

OBTEINTION D'HAPLOÏDES SPONTANÉS DE *COFFEA CANEPHORA* PIERRE PAR L'UTILISATION DU GREFFAGE D'EMBRYONS

(N)

E. COUTURON

ORSTOM, Man, Côte d'Ivoire *

Depuis quelques années, les généticiens s'intéressent aux haploïdes des plantes supérieures pour les études génétiques et comme technique nouvelle dans l'amélioration variétale.

L'haploïdie spontanée a été observée depuis longtemps chez de nombreuses espèces végétales, en particulier les cas liés à la polyembryonie. Depuis une dizaine d'années, son induction artificielle fut tentée avec plus ou moins de succès par la culture *in vitro* d'anthères, de pollen, d'ovules appliquée à nombre d'espèces végétales utiles (Collins, 1977 ; Keller, 1980).

Chez les caféiers, des dihaploïdes de l'espèce tétraploïde *C. arabica* ont déjà été obtenus aisément à partir de graines polyembryonnées (Mendès et Bacchi, 1940 ; Carvalho, 1952 ; Dublin et Parvais, 1975). Il n'en a pas été de même chez les

caféiers diploïdes, plus particulièrement chez *C. canephora* où, seules, trois plantules à onze chromosomes ont pu être isolées par Dublin et Parvais (1975) à partir de graines normales, monoembryonnées. Par ailleurs, la mise en culture d'anthères et de gamétophytes de cette espèce n'a pas encore abouti au développement de plantes haploïdes (Lanaud, communication personnelle).

Le greffage d'embryons de caféiers (Couturon et Berthaud, 1979) ayant permis la croissance d'embryons de très petite taille, nous nous sommes proposé de reprendre la recherche d'haploïdes chez *C. canephora* par le greffage des polyembryons extraits de graines immatures. Parallèlement, des recherches par semis ont été effectuées, mais de façon plus succincte.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Les graines ont été récoltées sur trente-neuf souches de *C. canephora* de la collection et des descendances IFCC, cultivées respectivement à Man et à Divo (Côte d'Ivoire).

Recherche des graines polyembryonnées et récupération des polyembryons

Récupération dans le fruit et greffage des embryons

Les polyembryons sont repérés dans les fruits immatures, par tranchage de la partie basale du

fruit, près du pédoncule. Bien qu'il arrive de trouver trois ou quatre embryons associés, dans la plupart des cas on en trouve deux, le plus petit étant accolé à la base du plus gros. Ils sont facilement extraits de l'albumen, puis séparés à l'aide de la pointe d'une lame de greffoir. Dans tous les cas, nous avons sélectionné les plus petits embryons (2 à 3 mm) pour les greffer sur de jeunes plants de *C. canephora* issus de semis et âgés d'environ quatre mois.

La technique de greffage utilisée a été décrite dans un précédent article (Couturon et Berthaud, 1979).

Récupération par semis et repiquage des plantules

Parmi les graines mises en germination, les graines polyembryonnées sont aisément repérées.

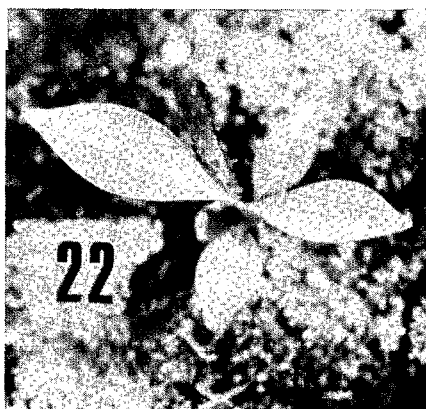
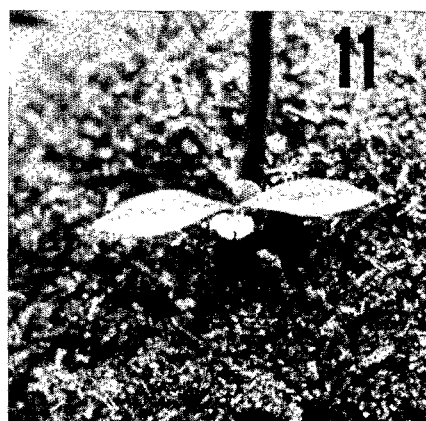
* ORSTOM, B.P. 434, Man, Côte d'Ivoire.

lors de la germination, par la présence de deux ou parfois plusieurs petites racicules émanant d'un même albumen. Le développement de l'hypocotyle du plus gros des embryons entraîne leur soulèvement du substrat de germination. On sectionne alors cet hypocotyle afin de permettre la croissance des plus petits embryons jusque-là défavorisés. Les graines sont ensuite transplantées en atmosphère saturée en eau jusqu'à l'obtention des plantules. Celles dont l'hypocotyle avait été sectionné continuent à se développer en émettant de nouvelles racines. Les plus petites sont enfin repiquées en terre ou greffées suivant leur vigueur.

Repérage des plantules présumées haploïdes et contrôle cytologique du niveau de ploïdie

Les plantules présumées haploïdes ont été repérées à partir du stade « première paire de feuilles ». Les observations portent sur l'épaisseur de l'hypocotyle, la longueur de l'entre-nœud, la forme des feuilles, par comparaison avec les phénotypes diploïdes issus des mêmes souches parentales (photos 1a et 1b).

Les dénombrements chromosomiques ont été effectués sur les apex de très jeunes feuilles, encore accolées, dont on a prélevé la moitié supérieure. Celles-ci ont été fixées dans un mélange en parties égales d'acide acétique glacial et d'éthanol absolu, à 60 °C, pendant 6 h. Puis elles ont été colorées à l'hématoxyline (mélange de dix volumes d'hématoxyline à 2 % et d'un volume



Photos 1a et 1b. — Plantule haploïde (11) et plantule diploïde (22) d'une même souche parentale de *C. canephora*, obtenues par greffage de polyembryons, âgées de trois mois

d'alun ferrique à 0,5 %, tous deux dans l'acide acétique à 45 %) durant 30 min, à la température ambiante. Le dénombrement des chromosomes a été effectué au stade métaphase par écrasement entre lame et lamelle, au grossissement 1 000 X.

RÉSULTATS

Obtention d'haploïdes par le greffage des polyembryons

On a isolé sept cent soixante-douze graines polyembryonnées pour cent vingt-six mille graines coupées, soit 0,6 %. Six cent vingt-trois petits embryons ont pu être greffés. Le taux de réussite du greffage a été de 63 %. Parmi les trois cent quatre-vingt-douze plantules obtenues, nous avons pu trier cent trente-cinq phénotypes à tige grêle, entre-nœuds courts et feuilles étroites. Quarante-vingt-deux plantules se sont révélées avoir onze chromosomes après dénombrement, soit 21 % des embryons greffés avec succès.

Sur les trente-sept clones mis à l'épreuve pour leur production de graines polyembryonnées, sept ont pu l'être sur huit mille à vingt-six mille graines (tableau I). Leur taux de polyembryons se situait dans nos conditions entre 0,3 et 1,3 %. Les souches IF 107, IF 126, IF 149, IF 160, IF 200, IF 232 ont produit entre 4 et 19 % d'haploïdes par rapport au nombre de graines polyembryonnées. Le clone IF 095 n'a produit aucun haploïde. Parmi les trente autres souches étudiées sur mille graines seulement, cinq n'ont rien donné (H 66, IF 317, IF 392, IF 419, IF 489). Pour les autres (tableau II), le taux de graines polyembryonnées variait entre 0,1 et

TABLEAU I
Obtention d'haploïdes par greffage des polyembryons
à partir de sept souches de *C. canephora*

Clones	Nombre de graines coupées	Graines polyembryonnées		Embryons greffés	Plantules obtenues	Haploïdes	
		Nombre	Taux (%)	Nombre	Nombre	Nombre	Taux (%)
IF 095	10 359	39	0,37	31	17	0	-
IF 107	8 664	77	0,88	59	40	3	3,8
IF 126	16 356	209	1,27	144	94	9	4,3
IF 149	26 858	118	0,43	101	65	19	16,1
IF 160	11 082	32	0,28	29	24	6	18,7
IF 200	10 630	123	1,15	107	61	23	18,6
IF 232	9 229	76	0,82	74	41	13	17,1

TABLEAU II

Greffage des polyembryons et obtention d'haploïdes à partir de mille graines récoltées sur vingt-cinq clones de *C. canephora*

Clones	A	B	C	Clones	A	B	C
IF A02	2	0		IF 176	7	6	0
IF 006	5	2	1	IF 182	3	1	0
IF A25	5	3	1	IF 197	4	2	2
KM 27	3	2	0	IF 235	3	2	0
IF 030	2	1	0	IF 241	7	0	
H 34	3	3	1	IF 405	2	1	0
IF 057	2	1	1	IF 420	5	4	1
IF 069	7	4	1	IF 444	5	2	1
IF 075	4	3	0	IF 445	3	2	0
H 77	4	1	0	IF 461	1	1	0
IF 084	1	0		IF 467	4	2	0
IF 086	1	1	0	IF 488	1	0	
IF 130	10	6	0				

A : Nombre de polyembryons greffés.
B : Nombre de plantules obtenues.
C : Nombre de plantules haploïdes.

0,7 % ; les clones IF 006, A 25, H 34, IF 057, IF 069, IF 420, IF 444 ont produit chacun un haploïde et le clone IF 197 en a produit deux.

Obtention d'haploïdes par semis

Pratiquée sur un nombre plus limité de graines, cette méthode a néanmoins permis d'obtenir quatre plantules à onze chromosomes pour vingt et un mille graines semées. Les résultats obtenus pour les quatre clones utilisés sont regroupés dans le tableau III. Notons qu'avec le clone IF 107 les résultats obtenus par les deux méthodes sont équivalents.

TABLEAU III
Obtention d'haploïdes par semis de graines récoltées
sur quatre clones de *C. canephora*

Clones	Nombre de graines semées	Nombre de graines polyembryonnées	Nombre de plantules obtenues	Nombre de plantules haploïdes
IF 077	6 279	28	9	1
IF 107	9 908	78	59	2
IF 130	3 431	20	8	0
IF 200	1 446	28	10	1

DISCUSSION

Il est aisé d'extraire les embryons existant dans l'albumen de graines polyembryonnées immatures. Mais le greffage des petits embryons susceptibles de fournir le meilleur taux d'haploïdes ne peut être pratiqué avec les embryons de moins de 2 mm ou mal formés. La différence entre le nombre de polyembryons extraits et le nombre de polyembryons effectivement greffés est inhérente

à la technique. De plus, le taux de réussite des greffes de ces polyembryons par rapport à celui des greffes d'embryons uniques est moindre : 60 % pour des embryons de *C. canephora* de 2 à 3 mm contre 90 % pour des embryons normaux de *C. arabica* d'environ 4 mm (Couturon et Berthaud, 1979). Mais passé le cap de la reprise sur les porte-greffes, les plantules obtenues sont auto-



Photo 2. — Développement atteint par un embryon haploïde issu du clone IF 149, sept mois après son greffage sur un jeune plant de *C. canephora*

nomes et ne nécessitent qu'exceptionnellement une intervention de sauvetage par un nouveau greffage (photo 2).

L'obtention d'haploïdes par semis est possible moyennant de nombreuses interventions au cours de la germination des graines polyembryonnées. D'abord, la croissance des plus petits embryons, totalement inhibée par celle des plus développés, peut être favorisée en sectionnant l'hypocotyle de ces derniers. A la limite, les petites plantules issues de graines polyembryonnées ont été récupérées « avant terme » par dissection de l'albumen. Cette opération provoque souvent des traumatismes, qui peuvent compromettre la survie des plantules les plus fragiles.

Tenant compte des difficultés rencontrées par voie de semis, le greffage des embryons paraît être une méthode plus adaptée à la récupération du matériel polyembryonnaire susceptible de fournir les haploïdes.

Les résultats regroupés dans le tableau I montrent que le taux de graines polyembryonnées diffère beaucoup d'une souche parentale à l'autre, de même que le taux d'haploïdes. Ces deux paramètres paraissent indépendants. En effet, un clone bon producteur de polyembryons comme la souche IF 126 ne donne pas nécessairement un nombre élevé de plantes haploïdes et, inversement, un clone mauvais producteur de polyembryons comme la souche IF 160 peut avoir un taux élevé d'haploïdes.

Sur les trente-neuf souches étudiées, trente-quatre ont produit des graines polyembryonnées à des taux différents. Mais il semble peu probable que ces conditions soient identiques d'une année à l'autre, les facteurs déterminant la polyembryonie étant mal connus.

Les treize haploïdes obtenus à partir du clone IF 232 possèdent tous des feuilles anormalement gaufrées, comme le pied mère, alors que sa descendance diploïde issue de fécondation libre ne manifeste pas ce caractère. Ceci confirme donc que ces haploïdes sont issus d'une cellule du sac embryonnaire par développement parthénogénétique.



Photo 3. — Plant haploïde greffé provenant du clone IF 200, six mois après son installation au champ

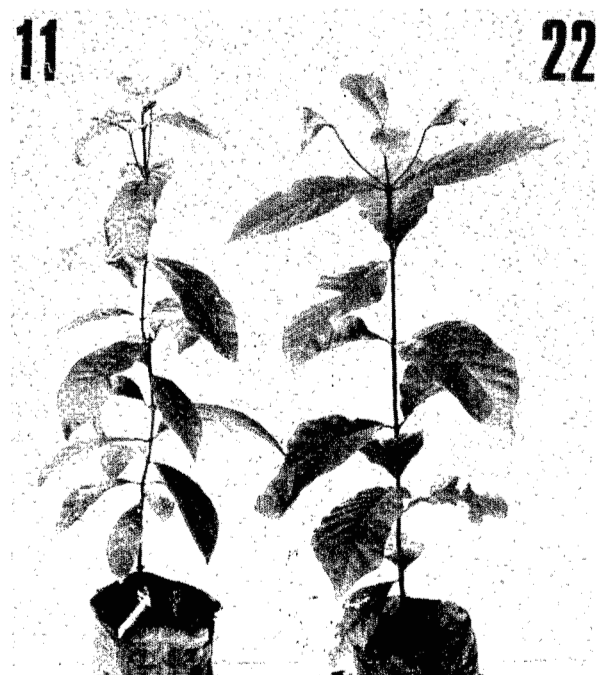


Photo 4. — Couple isogénique haploïde (11)-diploïde (22) n° IF 126-01

22

11



Photo 5. — Couple isogénique haploïde (11)-diploïde (22)
n° IF A25-01

22

11

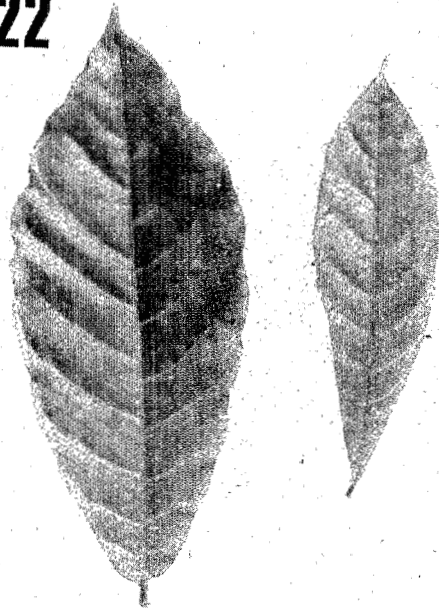


Photo 6. — Feuille haploïde (11) et feuille diploïde (22)
du couple isogénique n° IF A25-01

D'après les observations faites au cours de la croissance des haploïdes, nous avons constaté que leur vigueur varie beaucoup avec la souche parentale utilisée ; en revanche, la variation semble assez faible parmi les individus issus d'une même souche.

Mis à part certains plants haploïdes, dont la croissance paraît irrémédiablement bloquée (formes en « rosette »), leur vigueur est suffisante pour procéder à leur duplication chromosomique par traitement à la colchicine des apex caulinaires selon la technique de Berthou (1975).

A ce jour, trente individus haploïdes ont été diploïdisés (photos 3, 4, 5, 6). Les premiers rejets diploïdes greffés ont donné des plantes de vigueur satisfaisante comparée à celle des caféiers diploïdes hétérozygotes de l'espèce *C. canephora*.

BIBLIOGRAPHIE

- BERTHOU (F.). — Méthode d'obtention de polyploïdes dans le genre *Coffea* par traitement localisé de bourgeons à la colchicine. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XIX, n° 3, juil.-sept. 1975, p. 197-202.
- CARVALHO (A.). — Taxonomia de *Coffea arabica* L. VI. Caracteres morfológicos dos haploides. *Bragantia* (São Paulo), vol. XII, n° 4-6, 1952, p. 201-212.

- COLLINS (G. B.). — Production and utilization of anther-derived haploïds in crop plants. *Crop Science* (Madison), vol. 17, 1977, p. 583-586.
- COUTURON (E.), BERTHAUD (J.). — Le greffage d'embryons de caféiers ; mise au point technique. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XXIII, n° 4, oct.-déc. 1979, p. 267-270.

DUBLIN (P.), PARVAIS (J.-P.). — Sur la recherche des haploïdes issus de polyembryons chez *C. arabica*. 7^e Colloque international sur la chimie des cafés, 9-14 juin 1975, Hambourg, ASIC (Brême, juil. 1976), p. 505-511.

DUBLIN (P.), PARVAIS (J.-P.). — Note sur les premiers haploïdes spontanés découverts chez le *Coffea canephora* var. *Robusta*. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XIX, n° 3, juil.-sept. 1975, p. 191-196.

COUTURON (E.). — **Obtention d'haploïdes spontanés de *Coffea canephora* Pierre par l'utilisation du greffage d'embryons.** *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XXVI, n° 3, juil.-sept. 1982, p. 155-160, 3 tabl., 6 photos, 8 réf.

L'obtention d'haploïdes spontanés de *C. canephora* est rendue possible par le greffage de polyembryons. Vu leur faible fréquence d'apparition (moins de 1 %), leur récupération dans les graines immatures est plus aisée que par semis. Avec notre technique, pour six cent vingt-trois polyembryons isolés puis greffés, nous avons obtenu quatre-vingt-deux plantes haploïdes après détermination de leurs nombres chromosomiques.

Après duplication chromosomique par traitement à la colchicine des apex caulinaires, les trente premiers haploïdes diploïdisés obtenus sont de vigueur satisfaisante comparée à celle d'individus diploïdes hétérozygotes de l'espèce *C. canephora*.

COUTURON (E.). — **Erhaltung von spontanen Haploiden bei *Coffea canephora* Pierre durch die Verwendung von gepfropften Embryonen.** *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XXVI, n° 3, juil.-sept. 1982, p. 155-160, 3 tabl., 6 photos, 8 réf.

Die Erhaltung von spontanen Haploiden bei *C. canephora* ist durch das Pfropfen von Polyembryonen möglich geworden. Angesichts ihrer seltenen Erscheinung (weniger als 1 %) ist ihre Rückgewinnung in den unreifen Samenkörnern leichter als durch Sämlinge. Mit unserer Technik erhielten wir für sechs hundert drei und zwanzig isolierte und sodann gepfropfte Polyembryone zwei und achtzig haploide Pflanzen nach Bestimmung ihrer Chromosomenzahl.

Nach chromosomischer Verdopplung durch Behandlung mit Kolchizin der Stielspitzen erweisen sich die dreissig ersten diploidierte Haploide von Befriedigender Stärke im Vergleich zu der von heterozygoten diploiden Individuen der Art *C. canephora*.

KELLER (W. A.). — *In vitro* production of haploïds in crop plants from microspores (abstract). *Canadian Journal of Genetics and Cytology* (Ottawa), vol. XXII, n° 4, p. 667.

MENDES (A. J. T.), BACCHI (O.). — Observações citológicas em *Coffea*. V. Uma variedade haploide de *C. arabica* L. *Inst. Agron. Campinas, Bol. Tec.*, 77, 26 p.

COUTURON (E.). — **Obtaining naturally occurring haploïds of *Coffea canephora* Pierre by grafting of embryos.** *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XXVI, n° 3, juil.-sept. 1982, p. 155-160, 3 tabl., 6 photos, 8 réf.

It has been possible to obtain naturally occurring haploïds of *C. canephora* by grafting polyembryos. In view of their rare occurrence (less than 1 %), their recovery is easier from immature seeds than from seedlings. With our technique we obtained from six hundred and twenty three polyembryos that were isolated and then grafted, eighty two haploid plants after determining their chromosome numbers.

After chromosome duplication by treating the caulinary apices with colchicine, the first thirty diploidised haploïds which were obtained had a satisfactory vigour, compared with that of the heterozygous diploid individuals of the species *C. canephora*.

COUTURON (E.). — **Obtención de haploides espontáneos de *Coffea canephora* Pierre mediante la utilización del injerto de embriones.** *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XXVI, n° 3, juil.-sept. 1982 p. 155-160, 3 tabl., 6 photos, 8 réf.

La obtención de haploides espontáneos de *C. canephora* ha sido posible por el injerto de poliembryones. Considerando su reducida frecuencia de aparición (menos de 1 %), su recuperación es más fácil de semillas inmaduras que por medio de siembra. Aplicando nuestra técnica, hemos obtenido seis cientos veintitrés poliembryones, los cuales fueron aislados e injertados, ochenta y dos plantas haploides después de haberlos determinado su número cromosómico.

Después de la duplicación cromosómica, por tratamiento de los apices mediante colchicina, los primeros treinta haploides diploidizados obtenidos presentan un vigor satisfactorio comparados con los diploides heterocigotos individuales de la especie *C. canephora*.