de haute température maximale.

Tableau XIV : Classification des moyennes du pourcentage d'embryogenèse en fonction des périodes de température minimale.

Année	Périodes de température minimale*	Moyenne transformée*	CV (%)	Moyenne non transformée (%)
Année 1	Tn ₁	0,083 a	10,84	0,69
	Tn ₂	0,119 b	7,56	1,41
Année 2	Tn	0,265	3,77	6,86

Légende :

Périodes de température minimale*: Tn₁ : Période de basse température minimale. Tn₂ : Période de haute température minimale. Tn : Période unitaire annuelle de température minimale **Moyenne transformée*** : Les valeurs suivies de lettres différentes sont statistiquement différentes d'après le test de Student-Newman et Keuls au seuil de confiance 95 %.

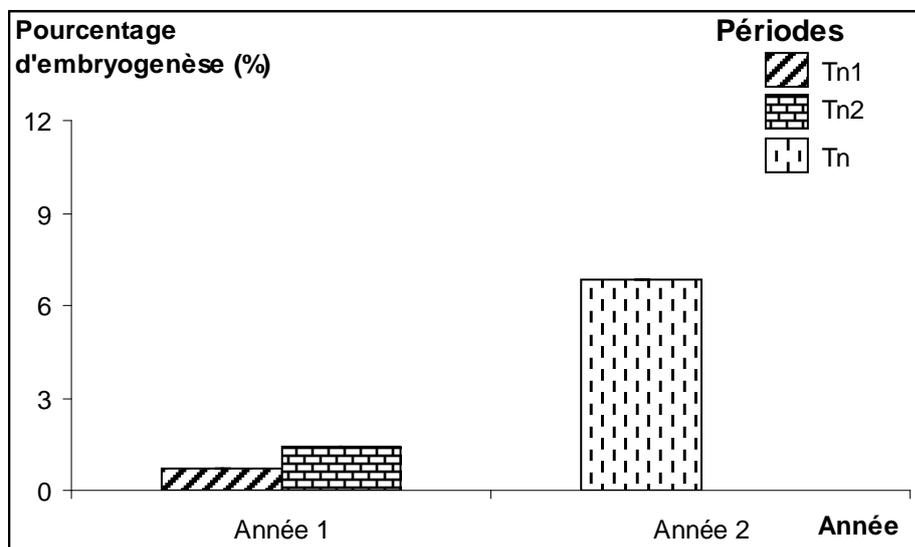


Figure 12 : Pourcentage d'embryogenèse relatif à chacune des périodes de température maximale sur les 2 années d'étude.

Légende

Tn₁ : Période de faible température minimale. Tn₂ : Période de forte température minimale. Tn : Période unitaire annuelle de température minimale.

1.6.4. Relation entre les périodes d'écart de température et l'embryogenèse somatique

Ici également, seule la première année d'expérimentation a enregistré une variation significative de l'embryogenèse somatique entre les 2 périodes d'écart de température observées. Le pourcentage d'embryogenèse a été variable d'une période à l'autre (Tableau XV). A l'intérieur de chaque période, elle a été stable ($CV < 20 \%$). Le sens de variation de l'embryogenèse somatique y a été opposé à celui des périodes d'écart de température. De fait, la période E_1 de bas écarts de température a été en liaison avec une haute embryogenèse somatique. A l'inverse, la période E_2 de hauts écarts de température a correspondu à une basse embryogenèse somatique. La liaison entre les deux phénomènes étudiés a été illustrée pour les 6 hybrides et les 2 clones témoins (Figure 13).

1.6.5. Relation entre les périodes d'insolation et l'embryogenèse somatique

La liaison entre les 2 phénomènes étudiés a été révélée par un sens de variation opposé (Tableau XVI). De fait, la première année d'expérimentation, la période de faible insolation I_1 a été en relation avec une forte embryogenèse, tandis que la période de forte insolation I_2 a été en rapport avec une faible embryogenèse somatique. Cependant, la seconde année d'étude, la période de basse insolation I_1 a été en rapport avec une basse embryogenèse, alors que la période de haute insolation I_2 a été associée à une haute embryogenèse somatique. Cette liaison a été illustrée pour les 6 hybrides et les 2 clones témoins (Figure 14).

En somme, quelle que soit la période climatique considérée, l'embryogenèse somatique a été stable ($CV < 20 \%$). Seule la température maximale a enregistré un sens de variation similaire, d'une année à l'autre, relativement à celui de l'embryogenèse somatique.

Tableau XV : Classification des moyennes du pourcentage d'embryogenèse en fonction des périodes d'écart de température.

Année	Périodes de température minimale*	Moyenne transformée*	CV (%)	Moyenne non transformée (%)
Année 1	E1	0,129 a	10,08	1,66
	E2	0,093 b	7,53	0,87
Année 2	E	0,265	3,77	6,86

Légende :

Périodes d'écart de température *: E₁ : Période de bas écarts de température. E₂ : Période de hauts écarts de température. E : Période unitaire annuelle d'écarts de température. **Moyenne transformée* :** Les valeurs suivies de lettres différentes sont statistiquement différentes d'après le test de Student-Newman et Keuls au seuil de confiance 95 %.

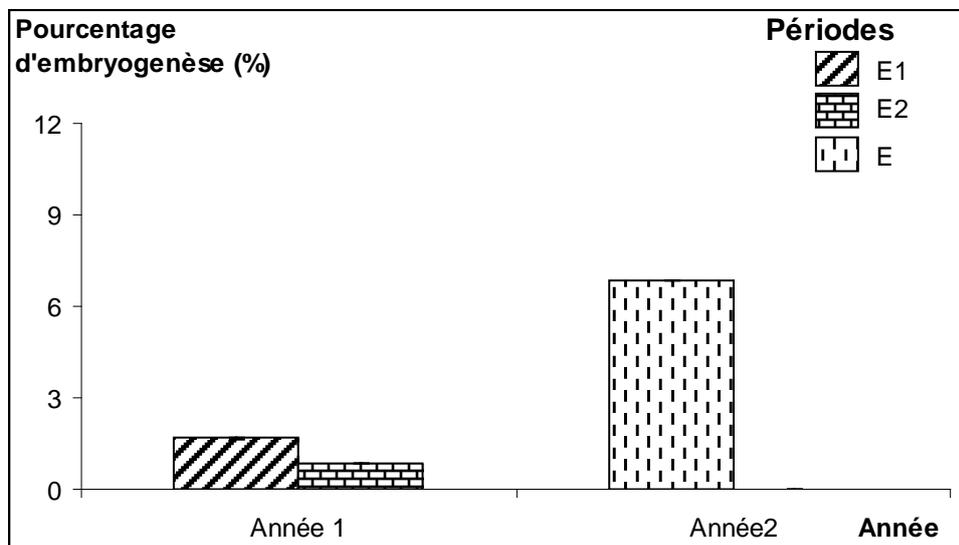


Figure 13 : Pourcentage d'embryogenèse de chacune des périodes d'écarts de température durant les 2 années d'étude.

Légende

E₁ : Période de bas écarts de température. E₂ : Période de hauts écarts de température. E : Période unitaire annuelle d'écarts de température.

Tableau XVI : Classification des moyennes du pourcentage d'embryogenèse en fonction des périodes d'insolation.

Année	Périodes de température maximale*	Moyenne transformée*	CV (%)	Moyenne non transformée (%)
Année 1	I ₁	0,127 a	8,66	1,60
	I ₂	0,089 b	8,99	0,79
Année 2	I ₁	0,241 a	4,98	5,70
	I ₂	0,331 b	6,04	10,56

Légende :

Périodes d'insolation *: I₁ : Période de basse insolation. I₂ : Période de haute insolation. **Moyenne transformée*** : Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Student-Newman et Keuls au seuil de confiance 95 %.

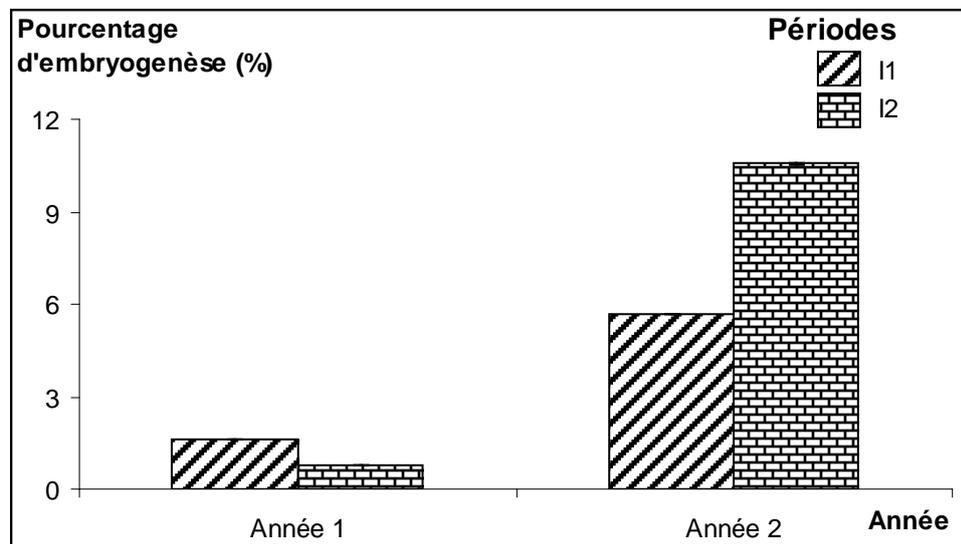


Figure 14 : Pourcentage d'embryogenèse de chacune des périodes d'insolation pendant les 2 années d'étude.

Légende

I₁ : Période de faible insolation. I₂ : Période de forte insolation.

1.7. Contribution des paramètres climatiques à la variation de l'embryogenèse

Elle a été évaluée non seulement à travers la signification de la régression, mais surtout à travers le coefficient de détermination R^2 de cette régression multiple.

1.7.1. Modélisation de la variation de l'embryogenèse somatique en fonction des paramètres climatiques

Pour identifier le meilleur modèle linéaire, les analyses de variance de la régression du pourcentage d'embryogenèse somatique sur les 5 paramètres climatiques ont été réalisées (Tableaux XVII et XVIII). Pour la première année d'étude, les résultats ont montré que la température minimale, les écarts de température et l'insolation influencent le plus l'embryogenèse somatique. Ils expliquent 2,20 % de variations de l'embryogenèse somatique. Tous les 3 contribuent à la construction de la droite de régression dont l'équation associée est $Pe = 0,877 - 0,332 T_{min} - 0,403 E_{tm} + 0,070 Insol.$

Cette équation montre que le pourcentage d'embryogenèse diminue en moyenne de 10,62 % quand la température minimale augmente de 1 degré. De même, ce pourcentage d'embryogenèse diminue en moyenne de 15,38 % lorsque les écarts de température augmentent de 1 degré. Par contre, il augmente de 0,48 % quand l'insolation augmente de 1 heure par jour. Ce pourcentage serait de 59,10 %, si la température minimale, les écarts de température et l'insolation étaient nuls.

En conséquence, les périodes de forte température minimale T_{n2} , celle de faibles écarts de température E_1 , celle de faible insolation I_1 de la première année, mais celle de forte insolation de I_2 de la deuxième année pourraient être choisies pour optimiser l'embryogenèse somatique.

Pour la seconde année d'expérimentation, aucun paramètre climatique pris individuellement ou collectivement n'a exercé un effet sur l'embryogenèse somatique (Tableau XVIII).

Tableau XVII : Effet de la température minimale, des écarts de température et de l'insolation sur le pourcentage d'embryogenèse durant la première année d'étude.

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher*	Pr > F*	R ² (%)*
Modèle	3	4,808	1,603	17,149	< 0,0001	2,20
Résidus	2316	216,458	0,093			
Total	2319	221,266				

Légende :

ddl* : Nombre des degrés de liberté. **F de Fisher*** : Rapport de la variance factorielle sur la variance résiduelle. **Pr** : Probabilité calculée à comparer à la probabilité seuil 5 %. **R² (%)** : Coefficient de détermination en pourcentage. **Pr > F *** = < 0,0001 : Effet très hautement significatif.

Tableau XVIII : Effet de la pluviosité, de la température maximale, de la température minimale, des écarts de température et de l'insolation sur le pourcentage d'embryogenèse durant la seconde année d'étude.

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F	R ² (%)*
Modèle	3	0,070	0,023	0,083	0,969	0,00
Résidus	2771	774,234	0,279			
Total	2774	774,303				

Légende :

ddl* : Nombre des degrés de liberté. **F de Fisher*** : Rapport de la variance factorielle sur la variance résiduelle. **Pr** : Probabilité calculée à comparer à la probabilité seuil 5 %. **R² (%)** : Coefficient de détermination en pourcentage.

**2. INFLUENCE DE QUELQUES PARAMETRES
PHENOLOGIQUES SUR L'EMBRYOGENESE
SOMATIQUE DU CACAOYER**

2.1. Influence de l'année sur les variations des paramètres phénologiques

Pour déterminer l'influence de l'année sur la phénologie du cacaoyer, les variations des 3 paramètres phénologiques ont été analysées sur les 2 années d'étude (Tableau XIX). Il est ressorti des résultats qu'à l'exception du rythme des poussées foliaires, les niveaux de floraison et de fructification varient significativement d'une année à l'autre. En conséquence, le rythme des poussées foliaires a été éliminé dans la suite de l'analyse. Les analyses ultérieures n'ont porté que sur les niveaux de floraison et de fructification. Du fait de l'influence manifeste de l'année, elles ont été conduites année par année. Par ailleurs, la variabilité autour de chacune des moyennes a fluctué de 0,77 à 1,29 %.

2.2. Structuration des 2 paramètres phénologiques les plus variables en fonction des mois

Pour tester l'influence du mois sur la phénologie du cacaoyer, et partant, identifier des classes phénologiques stables, les 2 paramètres phénologiques les plus variables ont été structurés en fonction des mois pour chacune des années d'étude (Tableau XX). Les résultats ont montré qu'au cours de la première année d'étude, pour le niveau de floraison, 5 classes phénologiques sont identifiées, contre 4 la seconde année. Pour le niveau de fructification, durant la première année d'étude, 3 classes très chevauchées sont observées, alors la seconde année, 4 en sont enregistrées. Ainsi, 2 contraintes se sont dégagées au terme de l'analyse de la structuration des paramètres phénologiques. Il s'agit de l'absence d'identité dans la composition mensuelle des groupes identifiés et la pléthore de ceux-ci. Ces 2 contraintes n'ont pas permis de convertir ces groupes en classes phénologiques stables pouvant servir à tester les corrélations entre la phénologie et l'embryogenèse somatique. Pour y arriver, les classes phénologiques ont été identifiées en s'inspirant de la méthode utilisée pour l'identification des périodes climatiques stables précédentes. Dans l'ensemble, l'amplitude de la variation autour de la moyenne de chaque paramètre phénologique a oscillé de 1,40 à 5,64 %.

Tableau XIX : Classification des moyennes de chaque paramètre phénologique des 2 années d'étude.

Variable dépendante*	Année	Moyenne transformée*	CV (%)	Moyenne non transformée
Nivflo	Année 1	0,775 a	0,77	48,96 %
	Année 2	0,752 b	0,80	46,66 %
Nivfru	Année 1	3,278 a	1,19	10,745 fruits
	Année 2	4,178 b	0,84	17,456 fruits
Rythpf	Année 1	0,622 a	1,29	33,95 %
	Année 2	0,633 a	1,11	35,00 %

Légende :

Variables dépendantes*: **Nivflo** : Niveau de floraison. **Nivfru** : Niveau de fructification. **Rythpf** : Rythme des poussées foliaires. **Moyenne transformée*** : Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Student-Newman et Keuls au seuil de risque 5 %.

Tableau XX : Classification de moyennes des niveaux de floraison et de fructification en fonction des mois sur les 2 années d'étude.

	Moyenne transformée *							
	Année 1				Année 2			
Mois*	Nivflo*	CV (%)*	Nivfru*	CV (%)*	Nivflo	CV (%)	Nivfru	CV (%)
Septembre	0,615 a	3,74	2,562 b	4,29	0,66 a	2,12	3,713 b	3,07
Octobre	0,700 b	2,86	2,223 a	4,45	0,673 a	1,93	2,989 a	3,38
Novembre	0,787 c	2,92	1,933 a	5,64	0,64 a	2,34	2,728 a	4,25
Décembre	0,827 c	2,78	2,05 a	5,37	0,738 bc	2,03	2,772 a	4,18
Janvier	0,946 d	2,11	2,479 b	3,95	0,83 d	1,57	4,746 d	2,17
Février	0,933 d	2,36	3,329 c	3,24	0,787 c	1,91	5,175 e	2,26
Mars	1,047 e	2,10	4,37 e	2,45	0,725 b	1,93	5,112 de	2,19
Avril	-	-	-	-	0,928 e	1,40	4,731 d	2,09
Mai	0,614 a	3,75	4,072 de	2,70	0,939 e	1,49	4,998 de	2,28
Juin	0,549 a	4,19	3,82 d	2,88	0,75 bc	2,00	4,989 de	2,33
Juillet	0,703 b	2,84	4,646 f	2,09	0,653 a	1,99	4,219 c	2,37
Août	0,782 c	2,69	4,477 f	2,32	0,681 a	2,06	3,92 b	2,88

Légende :

Moyenne transformée*: Les valeurs ont été obtenues par la transformation angulaire arc sinus pour le niveau de floraison. Pour le niveau de fructification, c'est la transformation racine carrée qui a été utilisée. Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Student-Newman et Keuls au seuil de confiance 95 %. **Nivflo** : Niveau de floraison. **Nivfru** : Niveau de fructification. **CV (%)** : Coefficient de variation en pourcentage.

2.3. Organisation des paramètres en classes phénologiques stables

2.3.1. Classes stables de niveau de floraison

Seule la première année d'étude a produit 2 classes distinctes. La seconde année n'a pas varié significativement d'un mois à l'autre. Ainsi, la première année, la classe de faible niveau de floraison (NO₁), s'étalant du mois de mai à celui de juin, a été caractérisée par un niveau de floraison moyen de 58,1 % (CV = 2,92 %). La classe de fort niveau de floraison (NO₂) incluant les mois de septembre à mars, puis juillet à août, a été marquée par un niveau de floraison moyen de 81,4 % (CV = 0,98 %).

2.3.2. Classes stables de niveau de fructification

Pour ce paramètre, aucune variation significative n'a été enregistrée d'un mois à l'autre. Néanmoins, les moyennes annuelles de 3,27 fruits (CV = 1,15 %) et de 4,18 fruits (CV = 0,86 %), ont été enregistrées respectivement la première année et de la seconde année d'étude.

2.4. Lien entre les classes phénologiques stables et l'embryogenèse somatique

2.4.1. Lien entre les classes stables du niveau de floraison et l'embryogenèse somatique

La première année, l'embryogenèse a été variable d'une classe à l'autre (Tableau XXI). Seule la classe NO₁ a enregistré une instabilité de la réponse à l'embryogenèse (CV > 20 %). Le sens de variation du niveau de floraison relativement à celui de l'embryogenèse somatique a été concordant. Ainsi, la classe de faible niveau de floraison (NO₁) a été en rapport avec une faible embryogenèse, alors que la classe de fort niveau de floraison (NO₂) a été en relation avec à une forte embryogenèse. Par ailleurs, ce lien a été illustré pour les 6 hybrides et les 2 clones témoins (Figure 15).

2.4.2. Lien entre les classes stables du niveau de fructification et l'embryogenèse somatique

En raison de l'absence de classes distinctes, l'analyse du sens de variation du niveau de fructification relativement à celui de l'embryogenèse somatique n'a pas été faite. Le niveau de fructification n'a pas varié significativement au cours de chacune des années d'étude. La réponse à l'embryogenèse des 2 classes annuelles a été stable (CV < 20 % ; Tableau XXII). Par ailleurs, pour mieux apprécier la relation entre le niveau de fructification et l'embryogenèse somatique, le pourcentage d'embryogenèse de chacune des classes de 12 mois a été représenté pour les 6 hybrides et les 2 clones témoins (Figure 16).

Tableau XXI : Classification des moyennes du pourcentage d'embryogenèse selon les classes phénologiques du niveau de floraison au cours des 2 années d'étude.

Année	Classes de niveau de floraison*	Moyenne transformée*	CV (%)	Moyenne non transformée (%)
Année 1	NO ₁	0,028 a	57,14	0,08
	NO ₂	0,118 b	5,93	1,39
Année 2	NO	0,265	3,77	6,86

Légende :

Classes de niveau floraison*: NO₁ : Classe de bas niveau de floraison. NO₂ : Classe de haut niveau de floraison. NO : Classe unitaire annuelle de niveau de floraison. **Moyenne transformée* :** Les valeurs suivies de lettres différentes sont statistiquement différentes d'après le test de Student-Newman et Keuls au seuil de confiance 95 %.

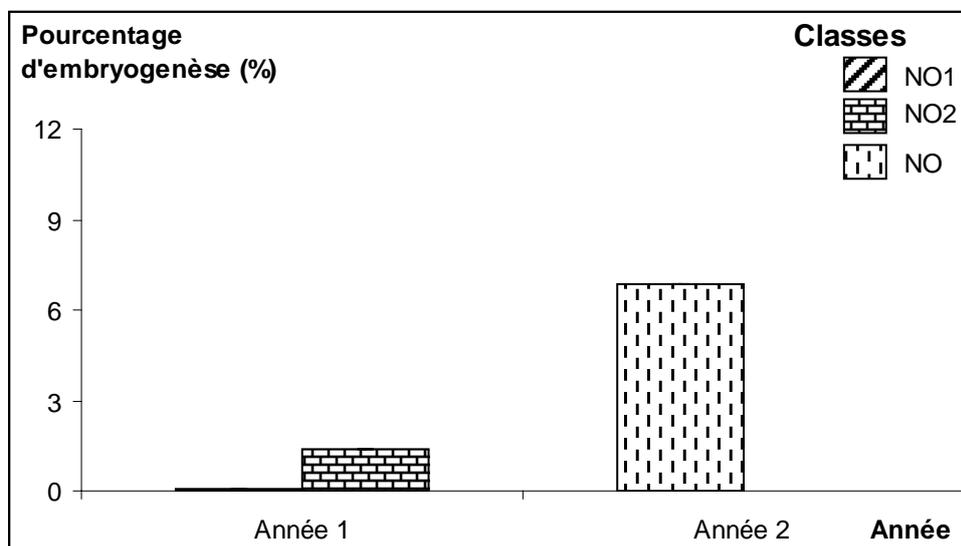


Figure 15 : Pourcentage d'embryogenèse associé à chacune des classes phénologiques du niveau de floraison sur les 2 années d'étude.

Légende

NO₁ : Classe de faible niveau de floraison. NO₂ : Classe de fort niveau de floraison. NO : Classe unitaire annuelle de niveau de floraison.

Tableau XXII : Classification des moyennes du pourcentage d'embryogenèse en fonction des classes phénologiques du niveau de fructification sur les 2 années d'étude.

Année	Classes de niveau de fructification*	Moyenne transformée*	CV (%)	Moyenne non transformée (%)
Année 1	NU	0,103	5,83	1,06
Année 2	NU	0,265	3,77	6,86

Légende :

Classes de niveau floraison*: NU : Classe unitaire annuelle de niveau de fructification.

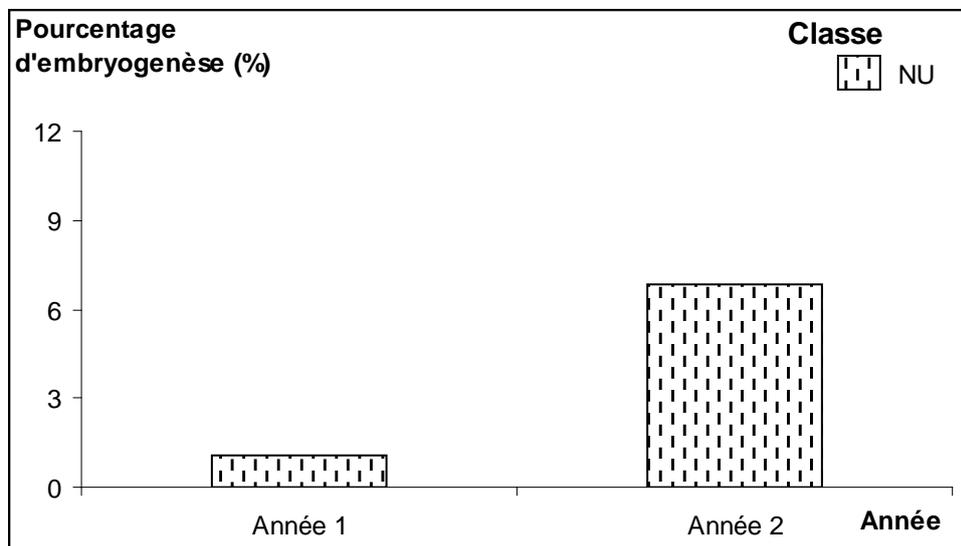


Figure 16 : Pourcentage d'embryogenèse correspondant à chacune des classes phénologiques du niveau de fructification durant les 2 années d'étude.

Légende

NU : Classe unitaire annuelle de niveau de fructification.

En somme, en dehors de la variation enregistrée par le niveau de floraison, la première année d'étude, le rythme des poussées foliaires et le niveau de fructification n'ont pas significativement varié, d'une année à l'autre. La classe No₁ de faible niveau de floraison a exprimé une instabilité de la réponse à l'embryogenèse somatique (CV > 20 %). Le sens de variation des 2 classes de niveau de floraison identifiées a été comparable à celui de l'embryogenèse somatique.

2.5. Contribution des paramètres phénologiques, puis climatiques et phénologiques à la variation totale de l'embryogenèse somatique

2.5.1. Modélisation de la variation de l'embryogenèse somatique en fonction des paramètres phénologiques

Les effets des 2 meilleurs paramètres phénologiques sur l'embryogenèse somatique ont été testés à travers les analyses de variance de la régression (Tableaux XXIII et XXIV). Pour la première année d'étude, il est ressorti des résultats que seul le niveau de fructification influence significativement l'embryogenèse somatique. Celui-ci explique 1,40 % des fluctuations de l'embryogenèse somatique. La droite de régression qui modélise ces fluctuations est $Pe = 0,037 + 0,012 \text{ Nivfru}$

Cette équation révèle que le pourcentage d'embryogenèse augmente en moyenne de 0,01 % quand le niveau de fructification augmente de 1 fruit. Ce pourcentage serait de 0,13 %, si le niveau de fructification était nul.

En conséquence, du fait de l'absence de classes phénologiques mensuelles du niveau de fructification, aucun intervalle de temps n'a pu être retenu pour optimiser l'embryogenèse somatique.

Pour la seconde année d'expérimentation, les niveaux de floraison et de fructification ont exercé un effet significatif sur l'embryogenèse somatique (Tableau XXII). Les 2 paramètres expliquent 6,90 % des variations de l'embryogenèse somatique. L'équation de régression qui illustre ces variations est $Pe = 0,188 + 0,302 \text{ Nivflo} + 0,053 \text{ Nivfru}$.

Cette équation montre que le pourcentage d'embryogenèse augmente en moyenne de 8,84 % quand le niveau de floraison augmente de 1 %. De même, ce pourcentage augmente de 0,28 % lorsque le niveau de fructification s'accroît de 1 fruit. Ce pourcentage serait de 3,49 %, si les niveaux de floraison et de fructification étaient nuls.

Du fait de l'absence de classes phénologiques mensuelles des 2 paramètres, aucun intervalle

de temps n'a pu être retenu pour optimiser l'embryogenèse somatique.

Tableau XXIII : Influence des niveaux de floraison et de fructification sur l'embryogenèse somatique durant la première année d'étude.

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F*	R ² (%)
Nivflo	1	0,083	0,083	0,877	0,349	
Nivfru	1	2,452	2,452	26,053	< 0,0001	1,40

Légende :

ddl* : Nombre des degrés de liberté. **F de Fisher*** : Rapport de la variance factorielle sur la variance résiduelle. **Pr** : Probabilité calculée à comparer à la probabilité seuil 5 %. **R² (%)*** : Coefficient de détermination en pourcentage. **Pr > F*** : < 0.0001 : Effet très hautement significatif.

Tableau XXIV : Effet des niveaux de floraison et de fructification sur l'embryogenèse somatique durant la seconde année d'étude.

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F *	R ² (%)
Nivflo	1	12,731	12,731	48,957	< 0,0001	6,90
Nivfru	1	26,157	26,157	100,585	< 0,0001	

Légende :

ddl* : Nombre des degrés de liberté. **F de Fisher*** : Rapport de la variance factorielle sur la variance résiduelle. **Pr** : Probabilité calculée à comparer à la probabilité seuil 5 %. **R² (%)*** : Coefficient de détermination en pourcentage. **Pr > F *** : 0,0001: Effet très hautement significatif.

2.5.2. Modélisation de la variation de l'embryogenèse somatique en fonction des paramètres climatiques et phénologiques

Pour identifier le meilleur modèle linéaire, les analyses de variance de la régression du pourcentage d'embryogenèse somatique sur les 3 paramètres climatiques et 2 paramètres phénologiques ont été réalisées (Tableaux XXV et XXVI). Pour la première année d'étude, les résultats ont montré que seuls les écarts de température et le niveau de fructification exercent un effet significatif sur l'embryogenèse somatique. Ils expliquent 2,80 % de fluctuations de l'embryogenèse somatique. Les 2 paramètres contribuent à la construction de la droite de régression dont l'équation associée s'écrit $Pe = 0,288 - 0,241 E_{tm} + 0,015 Nivfru$

Cette équation suggère que le pourcentage d'embryogenèse décroît en moyenne de 5,69 % quand les écarts de température augmentent de 1 degré. Toutefois, ce pourcentage d'embryogenèse s'accroît en moyenne de 0,02 % lorsque le niveau de fructification augmente de 1 fruit. Ce pourcentage serait de 8,06 %, si les écarts de température et le niveau de fructification étaient nuls.

Cependant, pour la seconde année d'étude, les écarts de température, les niveaux de floraison et de fructification exercent un effet évident sur l'embryogenèse somatique. Ils expliquent 8,40 % des variations de l'embryogenèse somatique. L'équation de la droite de régression à laquelle ils sont associés est $Pe = 0,251 - 0,517 E_{tm} + 0,345 Nivflo + 0,068 Nivfru$.

Cette équation révèle que le pourcentage d'embryogenèse diminue en moyenne de 24,43 % quand les écarts de température augmentent de 1 degré. Cependant, ce pourcentage d'embryogenèse augmente en moyenne de 11,44 % lorsque le niveau de floraison augmente de 1 %. De même, il s'accroît de 0,46 %, quand le niveau de fructification augmente de 1 fruit. Ce pourcentage serait de 6,17 %, si les écarts de température, les niveaux de floraison et de fructification étaient nuls.

En conséquence, seuls les effets des écarts de température sur l'embryogenèse somatique du cacaoyer paraissent stables, d'une année à l'autre. Sa période de faibles écarts de température E_1 incluant les mois septembre 2002, mai et août 2003, pourrait être proposée pour optimiser l'embryogenèse somatique chez le cacaoyer.

Tableau XXV : Influence des écarts de température, de l'insolation, des niveaux de floraison et de fructification sur l'embryogenèse somatique au cours de la première année d'étude.

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F	R ² (%)
Etm	1	1,991	1,991	21,461	< 0,0001	2,80
Insol	1	0,010	0,010	0,103	0,749	
Nivflo	1	0,303	0,303	3,261	0,071	
Nivfru	1	0,971	0,971	10,471	0,001	

Légende :

ddl* : Nombre des degrés de liberté. **F de Fisher*** : Rapport de la variance factorielle sur la variance résiduelle. **Pr** : Probabilité calculée à comparer à la probabilité seuil 5%. **R² (%)*** : Coefficient de détermination en pourcentage. **Pr > F *** : 0,0001: Effet très hautement significatif. **Pr > F *** : 0,001: Effet très significatif.

Tableau XXVI : Effet des écarts de température, de l'insolation, des niveaux de floraison et de fructification sur l'embryogenèse somatique pendant la seconde année d'étude.

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F	R ² (%)
Etm	1	12,072	12,072	47,180	< 0,0001	8,40
Insol	1	0,770	0,770	3,008	0,083	
Nivflo	1	16,959	16,959	66,277	< 0,0001	
Nivfru	1	35,245	35,245	137,742	< 0,0001	

Légende :

ddl* : Nombre des degrés de liberté. **F de Fisher*** : Rapport de la variance factorielle sur la variance résiduelle. **Pr** : Probabilité calculée à comparer à la probabilité seuil 5%. **R² (%)*** : Coefficient de détermination en pourcentage. **Pr > F *** : < 0,0001: Effet très hautement significatif.

En définitive, les écarts de température et le niveau de fructification sont les 2 paramètres communs aux 2 modèles linéaires précédemment identifiés. La première année ces 2 paramètres communs ont expliqué 2,80 % des fluctuations de l'embryogenèse, alors que la seconde année, ils en ont expliqué 6,30 % (résultats non montrés).

2.6. Pertinence et suffisance des données collectées sur 2 années d'expérimentation

Pour savoir si les données collectées sur 2 années d'expérimentation suffisent pour tirer des conclusions fiables, la régression du pourcentage d'embryogenèse sur la période E_1 d'écarts de température a été réalisée. Les résultats ont montré qu'à partir de la matrice équilibrée, contenant à la fois des observations favorables et non favorables, les écarts de température expliquent 9 % des variations de l'embryogenèse somatique. Toutefois, à partir d'une matrice filtrée, ne contenant que des observations favorables, la part des fluctuations de l'embryogenèse due aux écarts de température est de 13,40 %.

3. RELATIONS ENTRE LE CLIMAT ET LA PHENOLOGIE DU CACAOYER

3.1. Influence du climat sur la phénologie

Pour analyser l'influence du climat sur la phénologie, l'Analyse en Composantes Principales a été appliquée à 8 paramètres. Il s'agit de 5 paramètres climatiques et 3 paramètres phénologiques (Figures 17 et 18). Les résultats ont montré que 7 axes factoriels synthétisent l'information contenue dans les paramètres initiaux. Ces 7 axes factoriels expliquent 100 % de la variation totale. La première année d'expérimentation, l'axe F1 explique 29,78 % de la variation, contre 31,10 % la seconde année. La première année, cet axe traduit le maximum thermique, alors que la seconde année, elle exprime l'amplitude thermique (Tableau XXVII). La première année, la température maximale et les écarts de température y sont bien représentés. Ces 2 paramètres y sont favorablement corrélés (Tableau XXVIII). La seconde année, les écarts de température et la température minimale y sont saillants. La première année, l'axe F2 montre 24,21 % de la variation résiduelle non expliquée par l'axe F1, tandis que la seconde année, il en exprime 25,37 %. La première année, cet axe décrit le minimum thermique. Toutefois, la seconde année, il révèle le maximum thermique. La première année, la température minimale y est bien représentée, alors que la seconde année, c'est la température maximale qui y est proéminente. La première année, l'axe F3 explique 14,43 % de la variation de la variation résiduelle non prise en compte par l'axe F2, contre 13,84 % la seconde année. La première année, cet axe révèle le réveil des bourgeons, alors que la seconde année, il montre les précipitations. La première année, le rythme des poussées foliaires y est saillant, tandis que la seconde année, c'est la pluviosité qui l'est. La première année, 13,30 % de la variation résiduelle non expliquée par l'axe F3 sont attribuables à l'axe F4. La seconde année, cet axe explique 9,24 % de cette variation résiduelle. La première année, il décrit les précipitations, tandis que la seconde année, il dépeint le réveil des bourgeons. La première année, la pluviosité y est proéminente. La seconde année, c'est le rythme des poussées foliaires qui l'est. La première année, l'axe F5 explique 8,43 % de la variation résiduelle non prise en compte par l'axe F4. La seconde année, il explique 8,64 % de la variation restante. Il décrit la floraison. Quelle que soit l'année, le niveau de floraison y est bien représenté. La première année d'étude, 6,67 % de la variation résiduelle non expliquée par l'axe F5 sont imputables à l'axe F6. La seconde année, il dépeint 8,23 % de cette variation résiduelle. Il décrit la fructification. Car, d'une année à la suivante, le niveau de fructification y est saillant. La première année, l'axe F7 exprime 3,17 % de la variation

non prise en compte par l'axe F6, contre 3,58 % la seconde année. Quelle que soit l'année, il décrit le degré d'éclairement. L'insolation y est bien représentée.

En se fondant uniquement sur le plan principal constitué des axes F1 et F2, 4 groupes de paramètres ont été identifiés la première année, contre 3 la seconde année. Ce plan explique 53,97 % de la variation la première année, alors qu'il en explique 56,47 % la seconde année.

La première année, la composition de ces groupes a été la suivante :

- le premier composé de la température maximale, des niveaux de floraison et de fructification ;
- le deuxième formé de la température minimale, des niveaux de floraison et de fructification ;
- le troisième constitué de la température maximale et du rythme des poussées foliaires ;
- le quatrième incluant l'insolation et le rythme des poussées foliaires

La seconde année, leur composition a été la suivante :

- le premier composé des écarts de température, des niveaux de floraison et de fructification ;
- le deuxième constitué de la température maximale, du rythme des poussées foliaires, des niveaux de floraison et de fructification ;
- le troisième comprenant l'insolation et le rythme des poussées foliaires.

Ces structurations ont montré que, de façon stable, d'une année à la suivante, la température maximale influence les niveaux de floraison et de fructification ainsi que le rythme des poussées foliaires. De même, l'insolation explique le rythme des poussées foliaires. Par contre, de manière moins constante, les niveaux de floraison et de fructification sont tantôt influencés par la température minimale, tantôt par les écarts de température. La relation ainsi établie montre que la variation de la réponse à l'embryogenèse relativement à la phénologie n'est que le reflet de l'influence du climat sur la phénologie.

3.2. Relation entre les 3 paramètres phénologiques

Pour analyser la relation entre les 3 paramètres phénologiques, les coefficients de corrélation linéaire de Pearson ont été utilisés (Tableau XXVIII). Les résultats ont montré que les 3 paramètres phénologiques sont favorablement et significativement corrélés entre eux.

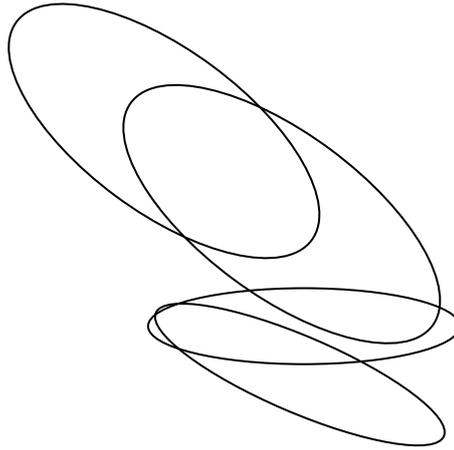


Figure 17 : Structuration des paramètres climatiques et phénologiques dans l'espace représenté par le plan 1- 2 de l'ACP de la première année d'étude.

Légende : La pluviosité n'est pas intervenue dans la structuration car elle n'est pas bien représentée sur le plan 1-2 (Tableau XXV).

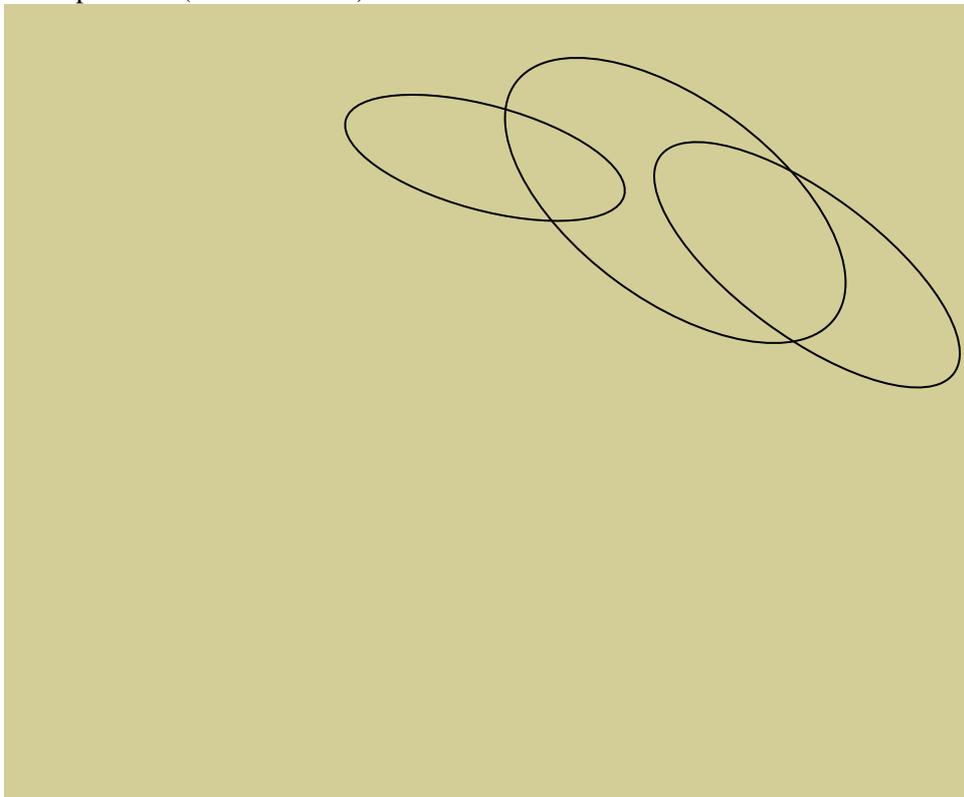


Figure 18 : Structuration des paramètres climatiques et phénologiques dans l'espace représenté par le plan 1-2 de l'ACP de la seconde année d'étude.

Tableau XXVII : Relation entre les Composantes Principales et les paramètres climatiques et phénologiques au cours des 2 années d'étude

Année	Paramètre*	Composantes principales						
		F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
Année 1	Pluie	0,017	-0,036	0,025	0,990	0,053	0,041	-0,116
	Tmax	0,939	-0,018	0,001	0,028	-0,106	0,114	0,304
	Tmin	0,209	0,953	-0,060	-0,019	-0,054	0,203	-0,032
	Etm	0,418	-0,871	0,055	0,035	-0,020	-0,110	0,225
	Insol	0,408	-0,202	0,111	-0,177	-0,080	-0,003	0,862
	Nivflo	0,093	0,029	0,142	-0,057	-0,970	0,148	0,061
	Nivfru	0,092	0,233	0,042	0,046	-0,155	0,954	0,000
	Rythpf	0,009	-0,074	0,984	0,025	-0,136	0,038	0,077
Année 2	Pluie	0,015	0,000	0,980	0,003	0,001	0,000	0,002
	Tmax	0,000	0,848	0,000	0,033	0,015	0,009	0,096
	Tmin	0,864	0,055	0,008	0,006	0,002	0,015	0,049
	Etm	0,909	0,037	0,008	0,000	0,011	0,029	0,007
	Insol	0,076	0,116	0,004	0,010	0,005	0,002	0,787
	Nivflo	0,011	0,011	0,001	0,016	0,946	0,012	0,003
	Nivfru	0,045	0,006	0,000	0,002	0,013	0,934	0,001
	Rythpf	0,003	0,023	0,003	0,946	0,016	0,002	0,007

Légende :

En gras : Valeur des corrélations les plus fortes entre les Composantes Principales et les paramètres les mieux représentés. **Paramètre* :** **Pluie :** Pluviosité. **Tmax :** Température maximale. **Tmin :** Température minimale. **Etm :** Ecart de température. **Insol :** Insolation. **Nivflo :** Niveau de floraison. **Nivfru :** Niveau de fructification. **Rythpf :** Rythme des poussées foliaires.

Tableau XXVIII : Relation entre les paramètres climatiques et phénologiques à travers les corrélations linéaires de Pearson.

Année		Pluie	Tmax	Tmin	Etm	Insol	Nivflo	Nivfru	Rythpf
Année 1	Pluie	1	0,008	-0,042	0,043	-0,262	-0,105	0,071	0,037
	Tmax	0,008	1	0,198	0,467	0,652	0,223	0,209	0,053
	Tmin	-0,042	0,198	1	-0,774	-0,134	0,120	0,440	-0,115
	Etm	0,043	0,467	-0,774	1	0,542	0,036	-0,262	0,139
	Insol	-0,262	0,652	-0,134	0,542	1	0,188	-0,003	0,201
	Nivflo	-0,105	0,223	0,120	0,036	0,188	1	0,311	0,279
	Nivfru	0,071	0,209	0,440	-0,262	-0,003	0,311	1	0,084
	Rythpf	0,037	0,053	-0,115	0,139	0,201	0,279	0,084	1
Année 2	Pluie	1	-0,001	0,194	-0,199	-0,064	0,038	-0,022	0,113
	Tmax	-0,001	1	0,283	0,181	0,611	0,264	0,172	0,363
	Tmin	0,194	0,283	1	-0,892	0,537	-0,108	-0,306	0,172
	Etm	-0,199	0,181	-0,892	1	-0,263	0,235	0,395	-0,006
	Insol	-0,064	0,611	0,537	-0,263	1	0,132	-0,087	0,239
	Nivflo	0,038	0,264	-0,108	0,235	0,132	1	0,251	0,265
	Nivfru	-0,022	0,172	-0,306	0,395	-0,087	0,251	1	0,101
	Rythpf	0,113	0,363	0,172	-0,006	0,239	0,265	0,101	1

Légende

En gras : Valeurs significatives des corrélations selon le test de Pearson au seuil de confiance 95 %.

**4. INFLUENCE DE QUELQUES PARAMETRES
GENETIQUES SUR L'EMBRYOGENESE
SOMATIQUE DU CACAOYER**

4.1. Effet de l'année sur les variables de culture des tissus mesurées

Pour tester l'effet de l'année sur les variables mesurées, leur variation a été évaluée sur les 2 années d'étude (Tableau XXIX). Il est ressorti des résultats que toutes les variables de culture des tissus mesurées varient significativement d'une année à la suivante. Du fait de l'existence de telles variations, toutes ont été utilisées pour caractériser les aptitudes callogènes et embryogènes des génotypes testés ainsi que les effets de l'explant et du milieu d'induction. De même, en raison de l'existence de l'influence de l'année, les analyses ont été faites année par année. Par ailleurs, l'amplitude des écarts entre chacune des moyennes de variables et les observations individuelles a fluctué de 0,79 à 10,57 %.

Tableau XXIX: Classification des moyennes de variables de culture des tissus en fonction des 2 années d'expérimentation.

Variable de culture des tissus*	Année	Moyenne transformée*	CV (%)*	Moyenne non transformée*
Nexcal	Année 1	3,485 a	1,03	12,145
	Année 2	4,162 b	0,79	17,322
Nexemb	Année 1	0,467 a	8,35	0,218
	Année 2	1,129 b	3,19	1,275
Nemb	Année 1	0,795 a	10,57	0,632
	Année 2	2,217 b	3,47	4,915
Mexemb	Année 1	0,560 a	8,39	0,314
	Année 2	1,319 b	3,26	1,740
Pe	Année 1	0,103 a	8,74	1,06 %
	Année 2	0,265 b	3,02	6,86 %

Légende :

Variable de culture des tissus* : **Nexcal** : Nombre d'explants callogènes. **Nexemb** : Nombre d'explants embryogènes. **Nemb** : Nombre d'embryons par explant embryogène. **Mexemb** : Moyenne d'embryons par explant embryogène. **Pe** : Pourcentage d'embryogenèse. **Moyenne transformée*** : Les valeurs affectées de lettres différentes sont statistiquement différentes selon le test de Student-Newman et Keuls au seuil de confiance 95 %. **CV (%)*** : Coefficient de variation en pourcentage. **Moyenne non transformée*** : Les valeurs ont été obtenues par la fonction inverse de celle utilisée pour leur transformation.

4.2. Caractérisation des aptitudes callogènes et embryogènes des génotypes, de l'effet de l'explant et du milieu d'induction

4.2.1. Pertinence des descripteurs primaires

Pour identifier les descripteurs primaires pertinents les interactions d'ordre 1 et 2, issues de l'analyse de variance à 3 critères de classification, ont été examinées sur les données enregistrées chez les hybrides (Tableaux XXX et XXXI). Cinq descripteurs primaires ont été utilisés : 1) le nombre d'explants callogènes, 2) le nombre d'explants embryogènes, 3) le nombre d'embryons par explant embryogène, 4) la moyenne d'embryons par explant embryogène et 5) le pourcentage d'embryogénèse.

L'analyse de l'effet de chaque facteur pris séparément a montré que, d'une année à la suivante, les 5 descripteurs primaires utilisés sont assez discriminants pour structurer les génotypes de cacaoyer utilisés en des classes distinctes ($P = 0,000$). Hormis le nombre d'explants callogènes de la première année ($P / Nexcal = 0,253$), les autres descripteurs peuvent permettre la caractérisation de l'effet des explants sur le potentiel callogène et embryogène pour les 2 années d'étude. Pour peu que les facteurs en cause ne soient pas interactifs. Pour l'effet des milieux d'induction, d'une année à l'autre, les effets sont variables. De fait, la première année, les variations des 5 variables mesurées sont indépendantes de celle du facteur milieu. La seconde année, par contre, on a pu noter que la variation de la concentration en phytohormones exogènes induit des variations nettement visibles et structurables du nombre d'explants callogènes ($P / Nexcal = 0,000$). Elle provoque également la variation de la moyenne d'embryons produits par explant embryogène ainsi que celle du pourcentage d'embryogénèse ($P / Mexemb = 0,000$; $P / Pe = 0,026$). Cependant, la variation du nombre d'explants embryogènes et celle du nombre d'embryons par explant embryogène sont indépendantes de la variation des phytohormones exogènes ($P / Nexemb = 0,240$; $P / Nemb = 0,117$).

L'examen des interactions d'ordre 1 révèle de fortes similitudes dans leurs effets. De fait, quelle que soit l'année, pour la variation simultanée du génotype et de l'explant, puis celle du génotype et du milieu, on note que les variations du nombre d'explants callogènes et celles de la moyenne d'embryons par explant embryogène en sont indépendantes. Cependant, les variations simultanées de ces facteurs pris 2 à 2 sont dépendantes de celles du nombre d'explants embryogènes, du nombre d'embryons par explant embryogène et celle du pourcentage d'embryogénèse. Pour

l'effet conjoint entre l'explant et le milieu d'induction, d'une année à la suivante, celui-ci a été différent. De fait, la première année, la variation du nombre d'explants callogènes et de celle de la moyenne d'embryons par explant embryogène est indépendante de la fluctuation concomitante du type de l'explant et du milieu d'induction. Cependant, la variation du nombre d'explants embryogènes, du nombre d'embryons par explant embryogène ainsi que celle du pourcentage d'embryogénèse sont dépendantes de celle des 2 facteurs précités. La seconde année, la variation du nombre d'explants callogènes, de la moyenne d'embryons par explant embryogène et de celle du pourcentage d'embryogénèse sont indépendantes de celle de la nature de l'explant et du milieu d'induction. Toutefois, la variation du nombre d'explants embryogènes et celle du nombre d'embryons par explant embryogène sont dépendantes de celle des ces 2 facteurs.

Pour l'interaction d'ordre 2, génotype x explant x milieu, ses effets sont différents selon les années. De fait, la première année, les variations concomitantes de ces 3 facteurs sont indépendantes de celles des 5 variables mesurées. Toutefois, la seconde année, leurs variations ne sont indépendantes que de celles du nombre d'explants callogènes ($P / Nexcal / Année 2 = 0,185$) et de celles de la moyenne d'embryons par explant embryogène ($P / Mexemb / Année 2 = 0,202$).

Ainsi, en tenant compte des interactions d'ordre 1 et 2, le nombre d'explants callogènes et la moyenne d'embryons par explant embryogène ont été utilisés dans la suite des travaux, pour caractériser les génotypes de cacaoyer. Ces 2 descripteurs primaires ont permis également l'analyse de l'effet du milieu d'induction et de la nature de l'explant sur l'expression du potentiel callogène et embryogène de ces génotypes.

Tableau XXX : Examen des effets individuels et des interactions entre les facteurs du dispositif d'évaluation de la callogénèse et de l'embryogénèse au cours de la première année d'étude.

Source	Variable dépendante*	SCE* type III	ddl*	CM*	F*	P*
Modèle corrigé	Nexcal	1306,146	47	27,79	5,771	0,000
	Nexemb	1268,31	47	26,985	19,139	0,000
	Nemb	4454,378	47	94,774	16,442	0,000
	Mexemb	1606,83	47	34,188	14,72	0,000
	Pe	62,47	47	1,329	19,017	0,000
Constante	Nexcal	27275,38	1	27275,4	5664,16	0,000
	Nexemb	399,099	1	399,099	283,052	0,000
	Nemb	1129,338	1	1129,34	195,923	0,000
	Mexemb	582,824	1	582,824	250,936	0,000
	Pe	19,294	1	19,294	276,055	0,000
Génotype	Nexcal	1210,428	7	172,918	35,909	0,000
	Nexemb	398,373	7	56,91	40,362	0,000
	Nemb	1408,602	7	201,229	34,91	0,000
	Mexemb	510,607	7	72,944	31,406	0,000
	Pe	19,928	7	2,847	40,732	0,000
Explant	Nexcal	6,294	1	6,294	1,307	0,253
	Nexemb	235,676	1	235,676	167,148	0,000
	Nemb	641,39	1	641,39	111,271	0,000
	Mexemb	264,726	1	264,726	113,979	0,000
	Pe	11,704	1	11,704	167,461	0,000
Milieu	Nexcal	6,923	2	3,461	0,719	0,487
	Nexemb	5,132	2	2,566	1,82	0,162
	Nemb	19,333	2	9,667	1,677	0,187
	Mexemb	4,352	2	2,176	0,937	0,392
	Pe	0,236	2	0,118	1,691	0,185
Génotype x Explant	Nexcal	34,774	7	4,968	1,032	0,487
	Nexemb	362,884	7	51,841	36,767	0,000
	Nemb	1378,082	7	196,869	34,154	0,000
	Mexemb	23,2938825	7	3,3277	1,4325	0,321
	Pe	17,986	7	2,569	36,763	0,000

Tableau XXX (Suite) : Examen des effets individuels et des interactions entre les facteurs du dispositif d'évaluation de la callogénèse et de l'embryogénèse au cours de la première année d'étude.

Source	Variable dépendante*	SCE* type III	ddl*	CM*	F*	P*
Génotype x Milieu	Nexcal	16,822	14	1,202	0,25	0,998
	Nexemb	49,273	14	3,52	2,496	0,002
	Nemb	205,505	14	14,679	2,547	0,001
	Mexemb	40,9383684	14	2,92417	1,25879	0,321
	Pe	2,2	14	0,157	2,248	0,005
Explant x Milieu	Nexcal	3,929	2	1,965	0,408	0,665
	Nexemb	16,911	2	8,455	5,997	0,003
	Nemb	67,652	2	33,826	5,868	0,003
	Mexemb	5,7423956	2	2,8712	1,23599	0,125
	Pe	0,747	2	0,373	5,34	0,005
Génotype x Explant x Milieu	Nexcal	11,105	14	0,793	0,165	1,000
	Nexemb	32,26	14	2,304	1,634	0,063
	Nemb	131,072	14	9,362	1,624	0,066
	Mexemb	40,657	14	2,904	1,25	0,231
	Pe	1,513	14	0,108	1,547	0,087
Erreur	Nexcal	10940,671	2272	4,815		
	Nexemb	3203,492	2272	1,41		
	Nemb	13096,259	2272	5,764		
	Mexemb	5276,935	2272	2,323		
	Pe	158,796	2272	0,07		
Total	Nexcal	40056,25	2320			
	Nexemb	4977	2320			
	Nemb	19017	2320			
	Mexemb	7610,13	2320			
	Pe	245,723	2320			
Total corrigé	Nexcal	12246,817	2319			
	Nexemb	4471,802	2319			
	Nemb	17550,637	2319			
	Mexemb	6883,764	2319			
	Pe	221,266	2319			

Légende :

Variables dépendantes transformées*: **Nexcal** : Nombre d'explants callogènes. **Nexemb** : Nombre d'explants embryogènes. **Nemb** : Nombre d'embryons par explant embryogènes. **Mexemb** : Moyenne d'embryons par explant embryogène. **Pe** : Pourcentage d'embryogénèse. **SCE*** : Somme des carrés des écarts. **ddl*** : Nombre des degrés de liberté. **CM*** : Carrés moyens. **F** : Rapport du carré moyen factoriel sur le carré moyen résiduel. **P** : Niveau de signification de l'effet du facteur ou de l'interaction au seuil de probabilité 5 %. **En gras** : Pour chaque facteur (Génotype, Explant et Milieu d'induction), la valeur de $P < 0,05$ permet au descripteur correspondant de structurer les variantes du facteur en classes distinctes ; pour les interactions, la valeur de $P > 0,05$ permet au descripteur concerné d'être indépendant de la variation simultanée des facteurs pour lesquels il a été mesuré. En gras et souligné : Interaction significative entre les facteurs en cause. Elle interdit la classification de chacun des facteurs relativement à la variable mesurée.

Tableau XXXI : Examen des effets individuels et des interactions entre les facteurs du dispositif d'évaluation de la callogenèse et de l'embryogenèse durant la seconde année d'expérimentation.

Source	Variable dépendante*	SCE* type III	ddl*	CM*	F*	P*
Modèle corrigé	Nexcal	873,996	47	18,596	12,648	0,000
	Nexemb	9639,65	47	205,099	135,925	0,000
	Nemb	39702,84	47	844,741	86,357	0,000
	Mexemb	12668,206	47	269,536	68,203	0,000
	Pe	519,691	47	11,057	118,428	0,000
Constante	Nexcal	45003,743	1	45003,7	30609,4	0,000
	Nexemb	1417,645	1	1417,65	939,514	0,000
	Nemb	5315,316	1	5315,32	543,378	0,000
	Mexemb	2695,035	1	2695,04	681,952	0,000
	Pe	79,214	1	79,214	848,417	0,000
Génotype	Nexcal	750,622	7	107,232	72,934	0,000
	Nexemb	3014,577	7	430,654	285,407	0,000
	Nemb	12698,372	7	1814,05	185,448	0,000
	Mexemb	4112,53	7	587,504	148,662	0,000
	Pe	162,437	7	23,205	248,538	0,000
Explant	Nexcal	6,135	1	6,135	4,173	0,041
	Nexemb	974,985	1	974,985	646,151	0,000
	Nemb	3590,066	1	3590,07	367,008	0,000
	Mexemb	1384,926	1	1384,93	350,442	0,000
	Pe	54,938	1	54,938	588,404	0,000
Milieu	Nexcal	24,351	2	12,175	8,281	0,000
	Nexemb	4,312	2	2,156	1,429	0,240
	Nemb	42,091	2	21,046	2,151	0,117
	Mexemb	76,369	2	38,185	9,662	0,000
	Pe	0,681	2	0,34	3,646	0,026
Génotype x Explant	Nexcal	14,811	7	2,116	1,439	0,185
	Nexemb	2593,611	7	370,516	245,551	0,000
	Nemb	10909,944	7	1558,56	159,33	0,000
	Mexemb	42,685552	7	6,09794	1,543	0,223
	Pe	139,988	7	19,998	214,189	0,000

Tableau XXXI (Suite) : Examen des effets individuels et des interactions entre les facteurs du dispositif d'évaluation de la callogénèse et de l'embryogénèse durant la seconde année d'expérimentation.

Source	Variable dépendante*	SCE* type III	ddl*	CM*	F*	P*
Génotype x Milieu	Nexcal	34,977	14	2,498	1,699	0,059
	Nexemb	58,584	14	4,185	2,773	0,000
	Nemb	304,583	14	21,756	2,224	0,005
	Mexemb	95,337	14	6,81	1,723	0,055
	Pe	2,993	14	0,214	2,29	0,004
Explant x Milieu	Nexcal	18,254	2	9,127	6,208	0,051
	Nexemb	11,835	2	5,918	3,922	0,020
	Nemb	23,988	2	11,994	1,226	0,294
	Mexemb	22,247	2	11,123	2,815	0,060
	Pe	0,214	2	0,107	1,148	0,318
Génotype x Explant x Milieu	Nexcal	7,743	14	0,553	0,376	0,982
	Nexemb	53,957	14	3,854	2,554	0,001
	Nemb	262,024	14	18,716	1,913	0,021
	Mexemb	71,643	14	5,117	1,295	0,202
	Pe	2,979	14	0,213	2,279	0,004
Erreur	Nexcal	4009,401	2727	1,47		
	Nexemb	4114,807	2727	1,509		
	Nemb	26675,495	2727	9,782		
	Mexemb	10776,955	2727	3,952		
	Pe	254,613	2727	0,093		
Total	Nexcal	52945	2775			
	Nexemb	17289	2775			
	Nemb	80019	2775			
	Mexemb	29326,164	2775			
	Pe	968,453	2775			
Total corrigé	Nexcal	4883,397	2774			
	Nexemb	13754,457	2774			
	Nemb	66378,335	2774			
	Mexemb	23445,161	2774			
	Pe	774,303	2774			

4.2.2. Caractérisation des aptitudes callogènes et embryogènes des hybrides et effet du milieu d'induction par analyse séparée des facteurs

4.2.2.1. Caractérisation des aptitudes callogènes des hybrides

Pour le facteur génotype, d'une année à l'autre, 3 groupes homogènes et stables ont été identifiés (Tableau XXXII). Sur les 2 années d'étude, les groupes ainsi constitués ont tous été stables (CV < 20 %). La première année, les caractéristiques de ces groupes ont été les suivantes :

- le premier groupe, formé du génotype L232-A9, a été caractérisé par une faible callogénèse ;
- le deuxième groupe, constitué du génotype L233-A4 s'est singularisé par callogénèse moyenne.
- le troisième groupe, composé des génotypes L120-A2, L126-A3, C151-61, L231-A4, L330-A9 et SCA6, a exprimé une forte callogénèse.

En somme, des différences significatives ont été observées entre les hybrides testés, alors que celles-ci ont été inexistantes entre les 2 clones témoins utilisés.

La seconde année, les particularités des groupes observés ont été les suivantes :

- le premier groupe, composé du génotype L232-A9, a été marqué par une basse callogénèse.
- le deuxième groupe, incluant les génotypes L233-A4, L120-A2, C151-61, L231-A4, L330-A9 et L126-A3, a été caractérisé par une callogénèse moyenne ;
- le troisième groupe, comprenant le génotype SCA6, s'est distingué par une haute callogénèse.

Ainsi, à l'exception de l'hybride L232-A9, tous les 5 autres hybrides testés ont constitué un groupe homogène. Toutefois, des différences notoires ont été enregistrées entre les 2 clones témoins.

Du point de vue de l'effet de l'explant, pour la callogénèse, au cours de la première année d'étude, ses variations n'ont pu être structurées en classes distinctes en raison de l'inexistence de différences significatives entre l'effet des staminodes et celui des pétales. La seconde année, l'absence de structuration de cet effet est principalement due à la signification de l'interaction entre l'effet des staminodes et celui des pétales cultivés en co-culture (Tableaux XXX et XXXI). Il en va de même de l'effet du milieu d'induction.

4.2.2.2. Caractérisation des aptitudes embryogènes des hybrides

Lorsqu'on considère le génotype, quelle que soit l'année, 3 classes d'embryogenèse ont été observées (Tableau XXXII). Pour la première année, les caractéristiques de ces classes ont été les suivantes :

- la première classe, constituée des hybrides L232-A9, L330-A9 et L233-A4, a été caractérisée par une faible embryogenèse ;
- la deuxième, composée des hybrides L126-A3, L231-A4 et L120-A2, a été marquée par une embryogenèse somatique moyenne ;
- la troisième, formée des clones témoins SCA6 et C151-61, s'est distinguée par une forte embryogenèse somatique.

Les génotypes des 2 premières classes ont révélé des aptitudes embryogènes inconstantes ($CV > 20\%$), alors que celles de la seconde classe ont été stables ($CV < 20\%$).

La seconde année, les 3 classes homogènes identifiées ont été structurées comme suit :

- la première, formée des génotypes L232-A9 et L330-A9, a été marquée par une basse embryogenèse somatique ;
- la deuxième, composée des génotypes L120-A2, L233-A4, L126-A3 et L231-A4, s'est distinguée par une embryogenèse somatique moyenne ;
- la troisième, constituée des génotypes SCA6 et C151-61, a exprimé une haute embryogenèse somatique.

Tous les 6 hybrides testés ont montré des aptitudes embryogènes inconstantes ($CV > 20\%$), tandis que celles des clones témoins constituant les 2 dernières classes ont été stables ($CV < 20\%$). Dans l'ensemble, quelle que soit l'année, des différences statistiques n'ont été notées aussi bien entre les hybrides, qu'entre ceux-ci et les clones témoins. Toutefois, aucune différence statistique n'a été observée entre les clones témoins utilisés.

Pour l'effet de l'explant, quelle que soit l'année, 2 effets perceptibles et distincts ont été observés (Tableau XXXII) :

- le premier, représenté par celui des staminodes, a été marqué par une faible embryogenèse ;
- le second, formé par celui des pétales, s'est distingué par une forte embryogenèse.

Seul l'effet des staminodes de la première année d'expérimentation a été inconstant ($CV > 20\%$).

Du point de vue de l'effet du milieu d'induction, 2 effets distincts et perceptibles ont été observés la seconde année d'expérimentation (Tableau XXXII) :

- le premier, comprenant celui de milieux à faible et moyenne concentrations hormonales (PCG3 et PCG1), a été caractérisé par une basse embryogenèse somatique ;
- le second, incluant celui du milieu à forte concentration hormonale (PCG4), a été marqué par une haute embryogenèse somatique.

4.2.3. Caractérisation des aptitudes callogène et embryogène des clones de géniteurs des hybrides par analyse séparée des facteurs

4.2.3.1. Aptitudes callogènes des clones de géniteurs

Trois groupes callogènes, homogènes et stables ($CV < 20 \%$) ont été identifiés (Tableau XXXIII, inspiré de celui de l'annexe III):

- le premier, composé du géniteur Pa150, a été caractérisé par une basse callogenèse;
- le second, constitué des géniteurs Pa121, IMC67, P19A et Pa13, a été marqué par une haute callogenèse.

Cette classification est cependant différente de celle de leurs descendants hybrides chez lesquels 3 groupes différents ont été obtenus.

4.2.3.2. Aptitudes embryogènes des clones de géniteurs

Trois classes embryogènes homogènes ont été identifiées (Tableau XXXIII, inspiré de celui de l'annexe III):

- la première, incluant les géniteurs Pa121, Pa150 et IMC67, s'est distinguée par une faible embryogenèse ;
- la deuxième, comprenant le géniteur Pa13, s'est singularisée par une embryogenèse moyenne ;
- la troisième, composé du géniteur P19A, a été caractérisée par une forte embryogenèse.

Les géniteurs Pa121, Pa150 ont exprimé une aptitude embryogène instable ($CV > 20 \%$), par contre celle des géniteurs IMC67, Pa13 et P19 a été stable ($CV < 20 \%$). Cette caractérisation est comparable à celle des hybrides chez lesquels 3 groupes distincts ont été obtenus.

Tableau XXXII : Classification de moyennes de callogenèse et d'embryogenèse des hybrides en fonction du génotype, de l'effet de l'explant et du milieu d'induction.

Année	Facteur	Variable dépendante	Variante du facteur	Moyenne transformée*	CV (%)*	Moyenne non transformée			
Année 1	Génotype	Nexcal	L232-A9	1,647 a	8,01 a	2,713			
			L233-A4	2,963 b	4,45 a	8,779			
			L120-A2	3,652 c	3,56 a	13,337			
			C151-61	3,797 c	3,27 a	14,417			
			L126-A3	3,806 c	3,36 a	14,486			
			L231-A4	3,844 c	3,38 a	14,776			
			L330-A9	3,864 c	3,39 a	14,930			
			SCA6	3,930 c	3,21 a	15,445			
			Mexemb	L232-A9	0,000 a	∞ b	0,000		
				L330-A9	0,158 a	57,59 b	0,025		
				L233-A4	0,179 a	51,40 b	0,032		
				L126-A3	0,366 b	24,32 b	0,134		
				L231-A4	0,386 b	23,58 b	0,149		
				L120-A2	0,393 b	22,90 b	0,154		
			Mexemb	SCA6	1,205 c	7,30 a	1,452		
				C151-61	1,335 c	6,44 a	1,782		
				Explant*	Mexemb	St	0,164 a	27,44 b	0,027
						Pt	0,841 b	5,23 a	0,707
	Milieu	Mexemb		PCG4	0,441 a	12,47 a	0,194		
				PCG3	0,527 a	10,44 a	0,278		
			PCG1	0,539 a	10,20 a	0,291			
	Année 2	Génotype	Nexcal	L232-A9	2,878 a	2,40 a	8,283		
				L233-A4	3,963 b	1,72 a	15,705		
				L120-A2	4,132 bc	1,67 a	17,073		
C151-61				4,166 bc	1,46 a	17,356			
L231-A4				4,255 c	1,62 a	18,105			
L330-A9				4,320 c	1,60 a	18,662			
L126-A3				4,392 c	1,57 a	19,290			
SCA6				4,844 d	1,22 a	23,464			
Mexemb				L232-A9	0,004 a	2825,00 b	0,000		
				L330-A9	0,070 a	161,43 b	0,005		
				L120-A2	0,444 b	25,23 b	0,197		
				L233-A4	0,483 b	23,19 b	0,233		
				L126-A3	0,511 b	21,92 b	0,261		
				L231-A4	0,548 b	20,44 b	0,300		
Mexemb				SCA6	2,989 c	3,21 a	8,934		
				C151-61	3,014 c	3,32 a	9,084		
				Explant*	Mexemb	St	0,285 a	19,65 a	0,081
						Pt	1,730 b	3,06 a	2,993
		Milieu	Mexemb	PCG3	0,936 a	7,16 a	0,876		
				PCG1	0,845 a	7,93 a	0,714		
PCG4				1,242 b	5,39 a	1,543			

Légende :

Moyenne transformée* : Les valeurs affectées de la même lettre ne sont pas statistiquement différentes d'après le test de Dunnett T3 et celui de Student-Newman et Keuls au seuil de probabilité 5 %. La première année, les variantes des facteurs explant et milieu n'ont pu être classifiés relativement à la callogenèse à cause de la non signification de l'effet des ces 2 facteurs. De même, la seconde année, ils ne l'ont pas été, cette fois, en raison de l'interaction. **CV (%)* :** Coefficient de variation en pourcentage. Les valeurs suivies de la lettre "a" sont inférieures au seuil 20 %. Celles suivies de la lettre "b" sont supérieures au seuil 20 %. **Explant* :** **St :** Staminodes. **Pt :** Pétales.

4.2.3.3. Caractérisation des aptitudes embryogènes des 13 génotypes par combinaison des facteurs en fonction des descripteurs secondaires

Trois descripteurs secondaires ont été identifiés et utilisés. Il s'agit des aptitudes générales, de l'explant et du milieu d'induction favorables (Tableaux XXXIV et XXXV ; Annexes III et IV). Seules les aptitudes embryogènes ont été prises en compte, car les explants et milieux PCG favorables relativement à la callogénèse n'ont pu être identifiés en raison soit de l'absence de différences, soit de l'interaction. Ainsi, d'une année à l'autre, la meilleure expression des aptitudes embryogènes des hybrides et de leurs géniteurs en fonction des explants et des milieux d'induction a varié. En effet, la première année, seuls les 2 clones témoins se sont mieux exprimés à travers les pétales. La seconde année, chez les hybrides, aucune expression différentielle des aptitudes callogènes ou embryogènes n'a été observée à travers les explants ou les milieux d'induction utilisés. Toutefois, chez les clones témoins, les pétales leur ont permis d'exprimer un meilleur potentiel embryogène. De même, les milieux PCG4 et PCG1 ont révélé une meilleure expression embryogène du clone SCA6. Chez les géniteurs, Pa13 a révélé une meilleure expression à travers les pétales, alors que P19A l'a exprimé au moyen de staminodes.

4.2.4. Ressemblance entre hybrides et géniteurs

Pour analyser la ressemblance entre les hybrides et les géniteurs, leurs aptitudes générales callogènes et embryogènes ont été comparées (Tableaux I et XXXV). De telles comparaisons ont montré que pour 5 croisements sur 6, l'hybride présente une aptitude callogène similaire à celle du géniteur mâle. De même, pour 2 croisements sur 6, l'hybride présente un potentiel embryogène comparable à celui des parents. Par ailleurs, les performances callogènes des hybrides ont été comparables à celles des géniteurs (Figure 19). Les performances callogènes des hybrides L232-A9, L233-A4 et L120-A2 ont été en deçà de celles des deux clones utilisés, alors que celles des hybrides L231-A4, L330-A9 et L126-A3 ont été comparables à celles des ces 2 clones. De même, les performances moyennes embryogènes des 6 hybrides ont été en deçà aussi bien de celles des géniteurs Pa150, IMC67, Pa13 et P19A que de celles des 2 clones témoins utilisés (Figure 20).

Tableau XXXIII : Classification de moyennes de callogénèse et d'embryogénèse des clones de géniteurs.

Variable dépendante	Géniteur	Moyenne transformée*	CV (%)*	Moyenne non transformée
Nexcal	Pa150	3,981 a	3,44 a	15,848
	Pa121	4,409 b	3,02 a	19,439
	IMC67	4,772 bc	2,77 a	22,772
	P19A	4,916 c	2,60 a	24,167
	Pa13	5,078 c	2,38 a	25,786
Mexemb	Pa121	0,000 a	∞ b	0,000
	Pa150	0,595 a	46,72 b	0,354
	IMC67	0,696 a	38,36 b	0,484
	Pa13	1,630 b	15,15 a	2,657
	P19A	2,697 c	9,60 a	7,274

Légende

Moyenne transformée* : Les valeurs suivies de la même lettre dans une colonne ne sont pas significativement différentes selon le test de Student-Newman et Keuls au seuil de probabilité 5 %.

CV (%)* : Les valeurs de coefficients de variation suivies de lettre "a" dans une colonne sont stables au seuil de 20 %. Toutefois, celles affectées par la lettre "b" sont inconstantes au même seuil.

Tableau XXXIV : Caractéristiques des aptitudes callogènes et embryogènes des hybrides par analyse combinée des facteurs durant la première année d'étude.

Génotype	Descripteurs secondaires	Caractéristiques	
		Callogènes	Embryogènes
Hybride			
L232-A9	Aptitudes Générales	Faible mais stable	Nulle et inconstante
	Explants favorables	-	Staminodes ; pétales
	Milieus PCG favorables	-	PCG3
L330-A9	Aptitudes Générales	Bonne et stable	Faible et inconstante
	Explants favorables	-	Staminodes
	Milieus PCG favorables	-	PCG1
L233-A4	Aptitudes Générales	Moyenne et stable	Faible et inconstante
	Explants favorables	-	Pétales
	Milieus PCG favorables	-	PCG1
L231-A4	Aptitudes Générales	Bonne et stable	Faible et instable
	Explants favorables	-	Pétales ; staminodes
	Milieus PCG favorables	-	PCG1
L120-A2	Aptitudes Générales	Bonne et stable	Faible et inconstante
	Explants favorables	-	Pétales
	Milieus PCG favorables	-	PCG4
L126-A3	Aptitudes Générales	Bonne et stable	Faible et inconstante
	Explants favorables	-	Pétales
	Milieus PCG favorables	-	PCG4
Clones			
C151-61	Aptitudes Générales	Bonne et stable	Bonne et stable
	Explants favorables	-	Pétales*
	Milieus PCG favorables	-	PCG1 ; PCG3
SCA6	Aptitudes Générales	Bonne et stable	Bonne et stable
	Explants favorables	-	Pétales*
	Milieus PCG favorables	-	PCG3; PCG4

Tableau XXXV : Caractéristiques des aptitudes callogènes et embryogènes des hybrides et des géniteurs par analyse combinée des facteurs au cours de la seconde année d'étude

Génotype	Descripteurs secondaires	Caractéristiques	
		Callogènes*	Embryogènes*
Géniteur			
Pa121	Aptitudes Générales	Bonne et stable	Nulle et inconstante
	Explants favorables	Pétales	Staminodes
	Milieus PCG favorables	PCG1 ; PCG3	PCG1 ; PCG3
Pa150	Aptitudes Générales	Faible mais stable	Faible et inconstante
	Explants favorables	Pétales; staminodes	Pétales; staminodes
	Milieus PCG favorables	PCG1 ; PCG3	PCG1
IMC67	Aptitudes Générales	Bonne et stable	Faible et inconstante
	Explants favorables	Staminodes	Pétales
	Milieus PCG favorables	PCG3 ; PCG1	PCG3 ; PCG1
Pa13	Aptitudes Générales	Bonne et stable	Moyenne et stable
	Explants favorables	Staminodes	Pétales*
	Milieus PCG favorables	PCG1 ; PCG3	PCG3 ; PCG1
P19A	Aptitudes Générales	Bonne et stable	Bonne et stable
	Explants favorables	Pétales ; staminodes	Staminodes*
	Milieus PCG favorables	PCG1	PCG1 ; PCG3
Hybride			
L232-A9	Aptitudes Générales	Faible mais stable	Faible et inconstante
	Explants favorables	-	Staminodes ; pétales;
	Milieus PCG favorables	-	PCG4
L330-A9	Aptitudes Générales	Moyenne et stable	Faible et inconstante
	Explants favorables	-	Staminodes; pétales
	Milieus PCG favorables	-	PCG4; PCG1
L233-A4	Aptitudes Générales	Moyenne et stable	Moyenne mais inconstante
	Explants favorables	-	Pétales
	Milieus PCG favorables	-	PCG3; PCG4
L231-A4	Aptitudes Générales	Moyenne et stable	Moyenne et inconstante
	Explants favorables	-	Pétales
	Milieus PCG favorables	-	PCG4
L120-A2	Aptitudes Générales	Moyenne et stable	Moyenne et inconstante
	Explants favorables	-	Pétales
	Milieus PCG favorables	-	PCG4
L126-A3	Aptitudes Générales	Moyenne et stable	Moyenne et inconstante
	Explants favorables	-	Staminodes
	Milieus PCG favorables	-	PCG4
Clone			
C151-61	Aptitudes Générales	Moyenne et stable	Moyenne et stable
	Explants favorables	-	Pétales*
	Milieus PCG favorables	-	PCG4 ; PCG3
SCA6	Aptitudes Générales	Bonne et stable	Bonne et stable
	Explants favorables	-	Pétales*
	Milieus PCG favorables	-	PCG4*; PCG1*

Légende

Caractéristiques callogènes et embryogènes (Annexes III et IV) * : Pour la callogenèse, la première et la seconde année d'expérimentation, aucune classification des effets combinés explant et milieu d'induction n'a pu être réalisée, car ces 2 facteurs ont été interactifs. Pour l'embryogenèse, les explants et les milieux d'induction affectés d'un astérisque (*) donnent la meilleure réponse. L'effet des explants et des milieux d'induction ont été rangés dans les cases du tableau dans l'ordre décroissant.

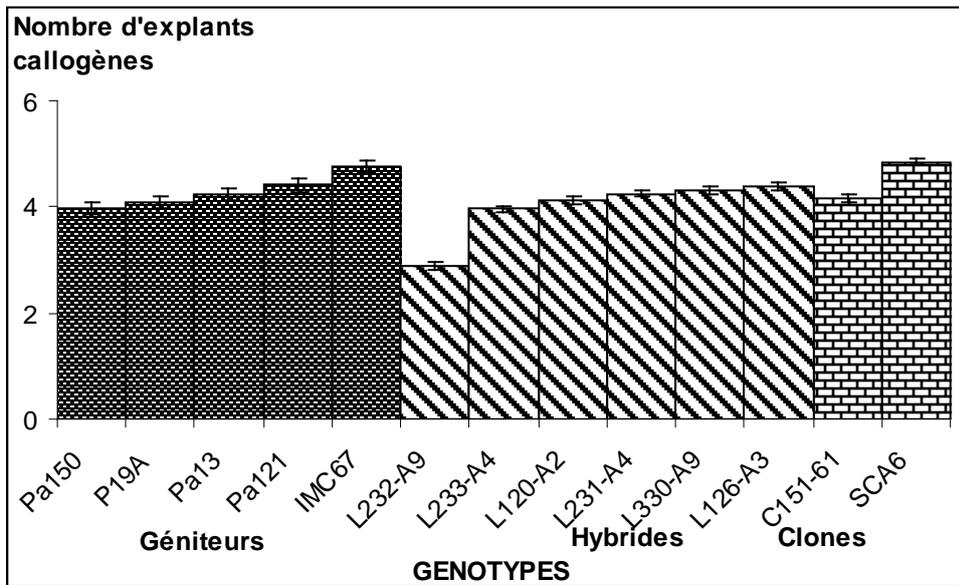


Figure 19 : Relation entre les performances moyennes callogènes des hybrides et des géniteurs.

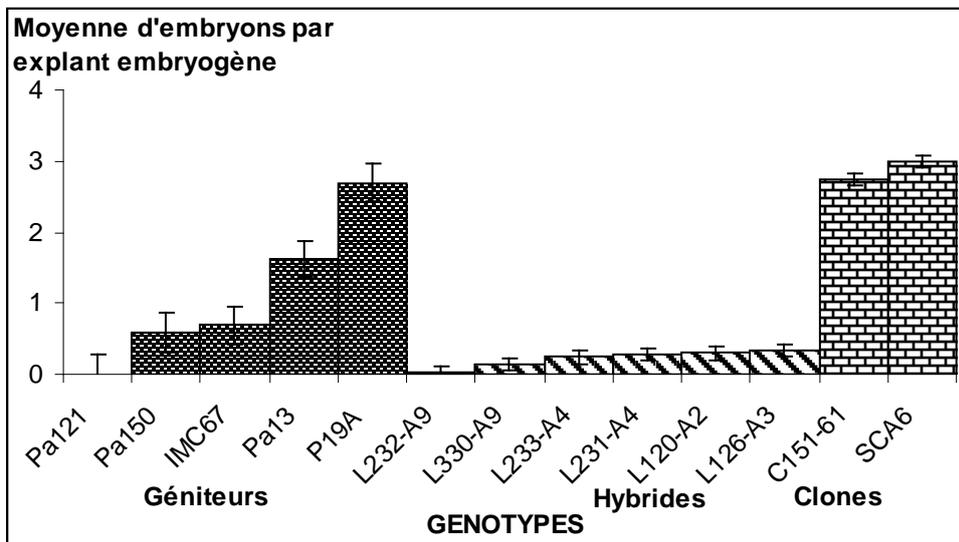


Figure 20 : Relation entre les performances moyennes embryogènes des hybrides et des géniteurs.

4.2.5. Influence réciproque entre les staminodes et pétales en culture mixte

Pour analyser l'influence réciproque entre les staminodes et les pétales en co-culture, l'interaction entre les 2 explants a été testée à travers l'analyse de variance (Tableau XXXVI; Figures 21 et 22). Les résultats ont indiqué que le nombre d'explants callogènes et la moyenne d'embryons produits par explant embryogène ne sont pas discriminants pour structurer les variantes de la Disposition d'explants en classes distinctes ($P / Nexcal = 0,273$; $P / Mexemb = 0,178$). Cependant, ces 2 descripteurs sont assez discriminants pour structurer les variantes du type d'explant en 2 classes distinctes ($P / Nexcal = 0,000$; $P / Mexemb = 0,000$). L'analyse de l'interaction montre que la variation du nombre d'explants callogènes est dépendante de la variation simultanée du type d'explant et celle de leur disposition ($P / Nexcal = 0,005$). Par contre la variation de la moyenne d'embryons obtenus par explant embryogène est indépendante de la variation concomitante de la disposition et de la nature de l'explant ($P / Mexemb = 0,301$).

En tenant compte de cette interaction, la moyenne d'embryons produits par explant embryogène (Mexemb) a été utilisée pour structurer les variantes de l'effet de l'explant. Ce descripteur a été utilisé également pour structurer les variantes de la combinaison entre la disposition d'explants et leur nature. Cette combinaison est en réalité l'expression de l'interaction staminode x pétale.

4.2.5.1. Caractérisation du potentiel embryogène des explants et des variantes de la combinaison explant et disposition

Les caractéristiques décrites lors de l'analyse séparée des facteurs ont été confirmées ici. De fait, 2 effets distincts des explants mis en culture ont été identifiés (Tableau XXXVII).

- le premier, représenté par l'effet des staminodes, s'est singularisé par une faible embryogenèse ;
- le second, formé par l'effet des pétales, a été caractérisé par une forte embryogène.

De façon grossière, aucun effet significativement distinct n'a été enregistré aussi bien entre les 2 dispositions testées (vrac et cis) qu'entre ces dispositions testées et la disposition témoin utilisée (trans ; Tableau XXXVII). Toutefois, de façon plus fine, 3 classes distinctes ont été notées en considérant le type d'explant de chacune des 3 dispositions (Tableau XXXVIII) :

- la première classe, représentée par l'effet des staminodes des 3 dispositions, a été marquée par une embryogenèse nulle ;
- la deuxième classe, traduite par l'effet des pétales des 2 dispositions testées (vrac et cis), a été caractérisée par embryogenèse moyenne.
- la troisième classe, incluant uniquement l'effet des pétales de la disposition trans, s'est singularisée par une haute embryogenèse.

Dans l'ensemble, il n'a existé aucune différence significative entre l'effet des staminodes des 2 dispositions testées et celui de la disposition témoin (trans). De même, aucune différence tangible n'a été observée entre l'effet des pétales des 2 dispositions testées (vrac et cis). Cependant, des différences significatives ont été enregistrées entre l'effet des pétales des 2 dispositions testées (vrac et cis) et celui de la disposition témoin (trans).

Tableau XXXVI : Examen des effets individuels et de l'interaction entre les facteurs explant et disposition à travers l'analyse de variance.

Source	Variable dépendante*	SCE * type III	ddl *	CM *	F *	P *
Modèle corrigé	Nexcal	22,433	5	4,487	15,266	0,000
	Mexemb	431,388	5	86,278	98,132	0,000
Constante	Nexcal	8486,982	1	8486,982	28876,815	0,000
	Mexemb	420,964	1	420,964	478,802	0,000
Disposition	Nexcal	0,766	2	0,383	1,303	0,273
	Mexemb	3,050	2	1,525	1,735	0,178
Explant	Nexcal	16,256	1	16,256	55,311	0,000
	Mexemb	412,667	1	412,667	469,365	0,000
Disposition x Explant*	Nexcal	3,174	2	1,587	5,399	0,005
	Mexemb	2,120	2	1,060	1,205	0,301
Erreur	Nexcal	87,583	298	0,294		
	Mexemb	262,002	298	0,879		
Total	Nexcal	8784,000	304			
	Mexemb	1320,536	304			
Total corrigé	Nexcal	110,016	303			
	Mexemb	693,391	303			

Légende :

Variables dépendantes transformées*: **Nexcal :** Nombre d'explants callogènes. **Mexemb :** Moyenne d'embryons par explant embryogène. **SCE :** Somme des carrés des écarts. **ddl :** Nombre des degrés de liberté. **CM :** Carrés moyens. **F :** Rapport du carré moyen factoriel sur le carré moyen résiduel. **Disposition x Explant* :** Interaction correspondant à l'interaction staminode x pétale. Elle est significative pour la variable de la callogénèse, alors qu'elle ne l'est pas pour celle de l'embryogénèse somatique. Une telle signification des effets interactifs interdit la structuration en classes homogènes des variantes des facteurs explant et disposition. Elle explique aussi la non structuration des variantes du facteur explant relativement à la variable de callogénèse, précédemment rapportée (Tableaux XXVIII et XXIX).

Tableau XXXVII : Classification de moyennes d'embryogénèse en fonction de l'effet des explants et de leur disposition sur le milieu d'induction.

Facteurs	Variable dépendante	Variante de facteur*	Moyenne transformée*	CV (%)	Moyenne non transformée
Explant	Mexemb	St	0,012 a	700,00	0,000
		Pt	2,392 b	2,97	5,722
Disposition		Cis	0,743 a	8,75	0,552
		Vrac	0,766 a	8,49	0,587
		Trans	0,895 a	6,82	0,801

Légende :

Variante de facteur* : **St :** Staminodes. **Pt :** Pétales. **Moyenne transformée* :** les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Student-Newman et Keuls et celui de Dunnett T3 au seuil de confiance 95 %.

Tableau XXXVIII : Classification des moyennes d'embryogenèse en fonction de variantes de la combinaison du type et de la disposition des explants sur le même milieu d'induction.

Variable dépendante	Combinaison Explant / Disposition	Moyenne transformée	CV (%)*	Moyenne non transformée
Mexemb	St_Cis	0,000 a	∞	0,000
	St_Vrac	0,000 a	∞	0,000
	St_Trans	0,024 a	400,00	0,001
	Pt_Cis	1,486 b	5,65	2,208
	Pt_Vrac	1,532 b	5,61	2,347
	Pt_Trans	1,766 c	4,19	3,119

Légende

Moyenne transformée* : Les moyennes suivies de la même lettre dans une colonne ne sont pas significativement différentes selon le test de Dunnett T3 au seuil de confiance 5 %. **CV (%)*** : Coefficient de variation. **∞** : Valeur infinie du coefficient de variation. **Cis** : Staminodes et pétales disposés en lots de part et d'autre dans la même boîte de Pétri. **Vrac** : Staminodes et pétales disposés en mélange sur le même milieu dans la même boîte de Pétri. **Trans** : Staminodes et pétales séparés et disposés dans des boîtes de Pétri distinctes.

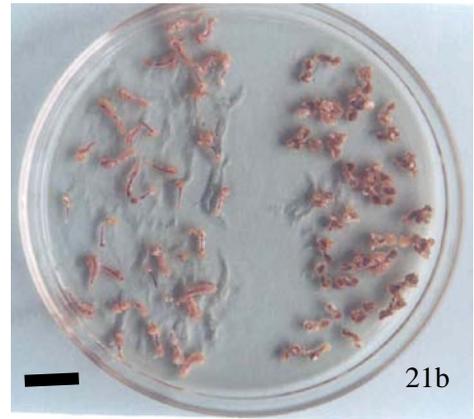


Figure 21 : Dispositif d'évaluation de l'influence réciproque entre les staminodes et les pétales cultivés sur le même milieu d'induction PCG3. Ici, la croissance des explants callogènes primaires du génotype C151-61 selon les 3 dispositions vrac, cis et trans au 14^e jour, a été illustrée. 21a, explants callogènes de staminodes et de pétales de la disposition vrac. 21b, explants callogènes de staminodes et de pétales de la disposition cis. 21c, explants callogènes de pétales de la disposition trans (Témoin absolu positif). 21d, explants callogènes de staminodes de la disposition trans (Témoin absolu négatif). 1 barre = 1,769 cm. Photos ISSALI).

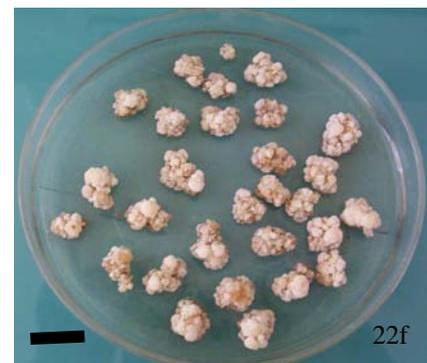
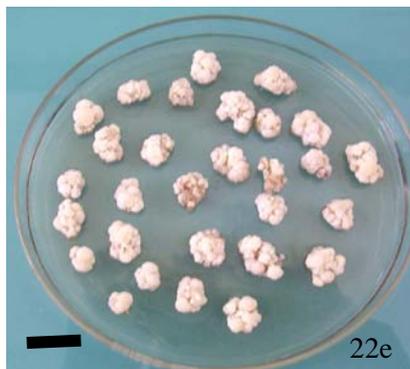
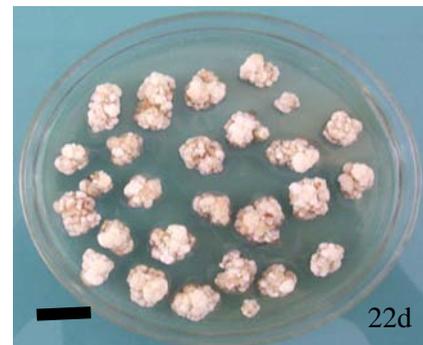
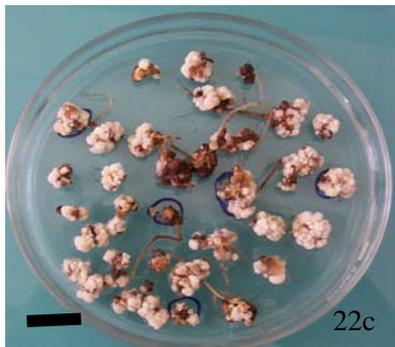
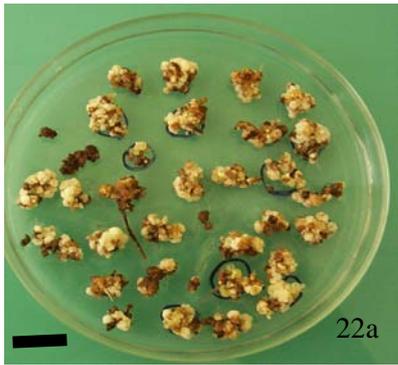


Figure 22 : Dispositif d'évaluation de l'influence réciproque entre les staminodes et les pétales cultivés sur le même milieu d'induction PCG3. Ici, le devenir des cals du génotype C151-61 au 3^e mois sur le milieu de développement d'embryons ED a été illustré. 22a, cals de pétales de la disposition Vrac. 22b, cals de pétales de la disposition Cis. 22c, cals de pétales de la disposition Trans (Témoin absolu positif). 22d, cals de staminodes de la disposition (Témoin absolu négatif). Vrac. 22e, cals de staminodes de la disposition Cis. 22f, cals de staminodes de la disposition Trans (1 barre = 2,09 cm. Photos ISSALI).

SECTION 4

DISCUSSION, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION

Trois principales méthodes d'optimisation de l'embryogenèse somatique en fonction des paramètres climatiques, phénologiques et génétiques ont été étudiées. Treize génotypes, 2 types d'explants et 3 milieux d'induction PCG1, PCG3 et PCG4 ont été utilisés. Nos résultats portant sur l'analyse de l'influence du climat sur l'embryogenèse somatique ont montré que, sur 7 paramètres climatiques initiaux, seuls la pluviosité, la température maximale, la température minimale, les écarts de température et l'insolation présentent une meilleure variation. Ces 5 paramètres ont été organisés en intervalles de temps appelés périodes. Parmi les 5 paramètres climatiques, seule la température minimale a enregistré une variation concordante relativement à l'embryogenèse, d'une année à l'autre. La première année, seulement 2,20 % des variations de l'embryogenèse sont attribuables à la température minimale, aux écarts de température et à l'insolation. Donc, nous avons montré que le climat influence très faiblement l'embryogenèse somatique chez le cacaoyer. A ce jour, aucune étude n'a rapporté l'analyse de l'influence du climat sur l'embryogenèse. Néanmoins, Esan (1975), Li *et al.*, (1998) ainsi que Tan et Furtek (2003) ont juste soupçonné l'existence de cette influence. Au terme de nos études, une période favorable incluant les mois de mai, août et septembre et susceptible d'optimiser l'embryogenèse somatique a été identifiée.

Pour la phénologie, seuls les niveaux de floraison et de fructification ont varié significativement d'une année à l'autre. Ils ont été retenus pour être structurés par la suite en intervalles de temps appelés classes phénologiques stables. De ces 2 paramètres, seul le niveau de floraison a fourni 2 classes phénologiques distinctes la première année d'étude. La première année d'étude, 1,40 % des fluctuations de l'embryogenèse ont été imputables au niveau de fructification. La deuxième année, 6,90 % des variations de l'embryogenèse ont été dues aux niveaux de floraison et de fructification. Donc, la phénologie influence aussi très peu l'embryogenèse somatique. Ici également, aucune étude, à notre connaissance, n'a rapporté l'analyse de l'influence de la phénologie sur l'embryogenèse somatique. Néanmoins, Augé *et al.*, (1984) ont signalé la variation de la réponse des explants cultivés *in vitro* en fonction de leur stade de développement. Aucune classe phénologique capable d'optimiser l'embryogenèse n'a été identifiée.

L'analyse simultanée de l'influence du climat et de la phénologie sur l'embryogenèse a été réalisée. Pour la première année, cette analyse a montré que les écarts de température et

le niveau de fructification expliquent 2,80 % des fluctuations de l'embryogenèse. La deuxième année, 8,40 % des variations de l'embryogenèse sont causées par les écarts de température, les niveaux de floraison et de fructification. Le climat et la phénologie influencent très peu l'embryogenèse somatique chez le cacaoyer. En conséquence, les périodes et les classes propices précédemment identifiées ne pourraient pas être recommandées pour optimiser l'embryogenèse somatique.

L'influence du génotype sur la callogenèse et l'embryogenèse a été analysée simultanément avec celle de l'explant et du milieu d'induction. Pour cela, les aptitudes callogènes et embryogènes des 13 génotypes ont été caractérisées par analyse séparée et combinée des facteurs. Quelques travaux (Adu-Ampomah *et al.*, 1988 ; Li *et al.*, 1998 ; Maximova *et al.*, 2002) ont rapporté la caractérisation des aptitudes callogènes et embryogènes de quelques génotypes de cacaoyer par analyse séparée des facteurs. Néanmoins, ces caractérisations paraissent incomplètes, donc difficilement exploitables pour les études ultérieures de callogenèse et d'embryogenèse. Les caractérisations proposées ici paraissent complètes. Car elles représentent une réponse adaptée à la variabilité exprimée par le génotype en fonction de la nature de l'explant et du milieu d'induction. Pour la callogenèse, il existe une influence réciproque avérée entre les staminodes et les pétales en co-culture. Cependant, cette influence est inexistante pour l'embryogenèse somatique. En conséquence, aucune disposition d'explants vrac ou cis testées ne s'est montrée plus embryogène que l'autre.

1. Influence de 5 paramètres climatiques sur l'embryogenèse somatique

Sur l'ensemble des 7 paramètres climatiques, l'humidité relative a été la moins variable. Elle a été éliminée dans la suite de l'étude. Une telle absence de variation pourrait être due aux faibles variations de température et de l'éclairement en basse Côte d'Ivoire. Celles-ci semblent maintenir l'humidité de l'air toujours proche de la saturation. Sur les 6 paramètres climatiques restants, seuls la température minimale, les écarts de température, la température maximale, la pluviosité et l'insolation ont été les plus variables.

La structuration de la variation, des meilleurs paramètres climatiques, selon les mois, en groupes homogènes n'a pas permis de les assimiler à des périodes climatiques stables. Leur effectif pléthorique explique une telle difficulté. C'est la combinaison de la comparaison de la moyenne mensuelle à la moyenne annuelle et de la comparaison du coefficient de

variation au seuil 20 % qui a permis l'identification des périodes stables. Ainsi, la première année d'étude, chaque paramètre climatique représentatif a engendré 2 périodes stables et distinctes. La deuxième année d'expérimentation, seules la pluviosité, la température maximale et l'insolation ont produit 2 périodes distinctes et stables. En dépit de leur absence de variation, les effets des paramètres climatiques ne sont pas toujours similaires d'une année à l'autre. Un tel défaut de similitude des effets du climat demeure néanmoins compatible avec la vie des êtres vivants en général, et celle du cacaoyer en particulier (Encyclopédie Encarta, 2006 ; Mossu, 1990).

Les cycles phénologiques sont la résultante de l'effet des signaux des paramètres climatiques. Ces signaux découlent de la variation brutale des paramètres climatiques (Augé *et al.* 1984). La perception et la conversion de ces signaux par la plante produisent des stimuli qui orientent la morphogenèse (Augé *et al.* 1984). La morphogenèse est l'ensemble des processus qui régissent le développement des organes et des structures tissulaires d'un organisme vivant (Encyclopédie Encarta, 2006).

L'organisation en périodes des paramètres a permis d'analyser la variation de l'embryogenèse en leur sein. Cette organisation en périodes a confirmé le constat fait précédemment sur la variation relativement faible des observations climatiques. Car, quels que soient l'année et le paramètre climatique considéré, le nombre de périodes identifiées n'a pas dépassé 2. Certaines périodes climatiques ont été propices, d'autres défavorables à l'embryogenèse somatique.

L'analyse du sens de variation de chaque période relativement au pourcentage d'embryogenèse a mis en relation le climat et l'embryogenèse somatique. La première année, la pluviosité, la température maximale et l'insolation ont enregistré une variation opposée relativement à celle du pourcentage d'embryogenèse. A notre connaissance, aucune étude n'a rapporté de tels résultats. Néanmoins, la mise en évidence de cette relation n'a pas permis de quantifier le poids de ces paramètres sur la variation de l'embryogenèse somatique. Pour cela, le coefficient de détermination R^2 de la régression linéaire l'a permis. En conséquence, la relation entre les périodes climatiques et l'embryogenèse somatique seule ne suffit pas pour mesurer la part de variations de l'embryogenèse somatique attribuable au climat.

Les écarts de température constituent le paramètre le plus corrélé à l'embryogenèse somatique ($b / E_{tm} = -0,403$). En effet, la valeur du coefficient de régression dépend

de l'intensité de la liaison existant entre 2 paramètres corrélatifs (Baradat, 1982). En conséquence, ces résultats ont montré l'existence d'une hiérarchie d'intensité de liaison entre les paramètres climatiques et l'embryogenèse somatique. Ainsi, les écarts de température sont le premier paramètre le plus fortement corrélé à l'embryogenèse. La température minimale et l'insolation viennent respectivement en deuxième et troisième position. Cette hiérarchie suggère que les écarts de température peuvent être utilisés préférentiellement pour analyser l'influence du climat sur l'embryogenèse.

Dans les équations de droites de régression, l'absence de variation des paramètres climatiques semble élever l'embryogenèse somatique. Ce constat est confirmé par la différence existant entre le nombre d'embryons somatiques produits durant les 2 années d'étude. En effet, la première année qui a été relativement la plus variable a enregistré 2114 embryons somatiques. Cependant la seconde année qui a été la moins variable a enregistré 8643 embryons somatiques. Ce résultat suggère que la production d'embryons somatiques s'accommode bien de l'absence de variation des paramètres climatiques. Donc, la connaissance préalable des caractéristiques climatiques annuelles pourrait promouvoir l'embryogenèse somatique. Pour cela, les prévisions météorologiques pourraient aider à la connaissance des années les moins variables.

La contribution des écarts de température, de la température minimale et de l'insolation à la variation de l'embryogenèse somatique a été faible ($R^2 / \text{Année 1} = 2,20 \%$). L'hypothèse d'un décalage entre l'effet des signaux climatiques et les réponses physiologiques subséquentes du cacaoyer pourrait expliquer une telle faiblesse. Cette hypothèse est confortée par les travaux de Allou (1996) sur la production du palmier à huile qui a montré, qu'en Côte d'Ivoire, la production au 28^e mois est déterminée par le déficit hydrique ayant prévalu 27 mois plus tôt. Nous avons constaté aussi que le pourcentage d'embryogenèse somatique augmentait au troisième mois suivant le mois ayant enregistré l'humidité relative la plus élevée. Tan et Furtek (2003) ont constaté sur le cacaoyer que les explants floraux collectés et cultivés au commencement de la saison de pluie, spécialement après une période de saison sèche prolongée, tendent à avoir une haute efficacité en embryogenèse. Par ailleurs, les explants d'un même génotype cultivés le même jour et se trouvant dans la même boîte de Pétri n'ont pas le même potentiel embryogène (Alemanno, 1995). A côté de quelques explants embryogènes

cultivés sur un même milieu, existent d'autres qui ne le sont pas. La conception d'une matrice de données n'est pas facile en raison du nombre relativement élevé des observations non favorables. En conséquence, la qualité de l'ajustement R^2 entre les données et la courbe décrite par le modèle ne peut qu'être faible. La faiblesse de l'influence du climat sur l'embryogenèse compromet l'utilisation des périodes propices précédemment identifiées pour optimiser l'embryogenèse.

2. Influence des 3 paramètres phénologiques sur l'embryogenèse somatique

Le rythme des poussées foliaires a été le paramètre le moins variable d'une année à la suivante. Il a été exclu de la suite de l'étude. L'absence de variations de ce paramètre pourrait être due à sa trop forte sensibilité aux faibles variations climatiques, principalement celles de l'insolation (Tableau XXVI). Cette trop forte sensibilité semble maintenir les valeurs observées à des niveaux sensiblement comparables. Ceci, non seulement au cours de l'année, mais également d'une année à l'autre. Par ailleurs, ici également il n'a pas été possible d'assimiler les groupes homogènes issus de la structuration de la variation des 2 paramètres restants en classes phénologiques stables. La difficulté d'assimilation est due au nombre pléthorique de ces groupes (Tableau XX). Ce sont les classes phénologiques mensuelles, équivalant des périodes climatiques qui ont permis d'établir des corrélations avec l'embryogenèse somatique. En dehors du niveau de floraison de la première année qui a fourni 2 classes phénologiques distinctes, le niveau de fructification n'a pas varié, d'une année à l'autre. De fait, les paramètres phénologiques varient très peu comme les paramètres climatiques. Bien que le niveau de floraison ait produit 2 classes distinctes la première année, son lien avec l'embryogenèse n'a pas été significatif. Donc, pour les 3 paramètres phénologiques aucun intervalle de temps ne peut être proposé pour optimiser l'embryogenèse somatique.

Le paramètre phénologique le plus fortement lié à l'embryogenèse a varié d'une année à l'autre. En effet, la première année d'expérimentation, le niveau de fructification a été le seul lié à l'embryogenèse somatique ($b / \text{Nivfru} = 0,012$). Par contre la seconde année, c'est le niveau de floraison qui a enregistré le plus fort coefficient de régression partielle ($b / \text{Nivflo} = 0,302$). En effet, la valeur du coefficient de régression dépend de l'intensité de la liaison existant entre 2 paramètres corrélatifs (Baradat, 1982). Une telle variation de l'intensité de liaison entre l'embryogenèse et la phénologie traduit la complexité du

phénomène étudié. Elle montre aussi la sensibilité des gènes régissant la phénologie du cacaoyer relativement aux variations de l'environnement (Braudeau, 1969; Mossu, 1990).

Les modèles linéaires des 2 années d'étude n'ont pas été similaires. Toutefois, le niveau de fructification est commun aux 2 modèles. Donc, il influence l'embryogenèse somatique, quand bien même une telle influence serait faible. Le défaut de similitude de modèles pourrait être dû également à la sensibilité du cacaoyer aux faibles variations de l'environnement d'une année à l'autre.

De façon générale, le signe du coefficient de régression a été positif pour l'ensemble des paramètres phénologiques. Donc, l'embryogenèse somatique paraît élevée, quand les niveaux de floraison et de fructification le sont.

La contribution des paramètres phénologiques à la variation de l'embryogenèse somatique a été aussi faible (R^2 / phénologie / année 1 = 1,40 % ; R^2 / phénologie / année 2 = 6,90 %). Ces faibles valeurs de la qualité de l'ajustement de la phénologie avec l'embryogenèse sont comparables à celles du climat (R^2 / climat / année 1 = 2,20 % ; R^2 / climat / année 2 = 0,00 %). Pour le climat, la faiblesse de la qualité de l'ajustement a été justifiée essentiellement par le décalage existant entre l'effet des signaux climatiques et la réponse physiologique. Pour la phénologie, ces faibles valeurs de l'ajustement pourraient être dues à la trop faible quantité des métabolites secondaires responsables des rythmes phénologiques et impliqués dans l'expression de l'embryogenèse. Car, plus de 98,80 % de variations de l'embryogenèse ne sont pas expliquées par la phénologie. Ceci témoigne de la complexité des facteurs potentiellement impliqués dans l'expression embryogène chez le cacaoyer.

3. Influence simultanée des paramètres climatiques et phénologiques sur l'embryogenèse somatique

D'une année à l'autre, les modèles linéaires prédictifs de l'évolution de l'embryogenèse n'ont pas été identiques. En effet, la première année, les écarts de température et le niveau de fructification ont formé le modèle linéaire. A l'opposé, la deuxième année d'expérimentation aucun paramètre climatique n'a exercé un effet sur la variation de l'embryogenèse. Leur association avec les paramètres phénologiques a montré que les écarts de température, les niveaux de fructification et de floraison ont exercé une influence évidente sur de

l'embryogenèse somatique. S'il n'existe pas de modèle linéaire identique d'une année à l'autre, il existe néanmoins des paramètres communs aux 2 modèles linéaires. Il s'agit des écarts de température et du niveau de fructification. Leurs effets sur l'embryogenèse somatique ont été relativement évidents. Ainsi, les signaux générés par les écarts de température pourraient favoriser la synthèse des substances de croissance que sont les gibbérellines et les analogues structuraux de l'auxine. Celles-ci contrôlent la croissance des fruits (Heller *et al.* 1995). A ce jour, aucune étude n'a rapporté ces faits. Les travaux de Alemanno (1995) ont montré que l'auxine chez le cacaoyer est indétectable à l'initiation de culture. En somme, les écarts de température pourraient jouer un rôle relativement important dans la synthèse des métabolites impliqués dans la morphogenèse embryogène.

De façon générale, le signe des coefficients de régression des paramètres climatiques a été négatif, tandis que celui des paramètres phénologiques a été positif. Donc, l'embryogenèse somatique semble élevée quand les paramètres climatiques sont faibles. Par contre cette embryogenèse paraît élevée quand les paramètres phénologiques sont élevés. Le signe des coefficients de régression ne traduit qu'une simple indication sur le sens de variation des paramètres climatiques et phénologiques relativement à l'embryogenèse.

Sur l'ensemble des paramètres climatiques et phénologiques, les écarts de température ont enregistré les coefficients de régression partielle les plus élevés en valeur absolue, d'une année à l'autre ($b / E_{tm} / \text{Année 1} = 0,241$; $b / E_{tm} / \text{Année 2} = 0,517$). Une telle élévation des coefficients de régression partielle indique une forte intensité de liaison entre l'embryogenèse et ce paramètre climatique. En conséquence, il pourrait être préférentiellement utilisé pour analyser de façon fine à la fois les effets de la phénologie et du climat sur l'embryogenèse somatique.

Quelle que soit l'année, l'insolation n'a exercé aucun effet sur l'embryogenèse somatique. Sa relation avec l'embryogenèse a montré un sens de variation contraire, d'une année à l'autre. En effet, si la première année la période de faible insolation (I_1) a correspondu à une embryogenèse somatique élevée, la seconde année cette même période a été en liaison avec une faible embryogenèse. Ce sens de variation opposé pourrait expliquer l'absence de l'insolation dans les équations des modèles linéaires identifiés. Cette absence d'effets de l'insolation pourrait être due à la nature de ses mesures. Car les

mesures enregistrées journalièrement sont essentiellement qualitatives plutôt que quantitatives. En effet, à partir de 60 Wm^{-2} , le diagramme enregistreur de l'héliographe reste indifférent à l'augmentation de l'intensité lumineuse. Donc, l'héliographe ne mesure pas l'intensité lumineuse. En conséquence, l'insolation mesurée comme la durée d'éclairement exprimée en heures / jour ne permet pas d'évaluer l'effet de la lumière sur l'embryogenèse somatique. Même la puissance lumineuse mesurée en lux ne pourrait pas mesurer cet effet. Car ce lux dépend de la physiologie de l'œil humain. Il est inadapté aux besoins de la plante (Augé *et al.* 1984). Cependant, un photo-détecteur captant et convertissant en tension les photons lumineux pourrait le faire convenablement.

La contribution simultanée des paramètres climatiques et phénologiques à la variation de l'embryogenèse est demeurée également faible. En effet, la première année d'expérimentation, la part de la variation de l'embryogenèse somatique expliquée par les paramètres climatiques et phénologiques a été de 2,80 %. Donc, 97,20 % des variations de l'embryogenèse somatique dépendent d'autres facteurs. De même, la deuxième année d'expérimentation, seulement 8,40 % des fluctuations de l'embryogenèse somatique ont été d'origine climatique et phénologique. En conséquence, 91,60 % des fluctuations de l'embryogenèse somatique ne dépendent pas du climat et de la phénologie. Ces faibles valeurs de R^2 peuvent s'expliquer par la complexité des facteurs potentiellement impliqués dans l'expression embryogène. Elles peuvent également s'expliquer par la difficulté à traduire en chiffres les phénomènes biologiques. Ces résultats indiquent, dans l'ensemble, que l'embryogenèse somatique chez le cacaoyer est très peu influencée par le climat et la phénologie. En conséquence, les périodes climatiques et classes phénologiques propices à l'embryogenèse, précédemment identifiées, ne pourraient pas être recommandées pour optimiser l'embryogenèse. Donc, les cultures peuvent être réalisées toute l'année, sans tenir compte de la période ou de l'état physiologique de l'arbre.

L'absence de variation simultanée des paramètres climatiques et phénologiques favorise l'embryogenèse somatique, d'une année à l'autre. Ces résultats concordants pourraient être dus à la correspondance entre les signaux climatiques et l'amplification de l'expression de gènes des rythmes phénologiques et ceux d'embryogenèse. Ces rythmes phénologiques pourraient être contrôlés par certains gènes tels que ceux régissant l'expression embryogène chez le cacaoyer. Il s'agit de *Theobroma cacao* Somatic Embryogenesis Receptor Like Kinase (*Tc*

SERK) et de Leafy cotyledon (*LEC*). Le gène *Tc SERK* joue un rôle important dans l'induction de l'embryogenèse somatique, le maintien du statut répétitif des cals et de façon générale dans le métabolisme du cacao (Santos *et al.*, 2005). Cependant, si ce gène est faiblement activé dans les feuilles, il l'est plus dans les cals embryogènes, les secteurs secondaires répétitifs des cals embryogènes, les embryons zygotiques et somatiques matures. A l'opposé, son fonctionnement est inhibé dans les racines, les staminodes et les pétales (Santos *et al.* 2005). De telles activation et inhibition pourraient être régulées par l'épigénétique (Démarchy, 1977). Cet épigénétique est essentiellement constitué de la population moléculaire environnant le gène. Ainsi, pour les staminodes et les pétales, ce gène serait activé quand ces explants sont cultivés. Pour le gène *LEC*, il joue le rôle de régulateur central de l'embryogenèse somatique (Montoro *et al.* 2005).

Par ailleurs, l'examen de l'influence simultanée des paramètres climatiques et phénologiques sur l'embryogenèse somatique reflète mieux la réalité que l'analyse isolée de ces paramètres. Car dans la nature les éléments du climat et de la phénologie n'agissent pas de façon isolée.

3.1. Pertinence et suffisance des conclusions tirées à partir des données collectées sur 2 années d'étude

Les données collectées sur 2 années d'étude paraissent pertinentes et suffisantes pour tirer des conclusions fiables. En effet, quelle que soit la nature de la matrice de données utilisée, la part de la variation de l'embryogenèse attribuable au climat et à la phénologie n'a pas excédé 14 %. Ce résultat suggère que les données de 4, 7 ou 10 années ne pourraient pas améliorer significativement la qualité de l'ajustement R^2 . Cette faiblesse de R^2 semble tenir à la complexité du phénomène étudié. Elle s'explique aussi par la nature intrinsèque du phénomène d'embryogenèse pour lequel le cacaoyer est reconnu récalcitrant (Alemanno *et al.* 2003). La récalcitrance a été définie par Benson (2000) comme l'inaptitude des cellules, tissus et organes végétaux à répondre facilement à la culture des tissus. Par conséquent, nos conclusions sur les données collectées sur 2 années paraissent suffisantes et acceptables.

4. Relations entre le climat et la phénologie

D'une année à l'autre, la structuration des paramètres climatiques et phénologiques a été différente. Le nombre de groupes et dans une certaine mesure leur composition ont été différents. Néanmoins, la phénologie reste liée au climat (Tableau XXVI). Donc, les signaux

climatiques ont déterminé les variations des rythmes phénologiques. Certaines manifestations phénologiques sont spécifiquement dues à des paramètres climatiques précis (Braudeau, 1969; Mossu, 1990).

D'une année à l'autre, la structuration de certains groupes a été comparable. C'est le cas de la température maximale qui a influencé aussi bien les niveaux de floraison et fructification que le rythme des poussées foliaires. De même, l'insolation a expliqué le rythme des poussées foliaires. A l'opposé, celle d'autres groupes ne l'a pas été. En effet la première année, la température minimale a expliqué les niveaux de floraison et de fructification. Cependant la seconde année, ces 2 paramètres phénologiques ont été influencés par les écarts de température. Ceci montre que la température agit tantôt par ses écarts, tantôt par son minimum sur les niveaux de floraison et de fructification. Certainement, les signaux engendrés par la température minimale et les écarts de température induiraient des stimuli identiques dans les organes du cacaoyer pour provoquer la mise à fleur et la fructification. La structuration des paramètres climatiques et phénologiques pourrait permettre d'en choisir un seul parmi ceux stablement liés pour réaliser des études plus fines.

La température maximale et l'insolation ont influencé le rythme des poussées foliaires (Figures 15 et 16 ; Tableau XXVI). Donc, Leur augmentation provoque l'accroissement du rythme d'émission de nouvelles feuilles. Or, la dormance des bourgeons axillaires est due à la dominance apicale chez le cacaoyer. Cette dépendance fonctionnelle connue sous le nom de corrélations entre organes conditionne le port de l'arbre (Heller *et al.* 1995). De fait, l'activité ou la dormance des bourgeons axillaires relève de l'équilibre entre auxine et cytokinine. Ainsi, l'inhibition est favorisée lorsque l'équilibre est déplacé en faveur de l'auxine. L'auxine provoque la sécrétion de l'éthylène ou de l'acide abscissique bloquant le fonctionnement des bourgeons axillaires. La manifestation phénologique visible est l'apparition des écailles au niveau de ces bourgeons axillaires. Par contre, quand l'équilibre est déplacé en faveur des cytokinines, le débourrement se produit par la destruction de l'éthylène ou de l'acide abscissique (Heller *et al.* 1995). Toutefois, l'implication de l'auxine dans la régulation de la dormance ou de l'activité des bourgeons chez le cacaoyer mérite d'être clarifiée. Car le taux de cette phytohormone n'a pas été détecté à l'initiation des cultures par Alemanno (1995). Il est donc possible que les analogues structuraux de l'auxine ou d'autres phytohormones soient à l'origine de la dormance

ou du réveil des bourgeons. Cependant, Braudeau (1969) considère que c'est l'intensité des radiations lumineuses qui serait à l'origine de la levée de dormance des bourgeons axillaires.

La température minimale, les écarts de température ou la température maximale ont influencé le niveau de fructification (Figures 15 et 16 ; Tableau XXVI). Donc, l'intensification des signaux de 3 paramètres précités provoque la formation massive de fruits. Selon Heller *et al.* (1995), l'auxine et les gibbérellines provoquent la prolifération des tissus du péricarpe. On peut admettre que l'augmentation des signaux de ces 3 paramètres pourrait provoquer la synthèse des analogues structuraux de l'auxine et des gibbérellines au moment de la fructification. La synthèse de ces phytohormones endogènes favoriserait l'élaboration et la croissance des chérelles.

Le niveau de floraison a été influencé par la température minimale, les écarts de température ou la température maximale (Figures 15 et 16 ; Tableau XXVI). Ainsi, l'augmentation de signaux de ces 3 paramètres provoque un accroissement de la production des fleurs. Selon Heller *et al.* (1995), la floraison est sous l'influence des gibbérellines et des cytokinines. Il est donc possible que les effets de ces 3 paramètres puissent provoquer l'augmentation de la floraison. De fait, la floraison est principalement sous l'influence du photopériodisme. La situation géographique de la Côte d'Ivoire dans la zone tropicale la rend certes moins sensible à l'influence de l'alternance jour-nuit ou lumière-obscurité. Cependant, il n'est pas exclu que le cacaoyer réagisse aux faibles variations de la longueur du jour. Groulez *et al.* (1989) ont noté l'influence du photopériodisme sur la floraison. C'est donc l'intensification des signaux de ces 3 paramètres qui pourrait être à l'origine du photopériodisme. Ces signaux pourraient produire les stimuli permettant l'entrée en activité des phytohormones endogènes impliquées dans la floraison. Cependant, ces 3 paramètres ainsi que la longueur du jour pourraient être seulement des éléments prédominants. D'autres facteurs comme l'humidité relative pourrait intervenir. Car, il est difficile de dissocier l'influence de chacun des paramètres de l'ensemble des éléments qui constituent l'environnement (Braudeau, 1969; Mossu, 1990).

L'analyse de la relation entre les 3 paramètres phénologiques a montré l'existence d'une relation linéaire favorable et très significative entre eux. Ainsi, quand le niveau

de floraison augmente, le niveau de fructification et le rythme des poussées foliaires augmentent également, et inversement. Cette corrélation favorable peut s'expliquer par l'action des gènes à effet pléiotrope ou par le déséquilibre de liaison entre les allèles en ségrégation dans la population (Baradat, 1986). La pléiotropie est l'action simultanée d'un gène sur plusieurs caractères. En conséquence, les signaux venant des paramètres climatiques différents induisent des stimuli identiques chez le cacaoyer. Ces stimuli entraînent un accroissement simultané des niveaux de floraison, de fructification et du rythme des poussées foliaires.

5. Influence de quelques paramètres génétiques sur l'embryogenèse somatique

5.1. Effet de l'année sur les 5 variables de culture de tissus mesurées

Les 5 variables de culture de tissus mesurées ont subi significativement l'effet des variations de l'année. Ceci traduit l'influence de l'environnement sur l'état physiologique des explants floraux au moment de leur prélèvement sur l'arbre. Désormais, il serait souhaitable d'analyser année par année les données collectées à partir de la culture de tissus du cacaoyer ou d'espèces apparentées.

5.2. Caractérisation des aptitudes callogènes et embryogènes des 13 génotypes

5.2.1. Pertinence des descripteurs primaires

Le nombre d'explants callogènes et la moyenne d'embryons produits par explant embryogène ont été identifiés comme les descripteurs primaires les plus pertinents. Ceci, grâce à l'analyse des interactions d'ordre 1 et 2. En effet, quelle que soit l'année, la variation du nombre d'explants callogènes et celle de la moyenne d'embryons par explant embryogène ont été indépendantes de la variation simultanée du génotype, de l'explant et du milieu d'induction. Cependant, la seconde année, la variation du nombre d'explants callogènes et du nombre d'explants embryogènes a été dépendante de celle simultanée des facteurs explant et milieu d'induction. Une relation similaire de dépendance a été mise en évidence par Furtek *et al.* (2000). Ces auteurs ont analysé 3 interactions de premier ordre génotype x source de carbone, génotype x milieu de base et génotype x phytohormone exogène. Les effets de ces 3 interactions d'ordre 1 ont été tous significatifs. Nos résultats, au contraire, ont montré que la moyenne d'embryons produits par explant embryogène convient pour structurer les variantes des facteurs génotypes, explant et milieu d'induction en classes distinctes.

Cependant, le nombre d'explant callogène a révélé quelques limites sur ses performances. En effet, sur l'ensemble des 3 expérimentations conduites, aucune n'a permis de structurer

pour la callogenèse les variantes de la nature de l'explant et du milieu d'induction en classes distinctes. L'absence de structuration de l'effet du type d'explant est en réalité due à l'existence de l'influence réciproque entre les staminodes et les pétales pour le descripteur de la callogenèse désigné nombre d'explants callogènes. Cette influence réciproque a été révélée à travers l'analyse de l'interaction de la nature de l'explant x disposition des explants. En conséquence, la moyenne d'embryons produits par explant embryogène paraît plus discriminante que le nombre d'explants callogènes obtenus au terme de chaque cycle de culture.

5.2.2. Caractérisation des aptitudes callogènes et embryogènes des hybrides par analyse séparée des facteurs

Du point de vue de la callogenèse, les génotypes stables L233-A4, L120-A2, L126-A3, L231-A4 et L330-A9 ont été identifiés les meilleurs. Dans ce groupe les 2 clones témoins C151-61 et SCA6 peuvent y être associé. Cette classification de l'aptitude callogène des génotypes met en évidence l'effet du génotype dans la production d'explants callogènes, rapporté chez le cacaoyer par Li *et al.* (1998). Cependant, les résultats obtenus sur la classification des aptitudes callogènes des génotypes hybrides sont différents de ceux de Alemanno (1995). Elle a utilisé, pour la caractérisation, les génotypes NA79, UPA603, T85/799, R43 et R106 et le pourcentage d'explants callogènes comme variable. Elle n'a décelé aucune différence dans leur aptitude à produire des cals. Donc, les génotypes sont un des facteurs à l'origine de la variation dans la production d'explants callogènes chez le cacaoyer. Les génotypes hybrides L233-A4, L120-A2, L126-A3, L231-A4 et L330-A9 ainsi que les 2 clones témoins C151-61 et SCA6 peuvent être utilisés dans les expériences où la production des cals est recherchée. Il s'agit par exemple de celles visant la production industrielle de métabolites secondaires comme le beurre, la théobromine et l'arôme de chocolat. Car, ces métabolites secondaires sont produits à partir des suspensions cellulaires issues de cals (Pence, 1989).

L'effet du milieu d'induction n'a pu être mis en évidence en raison de l'existence de l'interaction entre le milieu d'induction et la nature de l'explant. Cette interaction n'a pas permis de caractériser individuellement les effets principaux de ces 2 facteurs.

Pour l'embryogenèse somatique, d'une année à l'autre, les hybrides L126-A3, L231-A4, et L120-A2, les clones témoins SCA6 et C151-61 ont été révélés les meilleurs. A ce

groupe peut être adjoint l'hybride L233-A4 (Tableau XXX), qui est très performant en embryogenèse secondaire (Résultats non montrés). Les résultats obtenus sur la classification des aptitudes embryogènes des génotypes hybrides, au niveau du nombre de groupes homogènes identifiés, s'apparentent à ceux de Alemanno (1995). Les performances embryogènes du clone de référence SCA6 s'apparentent à celles mises en évidence par Li *et al.* (1998). Cette classification confirme la stabilité du potentiel embryogène de ce génotype SCA6. L'hybride L330-A9 a enregistré des performances embryogènes faibles et instables (CV > 20 %). La callogenèse précédant l'embryogenèse somatique, les génotypes instables L330-A9 et récalcitrant L232-A9 doivent être recommandés pour une optimisation ultérieure. La classification de ces génotypes traduit l'effet génotype dans la production d'embryons somatiques chez le cacaoyer. Certains auteurs tels que Adu-Ampomah *et al.* (1988), Lopez-Baez *et al.* (1993) et Tan et Furtek, (2003) l'ont illustré. Les génotypes sont également à l'origine de la variation dans la production d'embryons somatiques chez le cacaoyer au cours de l'année. Les génotypes L126-A3, L231-A4, L120-A2, L233-A4, C151-61 et SCA6 peuvent être utilisés dans les expériences visant à produire et régénérer les embryons somatiques en plantules.

Pour l'embryogenèse, les pétales ont exprimé une meilleure aptitude embryogène. Cette meilleure aptitude embryogène indique l'effet de l'explant dans la production d'embryons somatiques chez le cacaoyer. Söndahl *et al.* (1993), Alemanno (1995) ainsi que Tan et Furtek, 2003) ont rapporté ce fait. Les travaux de Lopez-Baez *et al.* (1993) et de Söndahl *et al.* (1993) ont révélé une meilleure aptitude embryogène des pétales. D'autres ont révélé la supériorité des performances embryogènes des staminodes sur celle des pétales (Alemanno, 1995 ; Li *et al.* 1998 ; Tan et Furtek, 2003). Nos résultats sont similaires à ceux de Lopez-Baez *et al.* (1993) et Söndahl *et al.* (1993). En Côte d'Ivoire, l'aptitude embryogène des staminodes et des pétales a connu un changement. Au début de l'exécution du projet "transfert de technologies sur l'embryogenèse somatique et la micropropagation", par le Dr Traoré Abdoulaye, en l'an 2000, les staminodes étaient plus embryogènes que les pétales. Plus tard, le potentiel embryogène des pétales a surclassé celui des staminodes. La comparaison minutieuse des méthodes utilisées dans la préparation des milieux a révélé des différences dans la préparation des vitamines DKW. Initialement, les constituants des vitamines étaient préparés sans élévation de la température. L'acquisition par les

pétales d'une meilleure aptitude embryogène a coïncidé avec l'élévation de la température du constituant myo-inositol. Le myo-inositol est un des constituants de la vitamine DKW. Donc, l'inversion du potentiel embryogène a été imputée à l'élévation de la température de myo-inositol. Le myo-inositol chauffé semble avoir reprogrammé génétiquement les pétales, plus proche du point zéro du programme génétique, que les staminodes. En effet, la callogenèse provoque la dédifférenciation ou le retour à l'état embryonnaire des tissus déjà différenciés (Augé *et al.*, 1984). Ce retour à l'état embryonnaire s'accompagne d'une reprogrammation génétique. La destinée des cellules mises en culture dépend du niveau de réveil des structures dédifférenciées (Demarly et Sibi, 1989). La variation constatée dans la production d'embryons somatiques chez le cacaoyer dépend aussi des explants. En Côte d'Ivoire, les pétales devraient être utilisés pour la micropropagation par embryogenèse somatique chez le cacaoyer.

Pour l'effet du milieu d'induction sur l'embryogenèse somatique, la seconde année, le milieu PCG4 a été révélé le meilleur. Il s'agit de l'effet du milieu d'induction indiqué par certains auteurs chez le cacaoyer (Li *et al.* 1998 ; Furtek *et al.* 2000 ; Tan et Furtek, 2003). Les résultats obtenus s'apparentent à ceux de Li *et al.* (1998). Car selon ces auteurs la production d'embryons somatiques chez le cacaoyer augmente avec l'accroissement de la concentration des phytohormones exogènes. Une telle augmentation de la production d'embryons ne s'arrête que quand le seuil de phytotoxicité est atteint. De fait, parallèlement aux effets morphogènes et embryogènes qu'elles expriment (Kofler, 1969), les phytohormones exogènes sont très phytotoxiques à doses élevées (Heller *et al.* 1995). Car la plupart d'entre elles ont d'abord été utilisées comme défoliants ou désherbants (Heller *et al.* 1995 ; Li *et al.* 1998). Cependant, certains génotypes comme le clone témoin C151-61 s'exprime mieux sur le milieu PCG3 le moins concentré, que sur le milieu PCG4 le plus concentré. La meilleure expression embryogène sur le milieu PCG4 montre que ses concentrations hormonales en 2,4 D / TDZ égales à 18,08 μM / 45,40 nM ne sont pas phytotoxiques. De fait, Li *et al.* (1998) ont trouvé les concentrations en 2,4D / TDZ égales à 9 μM / 227,3 nM , comme phytotoxiques pour le cacaoyer.

Les résultats obtenus ont montré l'importance des concentrations hormonales utilisées. Cependant, Duhem *et al.* (1989) ont réduit le rôle joué par les niveaux et les équilibres hormonaux. La production d'embryons somatiques dépend également des milieux

d'induction de la callogenèse. Le milieu d'induction PCG4 doit être retenu pour l'embryogenèse somatique chez le cacaoyer.

5.2.3. Caractérisation des aptitudes callogènes et embryogènes des géniteurs par analyse séparée des facteurs

Pour la callogenèse, les géniteurs Pa121, IMC67, P19A et Pa13 ont été choisis. Les résultats obtenus sur la classification des aptitudes callogènes des géniteurs sont différents de ceux de Alemanno (1995). Pour les activités qui visent la production des cals, les 4 géniteurs précités peuvent être utilisés.

Pour l'embryogenèse somatique, les géniteurs Pa13 et P19A ont été sélectionnés. Le nombre de groupes obtenu au terme de la classification est différent de celui de Alemanno (1995). Cet auteur a classifié le géniteur IMC67 comme non embryogène en raison de son pourcentage d'explants embryogènes nul. Par ailleurs, il n'est pas malséant de rappeler que la variable décrivant la callogenèse, utilisée ici, traduit le nombre d'explants callogènes produits et non la qualité d'explants callogènes fournis. Les autres géniteurs dont Pa150, Pa121 et IMC67 ont été proposés pour une optimisation future. Cette optimisation pourrait porter sur l'amélioration de quelques paramètres du protocole de Li *et al.* (1998). Il pourrait s'agir de la recherche de milieux standards sur lesquels tous les génotypes peuvent produire des embryons. Les travaux de Minyaka (communication personnelle, 2007) attestent ce choix. Cet auteur a réussi à conférer l'aptitude embryogène au géniteur Pa121. Ce géniteur Pa121 a été caractérisé par nous comme récalcitrant. Minyaka a étudié l'influence du magnésium et du sulfure sur l'embryogenèse somatique, à travers la variation des molécules $MgSO_4$ et K_2SO_4 . La récalcitrance a été définie comme l'inaptitude de cellules, tissus ou organes végétaux à répondre facilement à la culture de tissus (Benson, 2000). L'éthylène, les polyphénols et l'auxine sont responsables de la récalcitrance chez le cacaoyer (Alemanno, 1995 ; Fang *et al.* 2003). Les polyphénols par leur oxydation jouent le rôle d'inhibiteurs des réactions métaboliques ou d'antagonistes des substances de croissance (Augé *et al.*, 1984 ; Alemanno *et al.* 2003).

Les pétales et les staminodes sont potentiellement embryogènes. Or, selon Santos *et al.*, (2005), le gène *Tc SERK* qui induit l'embryogenèse, est inactif chez les staminodes et les pétales. Il est donc possible que l'acquisition de la capacité embryogène ait lieu quand les tissus sont cultivés. Cette éventualité est vérifiée par les travaux de

Alemanno (1995). Cet auteur a démontré que la différence entre les génotypes embryogène (NA32) et non embryogène (R106) réside dans la capacité de leurs cals à synthétiser l'acide indole-3-acétique endogène (AIA). Son taux est indétectable à l'initiation des cultures chez les 2 catégories de génotypes. Cependant, il reste très faible chez le génotype embryogène à 250 pmoles / mg. Donc, la capacité embryogène est acquise quand les explants sont cultivés.

5.2.4. Caractérisation des aptitudes callogènes et embryogènes des 13 génotypes par analyse combinée des facteurs en fonction des descripteurs secondaires

Elle a produit 3 descripteurs secondaires. Il s'agit des aptitudes générales, des explants et des milieux PCG favorables. Le premier descripteur a été obtenu en combinant les performances moyennes à la stabilité ($CV < 20\%$) avec laquelle les explants produisent des cals et / ou des embryons somatiques (Tableaux XXXIV et XXXV). Certains génotypes se sont mieux exprimés à travers les staminodes ou les pétales pour l'embryogenèse somatique. Or la caractérisation par analyse séparée des facteurs n'a pas pu structurer les variantes du facteur explant en classes distinctes relativement à la callogenèse. Ceci montre la fiabilité de la caractérisation des aptitudes embryogènes par analyse combinée des facteurs. De même, certains génotypes ont montré une meilleure expression embryogène sur l'un des 3 milieux d'induction utilisés. A notre connaissance, aucune étude n'a combiné les facteurs pour améliorer la caractérisation *in vitro* des génotypes. Cette caractérisation permet une meilleure connaissance et exploitation des génotypes utilisés. Cependant, elle ne supprime pas le problème de la variabilité de la production d'explants callogènes et d'embryons somatiques en fonction du génotype, de l'explant et du milieu d'induction. Elle est donc une adaptation à ce problème de variabilité. Cette caractérisation devrait être étendue à tous les génotypes élités de la collection. Ceci permettrait une exploitation judicieuse de leur potentiel.

5.3. Ressemblance entre les hybrides et les géniteurs pour leurs potentiels callogène et embryogène

La ressemblance entre les hybrides et les parents relativement à leurs aptitudes callogènes embryogènes suggère l'existence d'un déterminisme génétique pour ces caractères. En effet, l'hybride semble hériter des performances callogènes et embryogènes de son géniteur mâle. Cette hérédité mâle pourrait s'expliquer par l'existence des mitochondries et chloroplastes dans la traînée cytoplasmique accompagnant les anthérozoïdes qui fécondent

l'oosphère et les 2 noyaux polaires du sac embryonnaire. Les mitochondries et les chloroplastes sont des organites cellulaires cytoplasmiques doués de la capacité d'autoreproduction, grâce à l'ADN porté par chacun de leur chromosome. En conséquence, l'information génétique paternelle portée par ces organites serait proéminente dans la transmission de ces 2 caractères. L'analyse de la ressemblance entre les hybrides et les parents montre encore la fiabilité de la caractérisation par analyse combinée des facteurs. Car le descripteur aptitude générale utilisé pour analyser les ressemblances procède de cette caractérisation. Cependant la portée des conclusions que l'on peut déduire reste limitée, à cause du nombre réduit de descendants et de l'absence de croisements réciproques. Ce résultat préliminaire mériterait d'être complété en raison de son importance. Par ailleurs, la méthode d'étude de l'hérédité des aptitudes callogènes et embryogènes utilisée ici est mendélienne. Car le lien génétique entre les parents et leurs descendants a été établi au travers des équations de croisement. Ces équations de croisement se conçoivent aisément quand il s'agit des caractères qualitatifs, contrôlés par un nombre réduit de gènes. Or, ces expressions pourraient être le produit de l'activité de plusieurs gènes. Donc, les méthodes requises par la génétique quantitative doivent être utilisées pour mieux comprendre et exploiter cette hérédité. Pour cela, un schéma de sélection utilisant le diallèle comme plan de croisements, pourrait permettre l'identification non seulement des meilleurs géniteurs, mais surtout d'estimer les paramètres génétiques liés à ces 2 caractères (Demarly, 1977 ; Cilas, 1994). Les meilleurs géniteurs sont repérés à partir de leurs bonnes aptitude générale à la combinaison, aptitude spécifique à la combinaison, de leurs bons effets maternels général et spécifique de réciprocité (Demarly, 1977). Pour les paramètres génétiques, il s'agit principalement des variances génétiques d'additivité et de dominance. En dehors de ceux-ci, il y a ceux attribuable aux effets de l'environnement (Demarly, 1977). Or, les plans de croisements en paire indépendante, hiérarchique et factoriel ne le permettent pas (Demarly, 1977 ; Cilas, 1994).

Le test de géniteurs ayant débouché sur la création d'hybrides dont le potentiel embryogène est évalué ici n'a utilisé que 2 testeurs communs (Ngoran et Paulin, 1988). Il s'agit des parents mâles Pa150 et IMC67. Le parent mâle Pa150 a exprimé une aptitude callogène et embryogène faible. Son aptitude a été stable dans le cas de la callogenèse, mais instable pour l'embryogenèse. Le testeur IMC67 a montré une aptitude callogène bonne

et stable. Son aptitude embryogène a été faible et instable. Il semble que cette hérédité aurait été mieux comprise si le nombre de testeurs communs entre 10 et 15. Ces chiffres garantissent la représentativité des géniteurs relativement à la population d'où ils ont été tirés (Cilas, 1994). Elle serait aussi mieux comprise si chacun des testeurs exprimait une des nombreuses aptitudes générales précédemment rapportées (Tableau XXXIII).

Le comportement callogène des hybrides est comparable à celui des parents (Figure 17). A l'exception du géniteur Pa121, le comportement embryogène de tous les hybrides a été en deçà de celui du reste des géniteurs (Figure 18). Ces résultats indiquent que la transmission des aptitudes embryogènes ne serait pas transgressive. Si elle l'était, certains hybrides exprimeraient des performances au-delà de la gamme de leurs parents. La transgression est définie comme la supériorité des performances d'un descendant relativement à celle du parent le plus performant (Sibi et Blanchard, 1982). Cette absence de transgression pourrait être imputée au fardeau génétique. Ce fardeau génétique est dû à l'allogamie qui entraîne souvent l'accumulation d'allèles récessifs défavorables, à faible fréquence, à de nombreux loci (Baril et Bergonzini, 1994).

5.4. Influence réciproque entre les staminodes et les pétales cultivés en culture mixte

Il existe une influence réciproque avérée entre les staminodes et les pétales relativement à la production d'explants callogènes. Car la variation du nombre d'explants callogènes a été dépendante de la variation simultanée des facteurs explant et disposition. Donc, la valeur exprimée par les staminodes ou les pétales relativement à la callogenèse n'est pas due à une réponse individuelle propre. Elle est plutôt imputable à la présence de l'autre explant. Leur classification est impossible. Cependant, pour l'embryogenèse somatique, cette influence est inexistante. En effet, la variation de la moyenne d'embryons produits par explant embryogène a été indépendante de la variation simultanée du type et de la disposition des explants. En conséquence, les différences manifestées par les staminodes et les pétales relativement à l'embryogenèse sont dues à la valeur individuelle propre à chaque type d'explant. Leur classification est possible. L'interaction est généralement le fruit des effets conjoints entre éléments baignant dans le même milieu. Ces éléments interviennent généralement dans les mêmes séquences métaboliques ou compétissent pour le même substrat ou le même récepteur (Heller *et al.* 1993 ; Heller *et al.* 1995). Nos résultats indiquent que la

moyenne d'embryons obtenus par explant embryogène est donc le meilleur descripteur pour la caractérisation *in vitro* des génotypes de cacaoyer.

Les pétales et les staminodes pourraient indifféremment être cultivés en vrac ou en lots sur le même milieu d'induction (Figures 5a et 5b). Hormis, ces 2 dispositions, celle portant uniquement les pétales pourrait être choisie. Ce résultat confirme celui que nous avons signalé plus haut. Les pétales constituent l'explant exprimant la meilleure aptitude embryogène.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'hypothèse qui a sous-tendu ce travail a consisté à admettre l'existence de l'influence du climat, de la phénologie, du génotype, du milieu d'induction et de la nature de l'explant sur l'embryogenèse somatique chez le cacaoyer. Cette influence existe, mais son intensité varie d'un facteur à l'autre, voire d'une année à l'autre.

Au plan climatique, les faibles variations des paramètres climatiques mesurés semblent justifier leur faible impact sur l'embryogenèse somatique. De même, le sens de variation des périodes climatiques identifiées, souvent contradictoire d'une année à l'autre, relativement à celui de l'embryogenèse somatique pourrait aussi expliquer ce faible impact. En effet, le nombre de périodes climatiques identifiées aussi bien à l'intérieur d'une même année que d'une année à l'autre a varié. La première année, tous les paramètres climatiques ont généré 2 périodes chacun. La seconde année, seules la pluviosité, la température maximale et l'insolation en ont générées deux. Bien plus, même lorsque le nombre de périodes a été concordant d'une année à l'autre, leur composition en mois ne l'a pas été. Pour le sens de variation, seule la température maximale a enregistré un sens de variation stable relativement à celui de l'embryogenèse somatique. Ainsi, pour ce paramètre climatique, l'embryogenèse somatique est élevée lorsque la température maximale est basse. Le sens de variation de ce paramètre est conforme globalement à celui fourni par le signe du coefficient de régression partielle pour les paramètres climatiques.

L'insolation mesurant la durée pendant laquelle le soleil a brillé au cours de la journée ne convient pas pour évaluer l'influence de la lumière sur l'embryogenèse somatique. C'est la quantité de lumière convertie en volts par un photodétecteur qui pourrait le faire convenablement.

Du point de vue phénologique, les faibles variations des paramètres phénologiques pourraient également expliquer leur faible incidence sur l'embryogenèse somatique. De fait, seul le niveau de floraison a fourni 2 classes phénologiques distinctes la première année. Le niveau de fructification et le rythme des poussées foliaires n'ont pas varié significativement, d'une année à l'autre. L'embryogenèse somatique est élevée lorsque les paramètres phénologiques le sont.

Au double plan climatique et phénologique, l'influence combinée des paramètres climatiques et phénologiques a été également faible. Les modèles linéaires des paramètres climatiques et phénologiques des 2 années d'études n'ont pas été identiques. Néanmoins, les écarts de température et le niveau de fructification sont communs aux 2 modèles linéaires. Ils influencent également très faiblement l'embryogenèse somatique.

En somme, le climat a une très faible influence sur l'embryogenèse somatique initiée à partir des tissus floraux sporophytiques chez le cacaoyer. De même, l'état physiologique global de la plante n'agit pas sur le potentiel embryogène des arbres. Plus de 90 % des variations de l'embryogenèse sont dues à des facteurs autres que le climat et la phénologie. La part de la variation de l'embryogenèse somatique attribuable aux paramètres climatiques et phénologiques est très faible. Le phénomène d'embryogenèse demeure complexe. Nos résultats collectés sur 2 années paraissent suffisants et acceptables pour tirer des conclusions fiables. La production d'embryons somatiques peut se faire toute l'année, sans tenir compte ni de la période de l'année ni de l'état physiologique de l'arbre.

Par ailleurs, le climat influence l'état phénologique de l'arbre. En effet, la température maximale explique les niveaux de floraison et de fructification ainsi que le rythme des poussées foliaires. De même, l'insolation influence le rythme des poussées foliaires. Les niveaux de floraison et de fructification sont tantôt influencés par la température minimale, tantôt par les écarts de température. L'action du climat sur la phénologie est en réalité la manifestation de l'effet des phytohormones endogènes sur l'expression des rythmes biologiques du cacaoyer. L'existence de relation entre ces 3 paramètres phénologiques est la conséquence de l'action des gènes à effet pléiotrope.

Le génotype, la nature de l'explant et le milieu d'induction ont influencé la callogenèse et l'embryogenèse somatique du cacaoyer à des degrés variables, d'une année à l'autre. Le nombre d'explants callogènes et la moyenne d'embryons produits par explant embryogène sont les meilleurs descripteurs primaires pour la caractérisation *in vitro* des génotypes du cacaoyer. Néanmoins, la moyenne d'embryons par explant embryogène est plus discriminante que le nombre d'explants callogènes. Par conséquent, elle est le meilleur descripteur pour la caractérisation *in vitro* des génotypes de cacaoyer. Il existe une influence réciproque avérée entre les staminodes et les pétales pour la production d'explants callogènes, lorsqu'ils sont

cultivés en culture mixte. Cette influence est inexistante pour la production d'embryons somatiques. Par conséquent, il faudra cultiver ces explants séparément pour la production des cals. Néanmoins, pour la production d'embryons somatiques, ils pourraient être cultivés dans la même boîte de Pétri

La caractérisation du potentiel callogène et embryogène par analyse séparée des facteurs a été réalisée. Elle a montré que 4 hybrides L126-A3, L231-A4, L120-A2, L233-A4, 2 géniteurs Pa13 et P19A et les 2 clones témoins SCA6 et C151-61 peuvent être utilisés pour les activités visant à la fois la production des cals et d'embryons somatiques. Pour la production des cals, les staminodes et les pétales de ces 8 génotypes pourraient être cultivés indifféremment sur les milieux d'induction PCG4, PCG3 et PCG1. Pour la production d'embryons somatiques, le milieu PCG4 doit être ensemencé uniquement avec les pétales de ces 8 génotypes. Cependant, les hybrides L232-A9, L330-A9 et les géniteurs Pa150, Pa121 et IMC64 ont été proposés pour une optimisation future. Les recherches futures devraient porter sur la mise au point des milieux standards de culture. Cette caractérisation par analyse séparée des facteurs a confirmé la variation de la production d'explants callogènes et d'embryons somatiques en fonction du génotype, de l'explant et du milieu d'induction. Le rôle du myo-inositol dans l'inversion du potentiel embryogène entre les staminodes et les pétales doit également être élucidé.

La caractérisation du potentiel embryogène par analyse combinée des facteurs a amélioré la caractérisation par analyse séparée. En effet, elle a montré que certains génotypes s'expriment mieux à travers les staminodes ou les pétales. D'autres génotypes donnent une meilleure expression sur les milieux d'induction PCG1 et PCG4. Les pétales et les staminodes devraient être cultivés soit en vrac soit en lots sur le milieu d'induction de la callogenèse. A côté de ces 2 dispositions, les pétales pourraient être cultivés seuls sur le milieu d'induction. La caractérisation par analyse combinée des facteurs devrait être étendue à tous les génotypes élites de la collection pour mieux connaître et exploiter leur potentiel. Cette caractérisation par analyse combinée des facteurs a permis d'établir la ressemblance entre les hybrides et les parents relativement à leurs aptitudes générales. L'aptitude embryogène de l'hybride ressemble fortement à celles du parent mâle. Une telle ressemblance a suggéré la possibilité d'un contrôle génétique. Des analyses génétiques consistant à étudier l'hérédité des aptitudes callogènes et embryogènes, leur variabilité phénotypique et la liaison entre ces 2 caractères devraient être réalisées, dans une perspective de sélection.

REFERENCES CITEES

- Adu-Ampomah Y., Novak F.J., Afza R., Van Duren M. and Perea-Dallos, 1988. Initiation and growth of somatic embryos of *Theobroma cacao* L. *Café Cacao Thé*, 32 : 187-200.
- Alemanno, L. 1995. Embryogenèse somatique du cacaoyer *Theobroma cacao* L. : contrainte, progrès et perspectives. Thèse de Doctorat d'Université. Spécialité : physiologie végétale. Université Montpellier II. Sciences et Techniques du Languedoc. 193 p.
- Alemanno L., Berthouly M. and Michaux-Ferrière N., 1997. A comparison between *Theobroma cacao* L. zygotic embryogenesis and somatic embryogenesis from floral explants. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant. Society for in vitro biology*. 33: 163-172.
- Alemanno, L., Ramos, T., Gargadenec, A., Andary, C., et Ferrière, N. 2003. Localisation and identification of phenolic compounds in *Theobroma cacao* L. somatic embryogenesis. *Annals of botany*. 92 : 613-623.
- Allou, D. 1996. Etude de la répartition de la production annuelle chez le palmier à huile (*Elaeis guineensis* JACQ.) : évaluation de quelques caractères de production. Mémoire de DEA. Université de Cocody-Abidjan. 24 p.
- Anonyme 1, 2003. In proceedings of the International Workshop on Cocoa Breeding for Improved Production Systems. Ingenic. 19th-21th October 2003. Accra, Ghana. Editors : F. Bekele, M.J. End and A. B. Eskes. Pages 1-10 in Workshop synthesis, conclusions and recommendations.
- Anonyme 2, 2004. Rapport annuel de la zone franc. Banque de France. Eurosysteme. 279 p.
- Antunez de Mayolo G., Maximova S. N., Pishak S., Gultinan M. J., 2003. Moxalactam as a counter-selection antibiotic for Agrobacterium mediated transformation and its positive effects on *Theobroma cacao* somatic embryogenesis. *Plant Science*. 164 : 607-615.
- Augé R. Beauchesne G., Bocon-Gibod J., Decourtye L., Digat B., Galandrin J. C., Minier R., Morand J. C., Vidalie H., 1984. La culture *in vitro* et ses applications horticoles. Edition revue. J. B. Baillière. Technique et documentation (Lavoisier). 143 p.
- Baradat P., 1982. Génétique quantitative. Modèles statistiques et génétiques de base. Fascicule I. INRA. Amélioration des arbres forestiers. Document interne. 205 p.
- Baradat P., 1986. Variabilité génétique et systèmes de reproduction dans : Amélioration génétique des arbres forestiers. Revue forestière française. ENGREF, Nancy , France. Editeurs Militon J, Pardé J., Guillard J., Favier A et Huin A. M. p 48-58 .
- Baril C. et Bergonzini J.C., 1994. Les modèles génétiques. Dans : Traitement statistique des essais de sélection. Stratégie d'amélioration des plantes pérennes. Montpellier, France. Editeur CIRAD-CP. p 9-24.
- Benson E. E., 2000. *In Vitro* plant recalcitrance : an introduction. *In vitro Cellular and Developmental Biology*. 36 : 141 – 148.
- Bertrand B. et Agbodjan A.K., 1989. Le bouturage orthotrope du cacaoyer, premiers résultats et perspectives. *Café Cacao Thé*. 33 : 147-156.
- Bertrand B. et Dupois V., 1992. Contribution à la mise au point du clonage du cacaoyer (*Theobroma cacao* L) par utilisation d'axes orthotropes. Contraintes et perspectives. *Café Cacao Thé*. 36 : 9-26.
- Bonnet – Masimbert M. et Villar M., 1986. Maîtrise de la reproduction sexuée. Dans : Amélioration génétique des arbres forestiers. Revue forestière française. ENGREF, Nancy , France. Editeurs Militon J, Pardé J., Guillard J., Favier A et Huin A. M. p 48-58 .
- Braudeau J., 1969. Le cacaoyer. G. P. Maisonneuve et Larose. Paris (V). 304 p.

- Chatelet P., Michaux-Ferriere N. et Dublin P., 1992. Potentialités embryogènes du nucelle et du tégument interne de graines immatures de cacaoyer (*Theobroma cacao* L.). *Histologie végétale / Plant histology*. C. R. Acad. Sci. Paris, t. 315, Série III, p. 55-62.
- Cilas C., 1994. Estimation des variances génétiques et des héritabilités pour différents plans de croisements. Dans : *Traitement statistique des essais de sélection. Stratégie d'amélioration des plantes pérennes*. Montpellier, France. Editeur CIRAD-CP. p 71-88.
- Clément D., Ngoran J., Paulin D., Lachenaud Ph., Sounigo O. et Eskes A., 1996. Amélioration génétique du cacaoyer en Côte d'Ivoire: Nouvelle sortie variétale. In *proceeding, douzième conférence internationale sur la recherche cacaoyère*. Salvador (Brésil), 17-23 nov. 1996, 337-344.
- Cope F. W., 1962. The mechanism of pollen incompatibility in *Theobroma cacao*. *Heredity*, 17: 157-182.
- Demarly Y., 1977. *Génétique et amélioration des plantes*. Collection sciences agronomiques. Paris Masson. 287 p.
- Demarly Y. et Sibi M., 1989. *Amélioration des plantes et biotechnologies*. Universités francophones. UREF. Editions John Libbey Eurotext. Paris. 152 p.
- Dos Santos A.V.P. and Machado R.D., 1989. A scanning electron microscope study of *Theobroma cacao* L. *Annals of Botany Company*. 64 : 293-296.
- Driver J. A, Kinyuki A. H., 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstocks. *HortScience*. 19: 507- 509.
- 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 : 9-14.
- Encyclopédie électronique Encarta 2006. Microsoft Corporation. Collection 2006.
- Esan E. B., 1975. Tissue culture studies on cocoa (*Theobroma cacao* L.). A supplementation of current research. In : *proceedings, cinquième conférence internationale sur la recherche cacaoyère*, Ibadan (Nigeria), 1-9 sept. 1975, 116-125.
- Fang J.Y., Wetten A., Hadley P., 2003. Cryopreservation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos for long-term germplasm storage. *Plant Science* 166 : 669–675.
- Figueira A. and Janick J. 1993. Development of nucellar somatic embryos of *Theobroma cacao* L. *Acta Horticulturae*, 336 : 231-238.
- Furtek, D., Kasran, R., Lock, T. C., Johnsiul, L., Mohammed, A., Hartney V., Mohd, M. Y., Lamin, K., Ming Tong, L. 2000. Biotechnology Research by the Malaysian Cocoa Board. In *proceedings of the International Workshop on New Technologies and Cocoa Breedings*. Ingenic. 16th-17th October 2000. Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia. 143-148.
- Gray A., 2000. *The world cocoa market outlook*, LMC International.
- Groulez J. et Clement J., 1989. *Mémento du forestier. Techniques rurales en Afrique*. 3^e édition. Ministère de la Coopération et du Développement. 1266 p.
- Guiltinan M J. et Maximova S. 2000. Recent advances in the tissue culture of cocoa from somatic embryos to bentwood gardens – a short review. In *proceedings of the International Workshop on New Technologies and Cocoa Breedings*. Ingenic. 16th-17th October 2000. Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia. 157-162.
- Heller, R. Esnault, R. Lance, C. 1993. *Physiologie végétale*. Tome 1. Nutrition. *Physiologie végétale*. 5^e Edition Masson. Paris-Milan-Barcelone. 294p.
- Heller, R. Esnault, R. Lance, C. 1995. *Physiologie végétale*. Tome 2. Développement. 5^e Edition mise à jour et augmentée. Masson. Paris-Milan-Barcelone. 315 p.

- ICCO, 2000. Célébration du cacao. Organisation Internationale du Cacao (ICCO). Publié par K. P. Parteniers in Publishing Ltd 2000. Imprimé et relié par Interprint, (Malte). 115 p.
- ICCO, 2005. Rapport annuel 2004 / 2005. Copyright © 2006. The International Cocoa Organization (ICCO). Commonwealth House, 1-19 New Oxford Street. Londres WC1A 1NU, Royaume-Uni. 12.
- Knight R., and Rogers H., 1955. Incompatibility in *Theobroma cacao* L. *Heredity*, 9 : 67-69.
- Kofler L., 1969. Croissance et développement des plantes. Gauthier Villar, Paris. 234 p.
- Kononowicz A.K. and Janick J., 1984; *In vitro* development of zygotic embryos of *Theobroma cacao* L. *J. Amer. Soc. HortScience*. 109 : 266-269.
- Kouamanan oi Kouamanan B. 2001. Multiplication végétative du cacaoyer : contribution à la recherche de substrat de bouturage. Mémoire de Maîtrise. Protection des végétaux et de l'environnement. Université d'Abobo Adjamé. 43 p.
- Lanaud C., Motamayor J. C., Sounigo O., 1999. Le cacaoyer. Editeurs scientifiques Perla Hamon., Seguin M., Perrier X., Glazsmann J. C. Diversité génétique des plantes tropicales cultivées. CIRAD éditeur, France. 386 p.
- Li Z., Traoré A., Maximova S. et Gultinan, M. J., 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cocoa (*Theobroma cacao* L.) using Thidiazuron. *In vitro Cell Developmental Biology*. 34: 293-299.
- Lieberei R. et Rohsius C., 2002. Cocoa atlas. Edition 2002. Electronic version.
- Litz R. E., 1986. Tissue culture studies with *Theobroma cacao* L. In : Dimick, P, S, (Ed.), *Cocoa Biotechnology Symposium*. Dept. Food Science, Penn State Univ., University Park, p. 111-120.
- Lloyd G. and Mc Cown B. 1980. Commercially feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia Latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 30 : 421-427.
- Lockwood G. and Gyamfi M. M. O., 1979. The CRIG cocoa germplasm collection with notes on codes used in the breeding programme at Tafo and elsewhere. *Cocoa Research Institut, Ghana. Technical Bulletin n° 10.* 62 p.
- Lopez-Baez, O., Bollon, H., Eskes, A. et Petiard, V. 1993. Embryogenèse somatique de cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) à partir des pièces florales. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie / Life sciences.* 316 : 579-584.
- Maximova S. N., Alemanno L., Young A., Ferrière N., Traoré A., et Gultinan M. J., 2002. Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 38 : 252-259.
- Montoro P., Niemenak N., Rio M., Alemanno L., 2005. Some genes expressed in *Theobroma cacao* L. zygotic and somatic embryos. *Ingenic Newsletter* 10 : 08-10.
- Mossu G., 1990. Le cacaoyer. Editeurs Lienhart & C^{ie}, Aubenas d'Ardèche, France. ACCT-CTCAR. 159 p.
- Ngoran J. A. K. et Paulin D., 1988. Test de géniteurs. Fiche technique de conception et d'évaluation de l'essai. Génétique de cacaoyer. IFCC-Bingerville ; parcelle C2-1 / 0,95 ha. 1 p.
- Ngoran J. A. K., 1996. Proposed manuscript to the *International workshop on the utilisation of the genetic resources of the international cocoa genebank*. Trinidad, June 23rd -28th. 7 p.
- Novak F. J., Donini B., and Owusu G., 1986. Somatic embryogenesis and *in vitro* plant development of cocoa (*Theobroma cacao* L.). In *Proceeding International FAO/IAEA*

- Symposium Nuclear Techniques and *in vitro* culture for plant improvement. IAEA, Vienna, Austria: 443-449.
- Paulin D. 1994. Les méthodes de sélection du cacaoyer. Dans : Traitement statistique des essais de sélection. Stratégie d'amélioration des plantes pérennes. Montpellier, France. Editeur CIRAD-CP. p 243-257.
- Pence V.C., Hasegawa P.M. and Janick J., 1981. Sucrose-mediated regulation of fatty acid composition in asexual embryos of *Theobroma cacao* L. *Physiology plant*. Copenhagen. 53 : 378-384.
- Pence V.C., 1989. Cacao (*Theobroma cacao* L.). In : Biotechnology in agriculture and forestry. Ed. by Y.P.S. Bajaj. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Vol. 5. Trees II. 203-221.
- Pence V.C., 1991. Abscissic acid and the maturation of cacao embryos *in vitro*. *Plant physiology*. 98 : 1391-1395.
- Santos M. de Oliveira, Albuquerque de Barros É. V. S., Tinoco M. L.P., Brasileiro A. C. M., Aragão F. J. L., 2002. Repetitive somatic embryogenesis in cacao and optimisation of gene expression by particle bombardment. *J. Plant Biotechnology*. 4 : 71-76.
- Santos M. de Oliveira, Romano E., Yotoko K. S. C., Tinoco M. L. P., Dias B. B. A., Aragão F. J. L., 2005. Characterisation of the cacao somatic embryogenesis receptor-like kinase (SERK) gene expressed during somatic embryogenesis. *Plant Science* 168 : 723–729.
- Sibi M. et Blanchard M., 1982. Les variants peuvent-ils être orientés ? Dans : Les cultures végétales *in vitro*. Réalités industrielles. Conférences colloques apria. 26 mai 1982. Y. Demarly Editeur. Paris, 27 – 52 p.
- Söndahl M., Sereduk T.B., Chen Z., Bellato C.M., 1989. somatic embryogenesis and plant regeneration of cocoa. Patent 88 / 3078, Jan. 25 1989, Rep. South Africa.
- Söndahl M.R., Lui S. and Bellato C., 1993. Cacao somatic embryogenesis. *Acta horticulturae. In vitro culture*. 336 : 245-248.
- Tan C.L. and Furtek D.B. 2003. Development of an *in vitro* regeneration system for *Theobroma cacao* from mature tissues. *Plant Science* 164 : 407-412.
- Tulecke W. and Mc Granahan G., 1985. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledons of walnut, *Juglans regia* L. *Plant Science*, 1985. 40: 57-63.
- Wang Y. C. and Janick J., 1984. Inducing precocious germination in asexual embryos of cacao. *HortScience*. 19: 839-841.
- Wen M.C. and Kinsella J.E, 1991. Somatic and plantlet regeneration of *Theobroma cacao* L. *Food and technology*, 5(2), 119-137. Cryopreservation of immature embryos of *Theobroma cacao* L. *Plant Cell Reports*. Springer-Verlag. 10: 144-147.
- Whitlock B. A., Bayer C., Baum D. A., 2001. Phylogenetic relationships and floral evolution of the Byttnerioideae ("Sterculiaceae" or Malvaceae s.l.) based on sequences of the chloroplast gene, *ndhF*. John V; Freudenstein Editeur. *Systematic botany*. 26 (2) : 420-437.
- Wood G.A.R. and Lass R.A., 1985. Cocoa. Tropical agriculture series. Longman. Fourth edition. 620 p.

PUBLICATIONS ET ANNEXES

PUBLICATIONS

Les résultats obtenus ont été valorisés sous forme de 2 articles soumis à 2 revues scientifiques internationales distinctes à comité de lecture. Seul le premier article est paru avant la soutenance de la thèse. Il s'agit de :

1) Auguste Emmanuel ISSALI, Abdoulaye TRAORE, Edmond Kouablan KOFFI, Jeanne Andi Kohi NGORAN and Abdourahamane SANGARE, 2008. Characterization of callogenic and embryogenic abilities of some genotype of cocoa (*Theobroma cacao* L.) under selection in Côte d'Ivoire. *Biotechnology* 7 (1) : 51-58.

2) Relationship between some phenological parameters and somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. a été soumis pour publication à la revue coréenne dénommée *Journal of Crop Science and Biotechnology* (JCSB).

ANNEXES

ANNEXE I.

I. Formulations des milieux : Protocole de Li *et al.*, (1998) ; Pennsylvania State University.

Primary Callus Growth Medium (PCG)

Pour 1L

	PCG3	PCG1	PCG4
DKW macro A (10X)	100 ml	100 ml	100 ml
DKW macro B (10X)	100 ml	100 ml	100 ml
DKW micro (100X)	10 ml	10 ml	10 ml
DKW vitamines (1000X)	1 ml	1 ml	1 ml
Glucose	20 g	20 g	20 g
Glutamine	250 mg	250 mg	250 mg
Myo-Inositol	100 mg	100 mg	100 mg
2,4 D (1mg/ml stock)	1 ml	2 ml	4 ml
TDZ (0,25mg/ml stock)	10 µl	20 µl	40 µl
pH 5,8 (1M KOH)			
Phytigel	2 g	2 g	2 g
Autoclave	20min.		

Note :

1. Conserver les solutions mères DKW macro A, DKW macro B, DKW micro à 4 °C ; renouveler chaque mois.
2. Conserver la solution des vitamines DKW à -20 °C aliquotes ; la préparer tous les 3 à 4 mois ; renouveler tous les 3 à 4 mois.
3. Conserver les solutions mères de 2,4-D et TDZ à 4 °C ; renouveler tous les 2 mois.

Secondary Callus Growth Medium (SCG1)

	1 L	2 L
Mc Cown's salts (sigma M- 6774)	2.3 g	4.6 g
B5 vitamines (1000X stock)	1 ml	2 ml
Glucose	20 g	40 g
Eau de coco	50 ml	100 ml
2,4-D (1mg/ml solution mère)	2 ml	4 ml
Kinéline (1mg/ml solution mère)	300 µl	600 µl
pH : 5.7 (1M KOH)		
Phytigel	2 g	2X2 g
Autoclave :	20 min.	

Note :

1. Conserver les sels de Mc Cown's (sigma M-6774) à une température de 4 °C dans un dessiccateur.

2. Conserver la solution de vitamines B5 vitamines à une température de -20 °C ; préparer et conserver au frais sous forme d'aliquotes de 1 ml et renouveler tous les 3 ou 4 mois.
3. Préparer et conserver au frais la solution mère de Kinétine à une température de 4 °C et renouveler tous les 3 ou 4 mois.
4. Conserver la solution mère de 2,4-D à une température de 4 °C ; renouveler tous les 2 mois.

Embryo Development Medium (ED)

	1 L	2 L
DKW macro A (10X)	100 ml	200 ml
DKW macro B (10X)	100 ml	200 ml
DKW micro (100X)	10 ml	200 ml
DKW vitamines (1000X)	1 ml	2 ml
Sucrose	30 g	60 g
Glucose	1 g	2 g
pH : 5,7 (1M KOH)		
phytagel	2 g	2x2 g
Autoclave :	20 min.	

NOTE :

1. Conserver les solutions mères DKW macro A, DKW macro B, DKW micro au frais à 4 °C; les renouveler chaque mois.
2. Conserver la solution mère des vitamines DKW à une température de 4 °C aliquotes ; la préparer tous les 3 ou 4 mois.

II. Formulations des solutions mères

DKW 10X Macro Elements Solutions A & B

Solution A	1 L	2 L
NH ₄ NO ₃	14.16 g	28.32 g
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	19.69 g	39.36 g
Solution B	1 L	2 L
CaCl ₂ .2H ₂ O	1.49 g	2.98 g (toujours en 1 ^{er})
K ₂ SO ₄	15.59 g	31.80 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O		7.40 g 14.80 g
KH ₂ PO ₄	2.65 g	5.30 g

Conserver les solutions mères DKW macro A et DKW macro B à une température de 4 °C et renouveler tous les mois. Utiliser 100 ml de chaque pour 1 L de milieu.

Solutions mères DKW Micro Éléments 100X

	1 L	0,5 L
Zn(NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	1,700 g	0,8500 g
MnSO ₄ . H ₂ O	3,340 g	1,6700 g

CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,025 g	0,0125 g
H ₃ BO ₃	0,480 g	0,2400 g
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,039 g	0,0200 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	3,380 g	1,6900 g
Na-EDTA	4,540 g	2,2700 g

Conserver la solution mère à une température de 4 °C ; renouveler tous les mois. Utiliser 10 ml pour 1L de milieu.

Solution mère DKW vitamines 1000X.

	100 ml	50 ml
Myo-Inositol	10 g	5 g
Thiamine-HCL	0,2 g	0,1 g
Acide nicotinique	0,1 g	0,05 g
Glycine	0,2 g	0,1 g

Solution mère vitamine B5 1000X

	50 ml
Myo-Inositol	5 g
Acide nicotinique	50 mg
Pyridoxine	50 mg
Thiamine	500 mg

Conserver les solutions mères à une température de – 20 °C sous forme d'aliquotes de 1ml. Utiliser 1ml pour 1L de milieu.

Solution mère des amino-acides 1000X

	100 ml
Arginine	43,55 mg
Glycine	18,76 mg
Leucine	32,80 mg
Lysine	45,65 mg
Tryptophane	51,05 mg

Solution à conserver à une température de –20 °C et à renouveler tous les 3 ou 4 mois. Utiliser 1 ml pour 1 L de milieu.

Solutions mères de régulateurs de croissance de plantes

TDZ (0,25 mg / ml) : dissoudre et conserver dans du DMSO à une température de 4°C. Renouveler la solution chaque 2 mois.

2,4 D (1 mg / ml) : dissoudre et conserver dans l'éthanol 100 % ou 95 % à une température de 4 °C. Renouveler la solution chaque 2 mois.

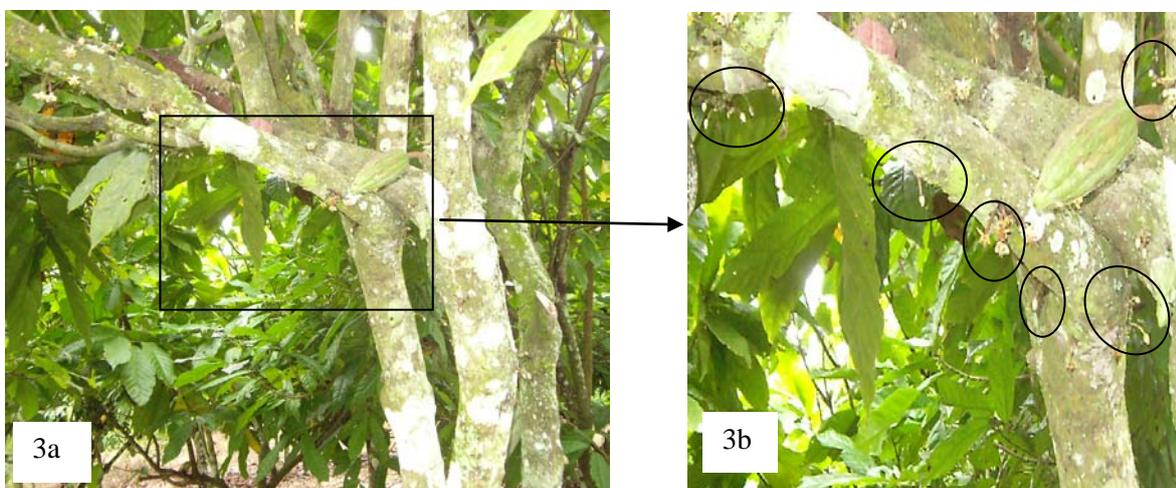
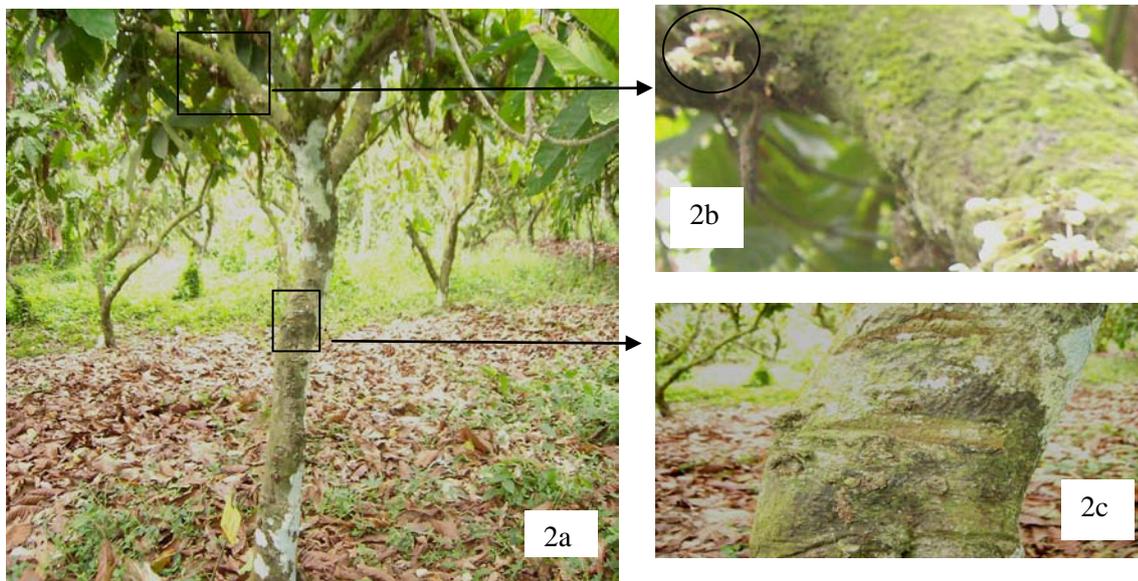
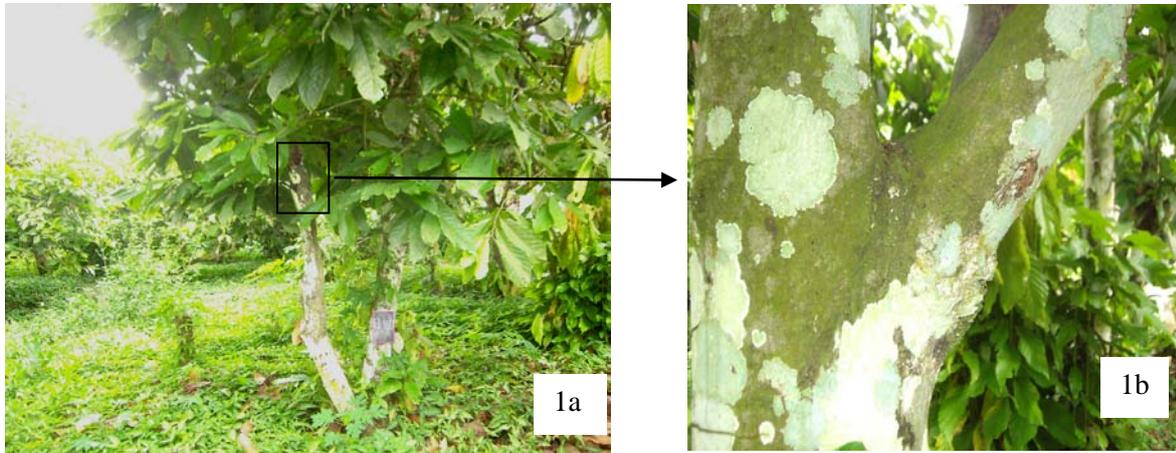
Kinéline (1 mg / ml) : dissoudre dans du NaOH 1N à 1/20 du volume final et ajuster celui-ci avec de l'eau. Conserver la solution à une température de -20 °C. Renouveler la solution tous les 3 ou 4 mois.

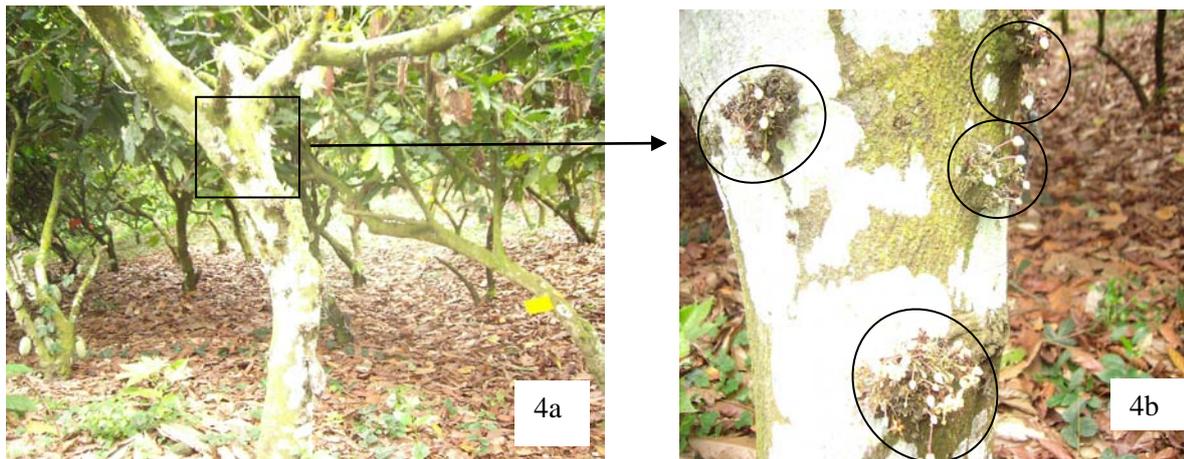
BA (1 mg / ml) : dissoudre dans du NaOH 1N à 1/20 du volume final et ajuster celui-ci avec de l'eau. Conserver la solution à une température de 4 °C. Renouveler la solution tous les 2 mois.

IBA (1 mg / ml) : dissoudre dans du NaOH 1N à 1/20 du volume final et ajuster celui-ci avec

de l'eau. Conserver la solution à une température $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Renouveler la solution tous les 2 mois.

ANNEXE II : Images illustrant la correspondance entre l'état phénologique (niveau de floraison, rythme des poussées foliaires et niveau de fructification) et l'échelle de mesure utilisée



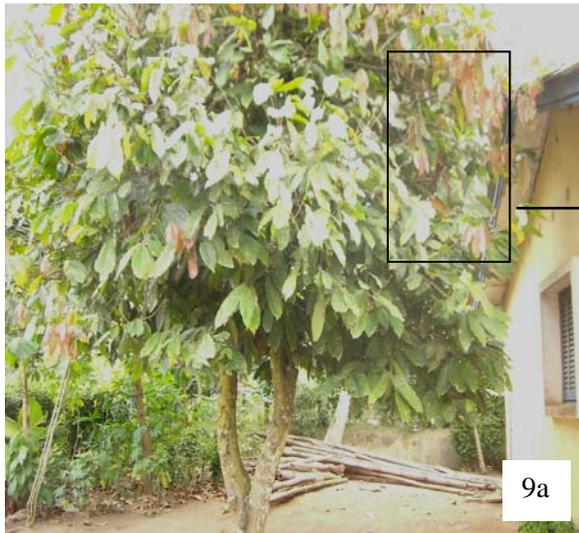


Figures 1a à 5c : Vues d'ensemble et détaillées des pieds de cacaoyer montrant les différents niveaux de floraison (NIVFLO) à partir de la couverture du tronc et des rameaux en fleurs, selon l'échelle de mesure choisie (0, 25, 50, 75 et 100 %).

Légende des figures

1a et 1b, niveau de floraison correspondant à 0 % et caractérisé par l'absence de fleurs sur le tronc et les rameaux ; 2a et 2b, niveau de floraison se rapportant à 25 % et marqué par l'absence de fleurs sur le tronc, mais leur présence très clairsemée sur les rameaux (surfaces encadrées) ; 3a et 3b, niveau de floraison correspondant à 50 % et traduit par une présence ponctuelle de fleurs sur le tronc, mais leur présence relativement clairsemée sur les rameaux ; 4a et 4b, niveau de floraison correspondant à 75 % et caractérisé par une présence de fleurs groupées en inflorescences relativement clairsemées sur le tronc et sur les rameaux ; 5a, 5b et 5c, niveau de floraison correspondant à 100 % et marqué par une importante couverture du tronc et des rameaux par les inflorescences.





Figures 6a à 10b : Vues d'ensemble et détaillées des pieds de cacaoyer montrant les différents rythmes des poussées foliaires (RYTHPF) reconnaissables à l'émergence de nouvelles feuilles anthocyanées au niveau des bourgeons axillaires, selon l'échelle de mesure choisie (0, 25, 50, 75 et 100 %).

Légende des figures

6a et 6b, rythme des poussées foliaires correspondant à 0 % et caractérisé par l'absence de nouvelles feuilles au niveau de tous les bourgeons ; 7a et 7b, rythme de poussées foliaires se rapportant à 25 % et marqué par la présence de nouvelles feuilles (surfaces encerclées) sur le 1/4 des bourgeons du pied ; 8a et 8b, rythme des poussées foliaires correspondant à 50 % et traduit par une présence de nouvelles feuilles sur près de la moitié des bourgeons du pied ; 9a et 9b, rythme des poussées foliaires correspondant à 75 % et caractérisé par une présence de nouvelles feuilles sur près de 3/4 des bourgeons du pied ; 10a et 10b, rythme des poussées foliaires correspondant à 100 % et marqué par la présence de nouvelles feuilles sur la quasi-totalité ou la totalité des bourgeons.

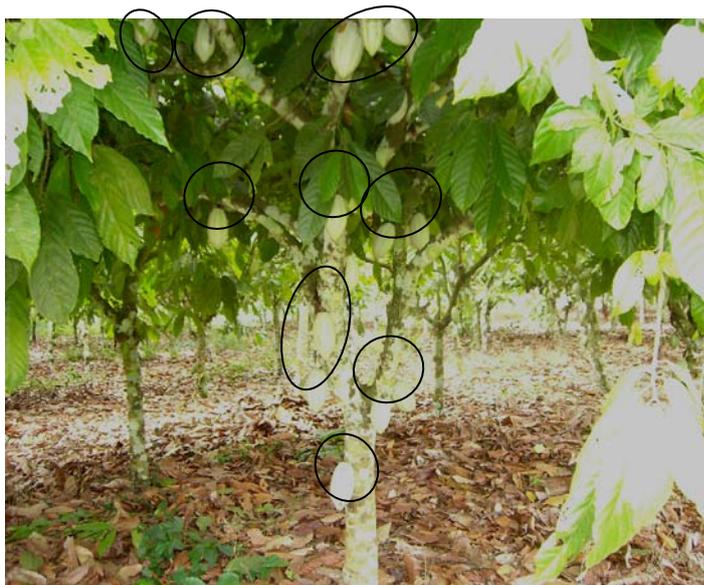


Figure 11 : Vue d'ensemble d'un pied de cacaoyer illustrant le niveau de fructification (NIVFRU), apprécié par comptage exhaustif des chérelles, cabosses vertes et murs portées par le tronc et les rameaux (surfaces encerclées).

ANNEXES III : Examen des effets individuels et des interactions entre les facteurs du dispositif d'évaluation de la callogénèse et de l'embryogénèse pour les géniteurs des hybrides

Source	Variable dépendante*	SCE* type III	ddl*	CM*	F*	P*
Modèle corrigé	Nexcal	63,822	19	3,359	2,813	0,000
	Mexemb	889,450	19	46,813	9,496	0,000
Constante	Nexcal	7572,266	1	7572,266	6341,159	0,000
	Mexemb	445,606	1	445,606	90,386	0,000
Géniteur	Nexcal	53,617	4	13,404	11,225	0,000
	Mexemb	318,029	4	79,507	16,127	0,000
Explant	Nexcal	0,409	1	0,409	0,343	0,559
	Mexemb	1,921	1	1,921	0,39	0,533
Milieu	Nexcal	2,049	1	2,049	1,715	0,191
	Mexemb	3,776	1	3,776	0,766	0,382
Géniteur x Explant	Nexcal	7,516	4	1,879	1,574	0,181
	Mexemb	50,128	4	12,532	2,542	0,231
Géniteur x Milieu	Nexcal	2,650	4	0,662	0,555	0,696
	Mexemb	16,873	4	4,218	0,856	0,491
Explant x Milieu	Nexcal	0,162	1	0,162	0,136	0,713
	Mexemb	6,655	1	6,655	1,35	0,246
Géniteur x Explant x Milieu	Nexcal	0,137	4	0,034	0,029	0,998
	Mexemb	3,014	4	0,754	0,153	0,962
Erreur	Nexcal	404,815	339	1,194		
	Mexemb	1671,281	339	4,930		
Total	Nexcal	8234,680	359			
	Mexemb	3150,990	359			
Total corrigé	Nexcal	468,637	358			
	Mexemb	2560,731	358			

Légende :

Variable dépendante : Variables dépendantes transformées. **SCE :** Somme des carrés des écarts. **ddl :** Nombre des degrés de liberté. **CM :** Carrés moyens. **F :** Rapport du carré moyen factoriel sur le carré moyen résiduel. **P :** Niveau de signification de l'effet du facteur ou de l'interaction au seuil de 5 %. **En gras :** Pour chaque facteur (génotype, explant et milieu d'induction), la valeur de $P < 0,05$ permet au descripteur correspondant de structurer les variantes du facteur en classes distinctes; pour les interactions, la valeur de $P > 0,05$ permet au descripteur concerné d'être indépendant de la variation simultanée des facteurs pour lesquels il a été mesuré. **Nexcal :** Nombre d'explant callogène. **Mexemb :** Moyenne d'embryons obtenus par explant embryogène.

ANNEXES VI : Classification des moyennes de callogenèse et d'embryogenèse en fonction des variantes de combinaisons de facteurs génotype et explant, puis génotype et milieu d'induction des hybrides et des géniteurs.

1. Chez les hybrides

1.1. Classification des moyennes d'embryogenèse en fonction de variantes de la combinaison de facteurs génotype et explant au cours de la première année d'étude (Inspiré du tableau XXVIII).

Combinaison Génotype_Explant	Moyenne transformée	CV (%)*	Moyenne non transformée
L232-A9_St	0,000 a	∞	0,000
L232-A9_Pt	0,000 a	∞	0,000
L233-A4_St	0,069 a	188,41	0,005
L120-A2_St	0,101 a	126,73	0,010
C151-61_St	0,122 ab	104,92	0,015
L330-A9_Pt	0,146 ab	87,67	0,021
L330-A9_St	0,169 ab	76,33	0,029
SCA6_St	0,248 a b	51,61	0,062
L233-A4_Pt	0,288 ab	44,79	0,083
L231-A4_St	0,290 ab	44,14	0,084
L126-A3_St	0,312 ab	40,06	0,097
L126-A3_Pt	0,419 ab	30,31	0,176
L231-A4_Pt	0,481 ab	26,61	0,231
L120-A2_Pt	0,686 b	18,51	0,471
SCA6_Pt	2,161 c	5,51	4,670
C151-61_Pt	2,548 d	4,51	6,492

Légende

St : Staminodes ; **Pt :** Pétales

1.2. Classification des moyennes d'embryogenèse en fonction de variantes de la combinaison de facteurs génotype et milieu durant la première année d'étude (Inspiré du tableau XXVIII).

Combinaison Génotype_Milieu	Moyenne transformée	CV (%)	Moyenne non transformée
L232-A9_PCG4	0,000 a	∞	0,000
L233-A4_PCG4	0,000 a	∞	0,000
L232-A9_PCG1	0,000 a	∞	0,000
L232-A9_PCG3	0,000 a	∞	0,000
L233-A4_PCG3	0,046 ab	347,83	0,002
L330-A9_PCG4	0,064 ab	245,31	0,004
L330-A9_PCG3	0,100 ab	157,00	0,010
L126-A3_PCG1	0,109 ab	143,12	0,012
L120-A2_PCG3	0,291 abc	53,61	0,085
L231-A4_PCG3	0,295 abc	53,22	0,087
L330-A9_PCG1	0,309 abc	51,13	0,095
L120-A2_PCG1	0,386 abc	40,67	0,149
L231-A4_PCG4	0,412 abc	38,11	0,170
L126-A3_PCG3	0,423 abc	36,17	0,179
L231-A4_PCG1	0,450 abc	34,67	0,203
L233-A4_PCG1	0,490 abc	32,04	0,240
L120-A2_PCG4	0,503 abc	30,82	0,253
L126-A3_PCG4	0,565 abc	27,26	0,319
C151-61_PCG4	0,809 bcd	18,91	0,654
SCA6_PCG1	0,964 cd	15,87	0,929
SCA6_PCG4	1,178 de	12,73	1,388
SCA6_PCG3	1,472 ef	10,26	2,167
C151-61_PCG3	1,592 ef	9,17	2,534
C151-61_PCG1	1,603 f	9,23	2,570

1.3. Classification des moyennes d'embryogenèse en fonction de variantes de la combinaison de facteurs génotype et explant au cours de la seconde année d'étude (Inspiré du tableau XXIX)..

Combinaison Génotype_Explant	Moyenne transformée	CV (%)	Moyenne non transformée
L232-A9_Pt	0,000 a	∞	0,000
L232-A9_St	0,009 a	17,67	0,000
L330-A9_Pt	0,033 a	4,88	0,001
L330-A9_St	0,106 a	1,50	0,011
L233-A4_St	0,121 a	1,32	0,015
L120-A2_St	0,125 a	1,28	0,016
L231-A4_St	0,319 a	0,50	0,102
L126-A3_Pt	0,412 a	0,39	0,170
C151-61_St	0,424 a	0,38	0,180
SCA6_St	0,568 a	0,28	0,323
L126-A3_St	0,611 a	0,26	0,373
L120-A2_Pt	0,764 a	0,21	0,584
L231-A4_Pt	0,777 a	0,20	0,604
L233-A4_Pt	0,844 a	0,19	0,712
SCA6_Pt	5,410 b	0,02	29,268
C151-61_Pt	5,604 c	0,02	31,405

1.4. Classification des moyennes d'embryogenèse à partir de variantes de la combinaison de facteurs génotype et milieu durant la seconde année d'étude (Inspiré du tableau XXIX).

Combinaison Génotype_Milieu	Moyenne transformée	CV (%)*	Moyenne non transformée
L126-A3_PCG3	0,000 a	∞	0,000
L330-A9_PCG3	0,000 a	∞	0,000
L232-A9_PCG1	0,000 a	∞	0,000
L232-A9_PCG3	0,000 a	∞	0,000
L232-A9_PCG4	0,013 a	1507,69	0,000
L330-A9_PCG1	0,098 ab	196,94	0,010
L330-A9_PCG4	0,112 ab	173,21	0,013
L233-A4_PCG1	0,250 ab	78,40	0,063
L120-A2_PCG1	0,270 ab	71,85	0,073
L231-A4_PCG3	0,312 ab	62,50	0,097
L126-A3_PCG1	0,339 b	57,52	0,115
L120-A2_PCG3	0,388 b	50,52	0,151
L231-A4_PCG1	0,528 b	36,74	0,279
L233-A4_PCG4	0,598 b	32,44	0,358
L233-A4_PCG3	0,600 b	32,50	0,360
L120-A2_PCG4	0,675 b	29,19	0,456
L231-A4_PCG4	0,804 b	24,25	0,646
L126-A3_PCG4	1,195 b	16,49	1,428
SCA6_PCG3	2,471 c	7,00	6,106
C151-61_PCG1	2,911cd	5,91	8,474
C151-61_PCG3	2,991cd	5,92	8,946
SCA6_PCG1	3,095cd	5,30	9,579
C151-61_PCG4	3,141cd	5,35	9,866
SCA6_PCG4	3,402 d	4,91	11,574

2. Chez les géniteurs

2.1. Classification des moyennes de callogenèse selon les variantes de la combinaison de facteurs géniteur et explant durant la seconde année d'expérimentation (Inspiré du tableau de l'annexe V)

Combinaison Géniteur_Explant	Moyenne transformée	CV (%)	Moyenne non transformée
Pa150_St	3,851 a	5,01	14,830
Pa150_Pt	4,110 ab	4,70	16,892
Pa121_St	4,396 abc	4,25	19,325
Pa121_Pt	4,421 abc	4,23	19,545
IMC67_Pt	4,668 bcd	3,96	21,790
Pa13_Pt	4,805 bcd	3,23	23,088
P19_St	4,851 cd	3,57	23,532
IMC67_St	4,876 cd	3,84	23,775
P19A_Pt	4,981 cd	3,75	24,810
Pa13_St	5,351d	3,49	28,633

2.2. Classification de moyennes d'embryogenèse en fonction des variantes de la combinaison de facteurs géniteur et explant durant la seconde année d'expérimentation (Inspiré du tableau de l'annexe V)

Combinaison Géniteur_Explant	Moyenne transformée	CV (%)	Moyenne non transformée
Pa121_Pt	0,000 a	∞	0,000
Pa121_St	0,000 a	∞	0,000
Pa13_St	0,088 a	432,95	0,008
IMC67_St	0,176 a	216,48	0,031
Pa150_St	0,419 a	93,79	0,176
Pa150_Pt	0,771 a	50,97	0,594
P19A_Pt	0,828 a	46,01	0,686
IMC67_Pt	1,215 a	30,86	1,476
Pa13_Pt	3,172 b	9,90	10,062
P19A_St	4,565 c	7,71	20,839

Légende

Moyenne* : les moyennes affectées de la même lettre ne sont pas statistiquement différentes au seuil de 5 % selon le test de Student Newman et Keuls.

2.3. Classification des moyennes de callogenèse selon les variantes de la combinaison de facteurs géniteur et milieu durant la seconde année d'expérimentation (Inspiré du tableau de l'annexe V)

Combinaison Géniteur_Milieu	Moyenne transformée	CV (%)	Moyenne non transformée
Pa150_PCG3	3,843 a	0,193	14,769
Pa150_PCG1	4,118 ab	0,193	16,958
Pa121_PCG3	4,295 abc	0,187	18,447
Pa121_PCG1	4,523 abc	0,187	20,458
IMC67_PCG1	4,701 bc	0,187	22,099
P19A_PCG3	4,745 bc	0,182	22,515
IMC67_PCG3	4,842 bc	0,185	23,445
Pa13_PCG3	5,048 c	0,172	25,482
P19A_PCG1	5,086 c	0,178	25,867
Pa13_PCG1	5,107 c	0,172	26,081

2.4. Classification des moyennes d'embryogenèse en fonction des variantes de la combinaison de facteurs géniteur et milieu durant la seconde année d'expérimentation (Inspiré du tableau de l'annexe V)

Combinaison Géniteur_Milieu	Moyenne transformée	CV (%)	Moyenne non transformée	Combinaison Géniteur_Milieu	Moyenne transformée	CV (%)	Moyenne non transformée
Pa121_PCG3	0,000 a	∞	0,000	Pa150_PCG1	0,925 abc	42,49	0,856
Pa121_PCG1	0,000 a	∞	0,000	Pa13_PCG1	1,514 bcd	23,05	2,292
Pa150_PCG3	0,265 a	148,30	0,070	Pa13_PCG3	1,746 cd	19,99	3,049
IMC67_PCG1	0,603 ab	63,18	0,364	P19A_PCG3	2,300 de	16,13	5,290
IMC67_PCG3	0,789 abc	47,53	0,623	P19A_PCG1	3,093 e	11,70	9,567