

MULTIPLICATION VÉGÉTATIVE *IN VITRO* DE L'ARABUSTA



P. DUBLIN

Directeur de recherches ORSTOM

Laboratoire de culture *in vitro*, GERDAT, Montpellier *

INTRODUCTION

Jusqu'à une date récente, les recherches sur la culture de tissus végétaux avaient été limitées presque uniquement aux plantes des pays tempérés. Depuis quelque temps, ces types de recherche ont été étendus aux plantes tropicales et, à l'heure actuelle, il existe plusieurs exemples pratiques de l'utilisation des techniques de culture *in vitro* dans l'amélioration génétique des plantes tropicales utiles.

Les cultures de tissus peuvent présenter différents aspects, différentes formes, en fonction des organes mis en culture et en fonction du type de développement imposé à ceux-ci. Parmi ces différentes formes, la multiplication végétative *in vitro* est, sans aucun doute, la plus répandue et celle qui a le plus contribué au développement que connaît aujourd'hui l'emploi de ces techniques.

Chez le caféier, la multiplication végétative *in vitro* constitue un des thèmes principaux de recherche sur la culture de tissus de ces végétaux.

On doit à Staritsky d'avoir pour ainsi dire ouvert la voie à la multiplication végétative *in vitro* du caféier, par sa découverte de plusieurs cas d'embryogenèse somatique chez *C. canephora* en 1970.

Depuis, plusieurs auteurs, Harn, Söndahl..., ont, avec des succès différents, expérimenté les techniques de culture *in vitro* dans la multiplication végétative des caféiers.

La plupart de ces travaux ont été effectués sur Arabica, espèce autogame, dont la reproduction conforme par graines peut facilement être obtenue.

Le présent travail a été réalisé principalement sur

le caféier Arabusta. C'est un caféier hybride F_1 de *C. arabica* et de *C. canephora*, créé par Capot en Côte d'Ivoire. Pour des raisons génétiques, démontrées par ailleurs expérimentalement, ce caféier hybride ne peut être reproduit de façon conforme que par voie végétative.

Toute multiplication par graines conduit à un éclatement génétique, débouchant alors sur des populations très hétérogènes et non exploitables au plan économique.

Au terme de sa sélection, tout caféier adulte, tête de clone nouvellement sélectionné ne fournit qu'un nombre réduit de boutures orthotropes utilisables pour la reproduction végétative.

A l'heure actuelle, il faut donc un temps considérable entre le moment où le tête de clone Arabusta est sélectionné et celui où le taux de multiplication en condition horticole aura atteint un niveau suffisant pour que ce nouveau clone puisse passer en grande culture.

En conséquence, toute technique qui permettra d'augmenter, dès le début, le taux de multiplication conforme d'un caféier tête de clone et d'accélérer ainsi l'installation des jardins de bois de bouturage présente un intérêt réel pour l'amélioration génétique de ces plantes.

Les recherches que nous avons entreprises, en vue de la mise au point d'une technique de multiplication végétative *in vitro* de l'Arabusta et autres caféiers répondent à cette préoccupation.

Ces recherches ont été orientées dans deux directions :

- La première orientation comporte l'induction de bourgeons et de tiges néoformés, suivi d'un bouturage *in vitro*.

- La deuxième orientation comprend l'obtention

Exposé présenté au 9^e colloque scientifique international sur le café, Londres, juin 1980.

* Centre Gerdar, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex.

tion d'embryons somatiques et le développement de ceux-ci en plantules organisées.

Le matériel végétal utilisé pour ces recherches comprenait :

— Des clones sélectionnés en Côte d'Ivoire et cultivés en serre à Montpellier.

— Des plantules cultivées en tubes, en conditions stériles, sur agar et sur vermiculite.

BOUTURAGE DIRECT *IN VITRO*

En raison du dimorphisme végétatif des caféiers cultivés, les boutures chlorophylliennes des ramifications orthotropes sont les seules utilisables au plan pratique.

Les bourgeons orthotropes de ces boutures très fragiles sont cependant bien protégés par les stipules.

Plusieurs tentatives de culture *in vitro* de nœuds de ces tiges orthotropes ont été faites dans le but de promouvoir le développement des bourgeons orthotropes restés latents, et d'obtenir des tiges orthotropes, débarrassées de tout germe, utilisables en bouturage *in vitro*.

Ces essais ont été réalisés sur substrats divers (agar, vermiculite, pont de papier filtre). Des essais de culture de bourgeons isolés ont également été faits.

Dans tous les cas, les résultats ont été décevants ; sur milieu agar, on assiste dans les quelques jours qui suivent la mise en place des explants à une pullulation de bactéries qui conduit à une mort plus ou moins rapide des explants.

L'emploi de produits anti-oxydants (cystéine, DIECA, DTT *) pour combattre l'action des phénols (toujours abondants chez les *Canephora* et les *Arabusta*), d'antibiotiques et de bactéricides pour détruire les bactéries, n'ont pas amélioré de façon satisfaisante les résultats.

L'obtention *in vitro* de tiges à partir de bourgeons orthotropes déjà existants s'étant révélée difficile et d'une rentabilité insuffisante, les recherches furent alors orientées vers l'induction de tiges néoformées, à partir de fragments d'entre-nœuds débarrassés de leurs stipules et donc plus faciles à désinfecter que les fragments de nœuds.

INDUCTION DE BOURGEONS NÉOFORMÉS

Les explants constitués de fragments d'entre-nœuds orthotropes jeunes de 1 cm de long sont placés verticalement, l'extrémité radicale plongeant dans le milieu.

La désinfection des explants est faite par un trempage (30 min) dans une solution à 10 % d'hypochlorite de Ca (220°) additionnée de quelques gouttes de Tween 80, suivi de trois rinçages à l'eau stérile.

Quatre milieux minéraux de base ont été expérimentés : deux comprenant les macro-éléments de Murashige et Skoog, deux autres basés sur les éléments de milieux N30K et N45K de Margara.

Dans tous les cas, le pH a été ajusté à 5,6 avant addition de l'agar, les milieux ont été autoclavés à 115 °C pendant 20 min.

Pour combattre les brunissements qui apparaissent aux extrémités des explants et qui sont dus à l'oxydation des phénols, on a utilisé des actions combinées du froid, de l'obscurité et d'anti-oxydants (20-30 g de cystéine dans les milieux de culture).

Par rapport au milieu témoin MS, les milieux 30K et 45K de Margara sont caractérisés par :

- une teneur en azote total plus faible,
- un rapport NH_4/N égal à 1/5, donc plus faible que MS (1/3),
- un rapport K/Ca égal à 3, également plus faible que pour MS.

(*) DIECA : Di-éthyl di-thio-carbamate.
DTT : Di-thio-threitol.

Composition minérale (en méq/l) des milieux de Murashige et Margara

Dénomination du milieu	N Total	NO ₃ ⁻	H ₂ PO ₄ ⁻	SO ₄ ⁻	Cl ⁻	K ⁺	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	NH ₄ ⁺⁺
MS	60,05	39,43	1,25	3	6	20,06	6	3	20,62
N30K	30	24	1	2	1	15	5	2	6
N45K	45	36	1	2	5	24	8	2	9

Milieux N30K et N45K de J. Margara (1978) en mg/l

Constituants	N30K	N45K
NH ₄ NO ₃	480	720
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	590	944
KNO ₃	1.313	1.818
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246	246
KH ₂ PO ₄	136	136
KCl	74,5	372,5

Milieu de Murashige et Skoog (1962)

Constituants	mg/l	mol/l
NH ₄ NO ₃	1.650	20,6 mmol
KNO ₃	1.900	18,8 mmol
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	2,99 mmol
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	1,50 mmol
KH ₂ PO ₄	170	1,25 mmol
H ₃ BO ₃	6,2	100 µmol
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3	100 µmol
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	29,9 µmol
KI	0,83	5,0 µmol
Na ₂ MO ₄ ·2H ₂ O	0,25	1,03 µmol
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,100 µmol
COCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,105 µmol
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	100 µmol
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37,3	100 µmol

Pendant toute la durée des expériences, les explants recevaient un éclairage de 4.000 lux, suivant un régime 12 h/nuit et 12 h/jour, les températures des salles de culture étaient de 26 ± 1 °C pour l'une et 28 ± 1 °C pour l'autre.

Dans ces conditions, on a successivement mis à l'épreuve l'action :

- du saccharose,
- des macro-éléments minéraux,
- des auxines (AIA-AIB-ANA),
- des cytokinines (kinétine, adénine, BAP, IPA),
- de divers constituants organiques (glycine, glutamine, extrait de malt).

Le complexe vitaminique de Morel, le plus souvent utilisé, a quelquefois été remplacé par un mélange d'Inositol (100 mg/l) et de thiamine (4 mg/l).

Les contrôles sont effectués au bout de six semaines et on note le nombre d'explants ayant fourni au moins un bourgeon, le nombre et le développement des bourgeons par explant.

Les résultats obtenus ont été groupés dans les tableaux I à V (p. 284 à 286).

Les bourgeons néoformés *in vitro* se développent rapidement et deux à trois mois après la mise en culture des explants, les tiges issues de bourgeons néoformés atteignent un développement suffisant pour être prélevées et découpées en boutures.

Ces boutures sont mises, en conditions aseptiques, successivement :

- 1) sur milieu d'induction de racines,
- 2) sur milieu de développement des racines,
- 3) sur terreau en conditions ordinaires de culture, où la bouture enracinée se développe en plante.

Le milieu de base d'induction de racines est composé de la solution d'éléments minéraux de Murashige et Skoog, diluée de moitié et additionnée de vitamines de Morel, de kinétine 1,0 mg/l, de saccharose 10 g/l et d'une auxine.

Trois auxines de rhizogenèse AIA, AIB et ANA ont été essayées à des concentrations variant entre 0,1 mg/l et 5 mg/l.

On constate, pour toutes ces auxines et en particulier pour l'ANA, que, au-delà de 2 mg/l, il y a apparition de signes évidents de toxicité se traduisant par une diminution du taux d'enracinement, doublée de tuméfaction exagérée des racines.

L'ANA, comparativement aux deux autres auxines AIA et AIB, conduit à des racines plus tuméfiées, de coloration ivoire et dont l'émission est toujours précédée par la formation d'un cal plus ou moins développé.

Les résultats les plus satisfaisants en ce qui concerne le taux d'enracinement, l'abondance et l'aspect des racines ont été obtenus avec un mélange de ANA et AIB dans la proportion de : AIA : 1,5 mg/l, AIB : 0,5 mg/l.

Dès que les boutures ont émis des racines de quelques millimètres de long, elles sont alors trans-

TABLEAU I
Action comparée de quatre milieux (macro-éléments) sur le taux de néoformation de bourgeons
chez les caféiers cultivés

Milieux	Nombre initial explants	Explants vivants	Explants avec bourgeon	Taux de néoformation (%)	Origine génétique
45K	24	13	1	7,7	R
30K	24	24	8	33,3	O
MS/2	24	18	4	22,2	B
MS	24	23	7	30,4	U
	—	—	—	—	S
Total	96	78	20	25,8	T
					A
45K	24	13	2	15,4	A
30K	24	20	11	55,0	R
MS/2	24	24	12	50,0	A
MS	24	16	4	25,0	B
	—	—	—	—	I
Total	96	73	29	39,7	C
					A
45K	24	22	7	31,8	L
30K	24	24	5	20,8	I
MS/2	24	23	4	17,3	B
MS	24	23	5	21,7	E
	—	—	—	—	R
Total	96	92	21	23,0	I
					C
					A
45K	24	20	8	40,0	A
30K	24	22	14	63,6	R
MS/2	24	22	12	54,5	A
MS	24	23	10	44,4	B
	—	—	—	—	U
Total	96	87	44	50,5	S
					T
					A

Milieu de base : Micro MS Vitamines de Morel
Fe EDTA Extrait de malt 400 mg/l
BAP 1,0 mg/l Saccharose 30 g/l

TABLEAU RÉCAPITULATIF
Action comparée de quatre milieux (macro-éléments) sur le taux de néoformation
chez les caféiers cultivés

Milieux	Nombre initial explants	Explants vivants	Explants avec bourgeon	Taux de néoformation (%)
45K	96	68	18	26,4
30K	96	90	38	42,2
MS/2	96	87	32	36,7
MS	96	85	26	30,5

TABLEAU II
Action de la teneur en saccharose sur la néoformation de bourgeons
chez l'Arabusta

Traitement	Nombre initial explants	Nombre explants vivants	Nombre explants avec bourgeon	Taux de néoformation (%)
MB + SAC 10 g/l	48	32	2	6,2
MB + SAC 30 g/l	48	38	14	36,8
MB + SAC 50 g/l	48	36	5	83,3
MB + SAC 100 g/l	48	24	5	20,8

MB = Milieu de base : Macro N30K Vitamines de Morel
MS Glycine 2 mg/l
Fe EDTA Extrait de malt 400 mg/l
BAP 1,0 mg/l

férées sur milieu de développement des racines, dont la composition est identique à celle du milieu d'induction de racines, mais où les auxines de rhizogénèse précédentes ont été supprimées.

Le substrat du milieu de développement racinaire peut être de l'agar ou mieux encore de la vermiculite.

Au bout de huit à dix semaines de séjour sur milieu de développement racinaire, les boutures

sont alors transférées sur terreau ordinaire où elles poursuivent leur développement en plantule.

Quelques mois après ce transfert en conditions ordinaires de culture, la jeune plantule a acquis un développement suffisant pour affronter les aléas d'une mise en plein champ.

Il est à remarquer que la souche d'origine, qui a fourni les premières tiges néoformées, peut continuer à fournir de nouvelles tiges pendant un temps

TABLEAU III
Action de diverses cytokinines et auxines
utilisées séparément et en combinaison sur les néoformations
de bourgeons chez l'Arabusta

Traitements	Nombre initial explants	Explants vivants	Explants avec bourgeon	Taux de néoformation (%)
MB + BAP 1,0 mg/l	24	18	8	44,4
MB + IPA 1,0 mg/l	24	14	8	57,1
MB + KIN 1,0 mg/l	24	14	3	21,4
MB + AIB 1,0 mg/l	24	15	3	20,0
MB + AIA 1,0 mg/l	24	20	6	30,0
MB + BAP 1,0 mg/l + AIB 1,0 mg/l	24	19	2	10,5
MB + BAP 1,0 mg/l + AIA 1,0 mg/l	24	18	2	11,1

MB = Milieu de base : Macro N30K
Micro MS
Fe EDTA

Vitamines de Morel
Glycine 2,0 mg/l
Extrait de malt 400 mg/l
Saccharose 30 g/l

TABLEAU IV
Action de différentes concentrations de BAP en présence de macro-éléments divers,
sur la néoformation de bourgeons chez l'Arabusta

Traitements	Nombre initial explants	Explants vivants	Explants avec néoformation	Taux de néoformation (%)
MB ₁	24	22	2	9,0
MB ₁ + BAP 1,0	24	16	15	93,7
MB ₁ + BAP 5,0	24	22	18	81,8
MB ₁ + BAP 10,0	24	20	13	65,0
Total	72	56	46	79,3
MB ₂ + BAP 1,0	24	20	14	70,0
MB ₂ + BAP 5,0	24	22	20	90,9
MB ₂ + BAP 10,0	24	22	16	72,7
Total	72	69	50	78,1
MB ₃ + BAP 1,0	24	20	10	50,0
MB ₃ + BAP 5,0	24	24	20	83,3
MB ₃ + BAP 10,0	24	12	10	83,3
Total	72	56	40	71,4

MB₁ = MS ms Fe EDTA, Vitamines de Morel, Glycine 2,0, Ext. malt 400, Sacc. 30
MB₂ = 30k ms Fe EDTA, Vitamines de Morel, Glycine 2,0, Ext. malt 400, Sacc. 30
MB₃ = 45k ms Fe EDTA, Vitamines de Morel, Glycine 2,0, Ext. malt 400, Sacc. 30

TABLEAU V

Action de substances organiques diverses
sur la néoformation de bourgeons chez l'Arabusta

Traitements	Nombre initial explants	Explants vivants	Explants avec bourgeons	Taux de néoformation (%)
Milieu de base	48	32	14	43,7
MB + extrait de malt 400 mg/l	48	38	26	68,4
MB + glycine 2 mg/l	48	38	8	21,0
MB + extrait de malt 1.000 mg/l	48	26	22	84,6
MB + glutamine 100 mg/l	48	22	16	72,7
MB + adénine 40 mg/l	48	36	32	88,8

MB = Milieu de base : Macro N3OK Vitamines de Morel
Micro MS Saccharose 30 g/l
Fe EDTA BAP 1,0 mg/l

pratiquement illimité à condition de renouveler de temps à autre le milieu de culture.

Après chaque prélèvement de tiges, de nouvelles tiges apparaissent ; il se forme alors une véritable souche qui rappelle celle des jardins de production de bois de bouturage.

Les données qui précèdent démontrent la possibilité d'obtenir chez l'Arabusta des bourgeons néoformés *in vitro*.

Ces expériences ont été réalisées sur tiges orthotropes, mais il est vraisemblable que d'autres organes, feuille, pédoncule floral, pourront également être utilisés pour obtenir des bourgeons néo-

formés et accroître d'autant le coefficient de multiplication offert par cette technique.

Ces techniques d'induction de bourgeons *in vitro* pourront également être utilisées lors des doublements chromosomiques.

Les potentialités de néoformation de bourgeons chez le genre *Coffea* varient selon les espèces ; élevée chez l'Arabica et l'hybride Arabusta, cette aptitude à la néoformation est plutôt faible chez les caféiers du groupe des liberoides, aussi toutes les recherches basées sur l'obtention *in vitro* de tiges orthotropes à partir de bourgeons préexistants présentent-elles également un réel intérêt.

EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE

La deuxième voie examinée dans la recherche d'une technique de multiplication végétative *in vitro* des caféiers fut celle de l'embryogenèse somatique.

Contrairement à la néoformation, qui n'avait jamais fait l'objet de recherche chez le genre *Coffea*, l'embryogenèse somatique chez ces végétaux est connue depuis 1970.

Nos recherches sur l'embryogenèse somatique ont été effectuées principalement chez l'hybride Arabusta, mais aussi chez le *C. canephora*.

Ici, les explants sont constitués par des fragments de 1 cm de long, d'entre-nœuds orthotropes jeunes et chlorophylliens de clones connus d'Arabusta, tantôt entiers, tantôt fendus par le milieu et placés horizontalement dans le milieu de culture.

Le milieu de base, pour ces recherches sur l'embryogenèse somatique, était constitué par la solution minérale de Murashige et Skoog, additionnée des vitamines de Morel.

Quatre auxines, AIA, AIB, ANA, 2,4 D, deux cytokinines : kinétine et benzyl-adénine ont été mises à l'épreuve à des concentrations variant entre 0,05 mg/l et 2 mg/l.

Les explants ont pendant toute la durée de l'expérience été maintenus à un éclairage de 4.000 lux suivant un régime de 12 h de nuit et 12 h de jour, la température des salles de culture étant de 26 ± 1 °C et 28 ± 1 °C.

Dans le processus d'obtention de plantules de caféiers par embryogenèse somatique, nous avons distingué trois phases :

1) Une phase d'induction de cal, celle-ci se déroule à la lumière, pendant quatre à six semaines, sur un milieu constitué par :

- milieu de base MS,
- saccharose 30-40 g/l,
- auxine (0,5 à 1 mg/l).

2) Une phase de différenciation des embryoides, celle-ci se déroule à la lumière, sur un milieu composé de :

- milieu de base MS entier ou dilué de moitié,
- saccharose 20 g/l,
- BAP 1 mg/l,

sa durée est de huit à dix semaines.

3) La troisième phase est celle de développement des embryons en plantules. Sa durée est d'environ dix semaines. Le milieu de développement des embryons est composé de la solution des éléments minéraux de Murashige et Skoog, diluée de moitié et additionnée de :

- vitamines de Morel,
- AIA 0,5 mg/l,
- kinétine 0,1 mg/l,
- saccharose 10 mg/l.

Cette troisième phase peut être précédée par un passage en milieu liquide, agité, ce qui accélère la dissociation et le développement des embryons au moment de leur repiquage sur milieu solide de développement.

Au cours de cette phase 3, l'embryon somatique, qui comportait une zone racinaire surmontée de deux petites feuilles cotylédonaire, se développe, les feuilles cotylédonaire s'élargissent et s'étalent, la zone racinaire différencie une ou plusieurs racines pivotantes et on distingue dans la plantule ainsi constituée :

les feuilles cotylédonaire,
la zone hypocotyle,
la ou les racines pivotantes.

Au bout de huit à douze semaines en phase 3, les embryons somatiques atteignent un développement suffisant pour être repiqués sur terreau en condition ordinaire de culture.

A ce stade, la plantule somatique rappelle parfaitement une plantule sexuée, mais dont la partie hypocotyle serait anormalement courte.

En phase d'induction, les explants produisent des cals dont les vitesses de croissance, la structure et les potentialités embryogènes varient selon les auxines utilisées et les niveaux de concentration de celles-ci.

L'acide naphthalène acétique (ANA) conduit à des cals translucides, hyperhydriques, à croissance rapide, mais dont les taux de survie sont toujours faibles. Ces cals prennent une coloration grisâtre qui évolue rapidement vers le marron.

En présence de 2,4 D à la concentration de 0,1 mg/l, les cals deviennent très rapidement friables et cotonneux. L'AIA et l'AIB conduisent à des cals dont les vitesses de prolifération sont inférieures à celles des cals développés sur ANA ou 2,4 D.

Ces cals issus de milieu à base de AIA ou AIB sont tantôt granuleux avec de nombreuses protuberances, tantôt friables et d'un blanc presque argenté.

Pour les concentrations d'AIA ou d'AIB supérieures à 2 mg/l, il y a apparition de racines dans 50 % des explants mis en culture.

Les potentialités embryogènes de ces cals sont variables selon les auxines utilisées (tableaux VI et VII).

TABLEAU VI

Taux d'embryogenèse somatique chez l'Arabusta, sur milieu de base MB₂ additionné de différentes auxines

Traitements	Nombre explants	Explants avec embryons	Taux embryogenèse en %	Total		
				Explants	Explants avec embryons	Taux %
MB ₂ + 2,4D 0,05	24	4	16,6			
MB ₂ + 2,4D 0,01	24	0	0	72	4	5,5
MB ₂ + 2,4D 0,5	24	0	0			
MB ₂ + ANA 0,5	24	0	0			
MB ₂ + ANA 1,0	24	0	0	72	1	1,4
MB ₂ + ANA 2,0	24	1	4,1			
MB ₂ + AIB 0,5	24	7	29,1			
MB ₂ + AIB 1,0	24	5	20,8	72	12	16,6
MB ₂ + AIB 2,0	24	0	0			
MB ₂ + AIA 0,5	24	7	29,1			
MB ₂ + AIA 1,0	24	6	25,0	72	21	29,1
MB ₂ + AIA 2,0	24	8	33,3			
Milieu de base :	MS ms Fe EDTA Kinétine 0,1 mg/l	Vitamines de Morel Saccharose 30 g/l	Cystéine 20 mg/l			

TABLEAU VII

Taux d'embryogenèse somatique chez l'Arabusta
sur milieu de base MB₄ additionné de différentes auxines
et sur explants préalablement induits en néoformation

Traitements	Nombre d'explants	Explants avec embryon	Taux d'embryogenèse	Total		
				Explants	Explants avec embryon	%
MB ₄ + AIA 0,5	24	13	54,1			
MB ₄ + AIA 1,0	24	10	41,6	72	27	37,5
MB ₄ + AIA 2,0	24	4	16,6			
MB ₄ + ANA 0,5	23	1	4,3			
MB ₄ + ANA 1,0	24	1	4,1	69	2	2,9
MB ₄ + ANA 2,0	22	0	0			
MB ₄ + AIB 0,5	22	1	4,5			
MB ₄ + AIB 1,0	24	6	25,0	72	15	20,8
MB ₄ + AIB 2,0	24	8	33,3			
MB ₄ + 2,4D 0,005	23	11	47,8			
MB ₄ + 2,4D 0,01	20	4	20,0	60	19	31,6
MB ₄ + 2,4D 0,1	17	4	23,5			

Milieu de base : MS, micro Heller
Inositol 100 mg/l
Kinétine 1,0 mg/l
Thiamine 4 mg/l
Cystéine 20 mg/l
Saccharose 30 g/l

Parmi les quatre auxines testées en phase d'induction, c'est l'AIA qui donne les meilleurs résultats, tant par le taux d'embryogenèse, que par la régularité de développement des embryons.

Cette supériorité de l'AIA se manifeste dans le développement morphologique des embryons. Les embryons issus d'explants induits en phase I sur l'AIA sont toujours bien constitués avec zone racinaire et zone cotylédonaire, bien proportionnées.

Les embryons issus d'explants induits sur ANA ont quelquefois un développement disproportionné, avec zone racinaire très importante, tandis que les cotylédons ont disparu ou sont réduits à de simples protubérances.

Les premières manifestations d'un processus d'embryogenèse somatique ont généralement eu lieu au bout de trois à quatre mois de mise en culture pour les explants issus d'hypocotyle de jeunes plantules, et au bout de cinq à six mois pour les explants issus de tiges orthotropes de caféier adulte.

Il s'agit alors de protubérances de forme globulaire, d'une coloration très blanche, contrastant fortement avec la coloration marron des calcs d'où elles émergent.

Dans certains cas, les premières manifestations d'embryogenèse somatique peuvent être très précoces et se produire au bout de huit semaines de mise en culture. Ces cas précoces sont toujours associés à un processus de néoformation antérieur.

Les embryoides apparaissent donc sur calcs de coloration, de structure et de développement divers,

sur cal grisâtre spongieux, sur cal compact et marron, sur cal friable et légèrement chlorophyllien, sur cal spongieux friable à haute fréquence embryonique.

De nombreux cas d'embryoïdes ont été observés sur cal d'explants préalablement induits en néoformation. Ces embryoïdes apparaissent à la base des explants, quelquefois au sein même du milieu de culture.

Laissés sur milieu de différenciation à base de BAP, les premiers embryons formés donnent naissance directement à de nombreux embryons fils, ceux-ci apparaissent toujours au niveau de la zone racinaire. Ce processus d'auto-multiplication conduit rapidement à un nombre impressionnant d'embryons somatiques à partir d'un même explant.

En règle générale, l'embryogenèse somatique est souvent liée à un processus de vieillissement des calcs doublé d'une diminution et d'un arrêt de la synthèse auxinique.

Ce schéma se retrouve également dans certains cas d'embryogenèse somatique chez l'Arabusta, ce sont les cas d'embryogenèse sur calcs marron, vieux et d'aspect plus ou moins nécrotique.

Quelques cas de calcs spongieux, très fortement embryogènes, correspondant aux types HSFE de Söndahl ont été trouvés ici aussi. Ces types à hautes potentialités embryogénétiques sont moins fréquents que les autres calcs embryogènes, et leur délai d'apparition est beaucoup plus long.

Chez l'Arabusta, l'embryogenèse somatique ap-

paraît comme un phénomène particulièrement facile à déclencher. Il est souvent lié au tissu de cal en voie de vieillissement ou au tissu de cal préala-

blement induit en néoformation. Dans ce cas, l'embryogenèse apparaît comme compétitive du processus de rhizogenèse.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Comparativement aux techniques de bouturage *in vitro* (à partir de tiges issues de bourgeons néoformés ou préexistants), l'embryogenèse somatique offre un coefficient de multiplication beaucoup plus élevé.

Ici, l'embryogenèse somatique a été obtenue à partir de fragments de tige, mais il existe toute une série d'organes, feuilles, pédoncules floraux, ovaires, étamines, qui pourront être utilisés comme source d'embryon somatique et augmenter encore le coefficient de multiplication offert par ce procédé.

En culture de tissus, le passage par cal indifférencié conduit assez souvent à des modifications plus ou moins importantes du génome initial, celles-ci sont généralement fonction des substances de croissance incorporées au milieu de culture et de la durée de la phase cal indifférencié.

Dans la perspective d'une utilisation des embryons somatiques pour une reproduction conforme, une embryogenèse précoce obtenue sur un milieu à base d'AIA devrait offrir davantage de garantie de conformité qu'une embryogenèse retardée en présence de milieux à base d'ANA ou de 2,4 D.

Dans le cas contraire, où cette embryogenèse somatique est envisagée comme moyen d'élargis-

sement de la base génétique, pour la recherche de génotypes nouveaux (variants résistants aux maladies ou à faible teneur en caféine), une prolongation de la phase cal indifférencié est souhaitable.

Bien qu'il n'existe pas de liaison évidente entre : embryogenèse somatique et androgenèse ou gynogenèse *in vitro*, il est vraisemblable qu'une connaissance approfondie de l'embryogenèse somatique chez les caféiers pourra aider à l'obtention d'haploïdes chez ces végétaux par culture *in vitro* de leur gamétophyte mâle ou femelle.

La multiplication végétative *in vitro* des caféiers cultivés (par embryogenèse somatique ou bouturage) permettra :

— d'accélérer la diffusion de clones nouvellement sélectionnés,

— d'installer et de multiplier des micro-collections de génotypes sélectionnés et éviter ainsi les risques de perte de matériel végétal de valeur,

— de faciliter les échanges de matériel végétal, tout en supprimant les risques d'introduction de maladies ou d'insectes.

A plusieurs égards donc, la multiplication végétative *in vitro* des caféiers constitue d'ores et déjà un moyen utile et efficace pour l'amélioration génétique de ces plantes.

BIBLIOGRAPHIE

CAPOT (J.). — L'amélioration du caféier en Côte d'Ivoire. Les hybrides « Arabusta ». *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XVI, n° 1, janv.-mars 1972, p. 3-17.

HERMAN (E. B.), HAAS (G. J.). — Clonal propagation of *C. arabica* L. from callus culture. *Hortscience* (St. Joseph, Mich.), vol. 10, n° 6, déc. 1975, p. 588-589.

MARGARA (J.). — La multiplication végétative de la betterave (*Beta vulgaris* L.) en culture *in vitro*. *C. R. Acad. Sci.* (Paris), t. 285, série D, 1977, p. 1041-1044.

MURASHIGE (T.), SKOOG (F.). — A revised medium for rapid growth on bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantar.* (Copenhague), 15, 1962, p. 473-497.

MURASHIGE (T.). — Plant propagation through tissue cultures.

Ann. Rev. Plant Physiol. (Palo Alto), 25, 1974, p. 135-166.

MONACO (L. C.), SONDHAL (M. R.), CARVALHO (A.), CROCOMO (O. J.), SHARP (W. R.). — Applications of tissue culture in the improvement of coffee. In *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. J. Reinert et Y. P. J. Bajaj ed., Springer Verlag (Berlin), 1977, p. 109-129.

SONDHAL (M. R.), SHARP (W. R.). — High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica*. *Z. Pflanzenphysiol.* (Stuttgart), vol. 81, 1977, p. 395-408.

STARITSKY (G.). — Embryoid formation in callus culture tissue of coffee. *Acta Bot. Neerl.* (Leiden), vol. 19, n° 4, 1970, p. 509-514.

DUBLIN (P.). — Multiplication végétative *in vitro* de l'Arabusta. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XXIV, n° 4, oct.-déc. 1980, p. 281-290, fig., tabl., réf.

DUBLIN (P.). — Vegetative multiplication of Arabusta *in vitro*. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XXIV, n° 4, oct.-déc. 1980, p. 281-290, fig., tabl., réf.

Le *C. arabica* et le *C. canephora* sont les deux espèces les plus importantes parmi les caféiers cultivés.

Dans le but d'associer les caractéristiques d'intérêt

C. arabica and *C. canephora* are the most important species of the cultivated coffee trees.

With the aim of combining the characteristics of

de chacune de ces espèces, un hybride tétraploïde (*C. arabica* × *C. canephora*) mieux connu sous le nom d'Arabusta a été créé en Côte d'Ivoire.

La reproduction des génotypes de valeur de cet hybride interspécifique ne peut être obtenue que par voie végétative.

Des recherches sur la multiplication végétative *in vitro* de l'Arabusta ont été entreprises, dans le but d'accélérer la diffusion des clones de valeur Arabusta nouvellement sélectionnés.

Ces recherches ont été orientées dans plusieurs directions : bouturage *in vitro* de tiges issues de bourgeons orthotropes préexistants ou néoformés, induction d'embryogenèse somatique.

En raison des difficultés (désinfection, oxydation...) d'obtention de tiges à partir de bourgeons déjà existants, une technique d'induction de bourgeons néoformés sur fragments d'entre-nœuds orthotropes a été mise au point.

Des embryons somatiques, capables de se développer en plantules, ont été obtenus par des voies fort différentes.

Comparativement au bouturage *in vitro*, l'embryogenèse somatique offre un coefficient de multiplication considérablement important.

Il importe, pour décider du choix de la meilleure méthode, de tester le degré de conformité des caféiers issus de chacun de ces procédés.

DUBLIN (P.). — Vegetative Vermehrung *in vitro* von Arabusta. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XXIV, n° 4, oct.-déc. 1980, p. 281-290, fig., tabl., réf.

C. arabica und *C. canephora* sind die wichtigsten Arten unter den kultivierten Kaffeebäumen.

Um die Merkmale von Interesse einer jeden dieser Arten zu assoziieren wurde in der Elfenbeinküste ein tetraploider Hybrid (*C. arabica* × *C. canephora*) besser bekannt unter dem Namen Arabusta geschaffen.

Die Fortpflanzung der Genotype von Wert dieses zwischenspezifischen Hybrids kann nur auf vegetativem Weg erfolgen.

Forschungen über die vegetative Vermehrung *in vitro* von Arabusta wurden unternommen um die Verbreitung der neu gezüchtigten Klone Arabusta von Wert zu beschleunigen.

Diese Forschungen erfolgten in verschiedenen Richtungen : Vermehrung durch Stecklinge *in vitro* von aus orthotropen vorher bestehenden oder neugeformten Knospen entsprossenen Stengel, Induktion von somatischer Embryogenese.

Angesichts der Schwierigkeiten (Desinfektion, Oxydierung...) Stengel aus schon bestehenden Knospen zu erhalten wurde eine Technik der Induktion von neu geformten Knospen auf Fragmenten von orthotropen Zwischenknoten fertiggestellt.

Somatische Embryone, fähig sich zu Pflänzlinge zu entwickeln wurden auf sehr verschiedenen Wege erhalten.

Im Vergleich zur Vermehrung durch Stecklinge *in vitro* bietet die somatische Embryogenese einen äusserst bedeutenden Vermehrungskoeffizient.

Zur Entscheidung der Wahl der besten Methode ist es wichtig den Grad an Konformität der aus jedem dieser Verfahren hervorgegangenen Kaffeebäume zu testen.

importance of each of these species, a tetraploid hybrid (*C. arabica* × *C. canephora*), better known under its name of Arabusta, has been created in Ivory Coast.

The reproduction of valuable genotypes of this interspecific hybrid can only be achieved by vegetative multiplication.

Research on the *in vitro* vegetative multiplication of Arabusta has been undertaken with the object of distributing newly-bred Arabusta clones of value.

This research was oriented in several directions : *in vitro* propagation by cuttings of stems derived from pre-existing or newly-formed orthotropic buds, induction of somatic embryogenesis.

Because of difficulties (disinfection, oxidation) in obtaining stems from already existing buds, a technique of induction of newly-formed buds on orthotropic internode fragments has been developed.

Somatic embryos, capable of developing into plantlets, have been obtained by very different means.

By comparison with *in vitro* cutting propagation, somatic embryogenesis gives a very high multiplication coefficient.

To choose the best method, the degree of conformity of the coffee trees derived from each of these procedures must be tested.

DUBLIN (P.). — Multiplicación vegetativa *in vitro* del Arabusta. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XXIV, n° 4, oct.-déc. 1980, p. 281-290, fig., tabl., réf.

Las dos especies más importantes entre los cafés cultivados son *C. arabica* y *C. canephora*.

Con objeto de combinar las características interesantes de cada una de estas especies, ha sido creado en Costa de Marfil un híbrido tetraploide (*C. arabica* × *C. canephora*) más conocido por la denominación de Arabusta.

La reproducción de los génotipos de valor de este híbrido interespecífico, únicamente puede ser obtenida por vía vegetativa.

Diversas investigaciones acerca de la multiplicación vegetativa *in vitro* de la variedad Arabusta han sido ya emprendidas, con objeto de acelerar la difusión de los clones de valor Arabusta nuevamente seleccionados.

Estas investigaciones han estado orientadas hacia diversas direcciones : reproducción, por estacas *in vitro*, de tallos procedentes de yemas ortotropas pre-existentes o neoformadas, inducción de embriogénesis somática.

Debido a las dificultades con que se tropieza (desinfección, oxidación, etc.) para la obtención de tallos a partir de yemas ya existentes, ha sido perfeccionada una técnica de inducción de yemas neoformadas sobre fragmentos de entrenudos ortotropos.

Han sido obtenidos así embriones somáticos, capaces de desarrollarse en pequeñas plantas, y ello por medio de vías sumamente distintas.

Comparativamente a la reproducción por estacas *in vitro*, la embriogénesis somática ofrece un coeficiente de multiplicación de considerable importancia.

Parece importante, para decidir en cuanto a la opción del mejor método, proceder al ensayo del grado de conformidad de los cafés procedentes de cada uno de estos procedimientos.