

PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE. — *Mise au point d'une méthode de culture in vitro d'embryons de Caféiers. Application à deux variétés de Caféiers cultivés.* Note (\*) de M. Jean-Paul Colonna, M<sup>me</sup> Geneviève Cas et M. Henri Rabéchault, présentée par M. Lucien Plantefol.

Après extraction aseptique, la mise en culture *in vitro*, sur gélose, d'embryons de Caféier est possible. La méthode décrite ici a permis de montrer que les embryons de Caféier *excelsa* utilisés se développaient mieux et conservaient plus longtemps leur vitalité que ceux du Caféier *robusta*. L'embryon extrait d'une graine à pouvoir germinatif diminué ne recouvre pas la faculté de germer.

Les semences de Caféiers présentent une faculté germinative de courte durée (<sup>1</sup>). A côté des effets de la lumière [(<sup>2</sup>), (<sup>3</sup>)] ou d'un dessèchement trop important [(<sup>4</sup>), (<sup>5</sup>)], diverses causes ont pu être évoquées pour expliquer cette perte rapide du pouvoir germinatif. Ainsi, les déformations, par séchage, des plasmodesmes entre cellules de la graine, entraveraient-elles la circulation des gaz et des liquides nécessaires à la germination (<sup>6</sup>). Comme chez d'autres graines à réserves lipidiques, l'activation de la lipolyse en présence de l'oxygène de l'air entraînerait la libération des acides gras et par suite l'inhibition partielle puis totale du développement de l'embryon (<sup>7</sup>).

La culture *in vitro* d'embryons de Caféier pourrait permettre d'étudier ce problème ainsi que d'autres questions importantes, telles que la signification biologique de la caféine, de l'acide chlorogénique et des depsides (<sup>8</sup>), ou les modalités de résistance variétale aux agents pathogènes.

Les difficultés d'une telle entreprise résident surtout dans l'extraction aseptique de l'embryon, inclus dans un albumen très dur.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — *Matériel végétal.* — Nous disposons de semences sélectionnées de *Coffea Deweyrei* de Wild. et Durand, race *C. excelsa* Chev. et de *Coffea canephora* Pierre, s. var. *robusta* (Linden) Chev., récoltées au mois de janvier en République Centrafricaine.

*Mise au point de la méthode.* — La nécessité de repérer l'embryon pour l'extraire, ainsi que la dureté de l'albumen, nécessitent un trempage aseptique de 36 à 48 h dans l'eau distillée stérilisée.

Les semences subissent au préalable une désinfection de 15 mn par le chlorure mercurique à 1 ‰, auquel on a ajouté un « mouillant » (Tween 80 à 1 ‰). L'augmentation du temps de désinfection à 30 ou 45 mn n'apporte aucune amélioration. Par contre, il convient absolument de faire pénétrer le désinfectant dans le sillon du grain après un vide d'environ 30 mm de mercure durant 5 mn. Cette simple opération permet de faire progresser le pourcentage de non-contamination de 30 à 95 %. La désinfection se termine par trois rinçages aseptiques à l'eau distillée stérilisée, le trempage se faisant dans la quatrième eau de rinçage.

L'extraction de l'embryon et son passage sur milieu de culture sont réalisés sous tunnel aseptisé par pulvérisation d'éthanol à 95° G. L. La graine désinfectée, sortant du trempage stérile, est débarrassée de la fine pellicule argentée qui la recouvre, puis

O. R. S. I. O. M.

Collection de Référence

n° 4726

05 JUIN 1971

immédiatement plongée durant quelques instants dans l'éthanol à 95° G. L. L'embryon situé dans un plan inclus dans l'un des deux feuillets de l'albumen, est alors visible par transparence, pour les deux variétés sur lesquelles nous avons travaillé. Tenant la graine entre deux doigts, le sillon vers le bas, on effectue au moyen d'un scalpel stérile une entaille transversale profonde d'un à deux millimètres, vers le milieu de la graine, à l'extrémité et au ras des deux cotylédons accolés de l'embryon. — On fait ensuite sur le côté une seconde entaille longitudinale, dans le plan et au niveau de l'embryon. La portion du feuillet supérieur, ainsi délimitée et découpée, est soulevée délicatement avec la pointe du scalpel, de façon à dégager en premier l'extrémité racinaire de l'embryon, puis l'axe-hypocotylé et les cotylédons. L'embryon, entièrement découvert, reposant sur le feuillet inférieur auquel il adhère relativement peu, sauf parfois par les cotylédons, est soulevé sur la pointe du scalpel et introduit dans le tube de culture stérile.

*Milieu de culture.* — Le milieu de culture de base contenait : 9 ‰ de « Bacto agar Difco », 20 ‰ de saccharose et les éléments minéraux selon Heller (°). On y avait ajouté les substances complémentaires suivantes : méso-inositol (200 mg/l) ; panto-thénate de Ca (0,5 mg/l) ; cystéine HCl (2 mg/l) ; thiamine HCl (1 mg/l) ; acide nicotinique (1 mg/l) ; glycine (3 mg/l) ; adénine HCl (1 mg/l) ; pyridoxine HCl (0,8 mg/l).

**RÉSULTATS.** — *Croissance comparée in vitro des embryons des deux variétés (fig.).* — Déduction faite des cotylédons, l'embryon mesurait, au moment de sa mise en culture, 4,7 mm de long pour le *C. excelsa* et 4,0 mm pour le *C. robusta*. Dans ce dernier cas, la longueur initiale a sextuplé en 100 jours (*pl.*, *fig. 1*), alors qu'il n'a fallu que 75 jours pour l'autre variété. Les racines s'accroissent plus vite que l'axe hypocotylé. Les feuilles cotylédonnaires se développent deux fois plus vite chez le *C. excelsa* (*pl.*, *fig. 3*) ; dans les conditions de l'expérience leur développement cesse.

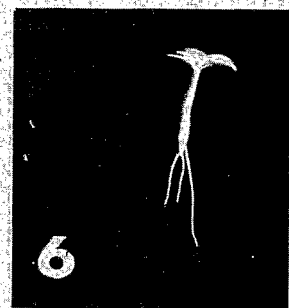
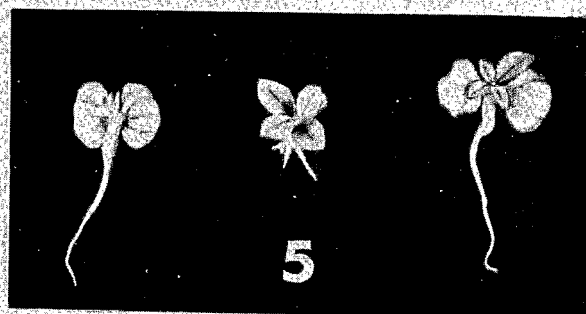
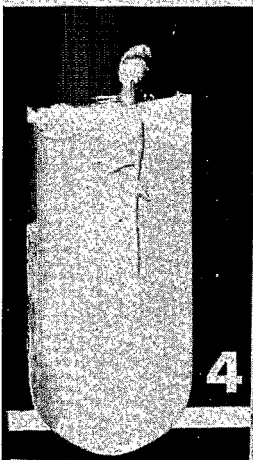
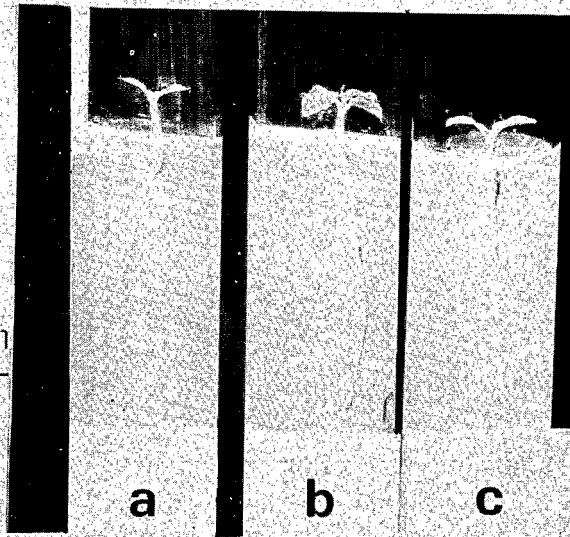
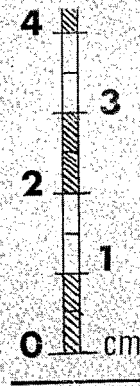
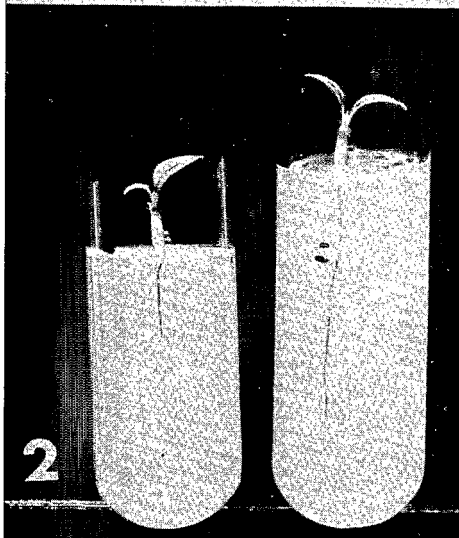
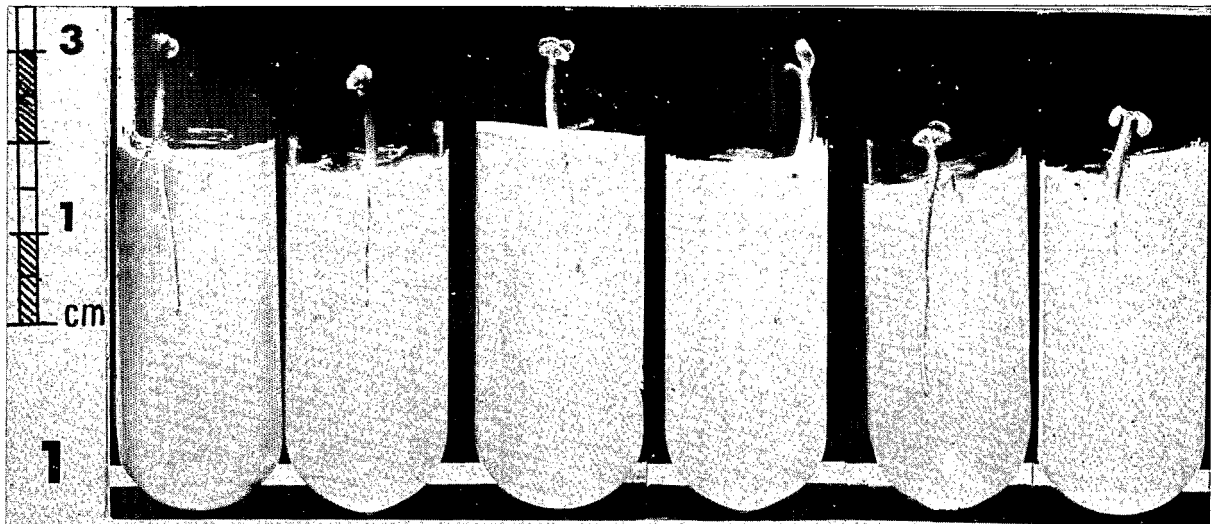
#### EXPLICATION DE LA PLANCHE

##### *Coffea canephora*, var. *robusta*

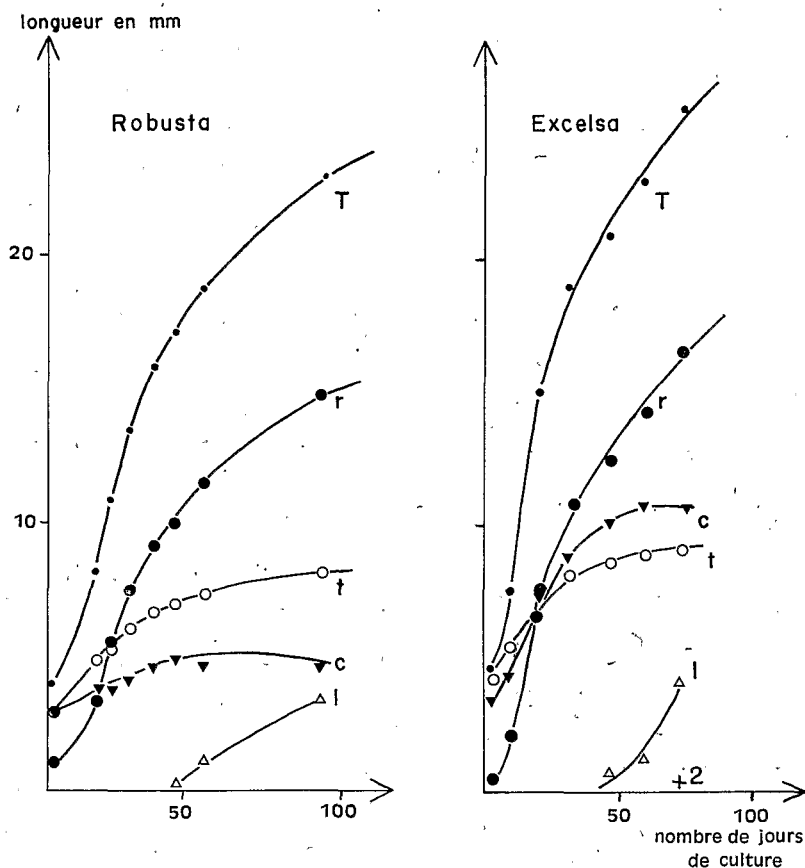
- Fig. 1. — Embryons cultivés *in vitro* sur gélose ; on distingue la racine, l'axe hypocotylé et les feuilles cotylédonnaires qui passent de la position verticale à la position horizontale.  
 Fig. 2. — Si les cotylédons sont abîmés au moment de la mise en culture aseptique, ils se dessèchent pendant que les feuilles de rang 1 apparaissent, grandissent et les remplacent ; on distingue les deux feuilles de rang 1, plus allongées que les feuilles cotylédonnaires, dont ne subsiste, au-dessous, qu'une faible partie.  
 Fig. 4. — Seul le lot alimenté en lait de coco a montré quelques cas de développement des radicules.

##### *Coffea Dewevrei* de Wild. et Durand, race *C. excelsa* Chev.

- Fig. 3. — Embryons cultivés *in vitro*, à différents stades de leur développement.  
 Fig. 5. — Embryons extraits du milieu de culture. A gauche les feuilles cotylédonnaires sont vues par dessous. A droite, une vue supérieure permet de distinguer les cotylédons, les feuilles de rang 1 et les feuilles de rang 2. Au milieu, la dégénérescence des cotylédons, blessés à l'extraction, entraîne un développement plus important des feuilles de rangs 1 et 2.  
 Fig. 6. — Quelques individus ont développé plusieurs axes racinaires à partir de la zone racinaire.



presque totalement entre le 60<sup>e</sup> et le 70<sup>e</sup> jour ; la transplantation sur un nouveau milieu devient alors nécessaire. La première paire de feuilles au-dessus des cotylédons apparaît vers le 45<sup>e</sup> jour pour les deux variétés et se développe rapidement ; elle peut apparaître plus tôt et s'accroître à la place des cotylédons si ceux-ci ont été abîmés au moment de la mise en culture stérile (*pl.*, *fig.* 2 et 5). Au 75<sup>e</sup> jour de culture on observe la naissance d'une deuxième paire de feuilles chez le *C. excelsa* (*pl.*, *fig.* 5).



Croissance en longueur des diverses parties d'embryons de Cafiers *robusta* et *excelsa* cultivés *in vitro* (T, total racine + axe hypocotylé + tige ; r, racine ; t, axe hypocotylé + tige ; c, somme des deux feuilles cotylédonnaires ; 1. Somme des deux feuilles de rang 1 au-dessus des cotylédons ; 2. Somme des deux feuilles de rang 2).

Si l'on découpe un secteur d'albumen renfermant l'embryon entre ses deux feuillets, celui-ci commence à se développer lorsqu'il est placé sur milieu gélosé, mais il ne pourra se dégager entièrement du fragment d'albumen insuffisamment humidifié ; selon les cas, on peut n'obtenir qu'un développement radiculaire ou qu'un développement aérien.

Quelques embryons ont formé plusieurs racines à partir de la zone radiculaire (*pl.*, *fig.* 6). On peut penser que cela correspond à d'infimes lésions de cette partie de la racicule, survenues au moment où l'embryon mis à nu dans la graine est décollé de son logement.

*Influence de l'âge des semences.* — La faculté de se développer a diminué rapidement chez les embryons de *C. robusta* dont nous disposions : de 90 % à quatre semaines, elle est descendue à 6 % dès la dixième semaine. L'embryon de *C. excelsa* a par contre conservé presque totalement cette faculté au bout de onze semaines.

Un essai de germination conduit à la serre, en fonction de l'âge des semences, a donné des résultats du même ordre.

Ainsi nous n'avons pu obtenir de développement sur des lots d'embryons provenant de semences vieillissantes, à faible pouvoir germinatif.

*Action de l'acide  $\beta$ -indolyl-acétique et du lait de coco.* — L'addition d'acide  $\beta$ -indolyl-acétique (AIA), à la concentration de  $2 \cdot 10^{-6}$ , au milieu gélosé a entraîné une augmentation de la longueur de l'embryon. Cette augmentation est de l'ordre de 17 % au quarantième jour de culture. L'accroissement peut-être évalué à 38 % si l'on apporte du lait de coco (10 %) en même temps que de l'AIA.

Seuls les embryons alimentés en lait de coco ont montré quelques cas de racines ramifiées (*pl.*, *fig.* 4).

CONCLUSIONS. — La culture *in vitro* d'embryons de Caféier est possible, à condition de procéder à un trempage des graines dans l'eau stérile, après désinfection sous vide partiel et avant extraction aseptique de l'embryon.

Les lots de semences se rapportant aux deux espèces étudiées ici ont présenté des comportements différents tant pour le développement des embryons que pour la conservation du pouvoir germinatif.

La recherche d'un milieu de culture optimal a été entreprise.

(\*) Séance du 9 décembre 1970.

(1) R. COSTE, *Caféiers et Cafés dans le monde*, Larose, Paris, 1 et 2, 1959.

(2) E. BOREL, *Rapport de la Station de Tuyén Quang*, Saïgon, Indochine, 1947.

(3) R. DUFOURNET, *Bull. Agric. Madagascar*, n° 9, 1949, p. 7.

(4) A. E. THOMAS, *East Afric. Agric. Jour.*, 1937, p. 147.

(5) O. BACCHI, *Bragantia (Campinas)*, 14, n° 22, 1955, p. 225.

(6) P. A. GENKEL et CHZHOO SHI-SJUI, *Fiziol. Rasten.*, SSSR, 5, n° 4, 1958, p. 305.

(7) H. RABÉCHAULT et H. CAMBRONY, *Cahiers ORSTOM, Physiologie des Plantes Tropicales Cultivées*, 1, 1, 1964, p. 7.

(8) J.-P. COLONNA, *Comptes rendus*, 269, Série D, 1969, p. 1770.

(9) R. HELLER, *Ann. Sc. Nat.*, 11<sup>e</sup> série, Bot. et Biol. Vég., 14, 1953, p. 1.

(Services Scientifiques Centraux de l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre Mer  
70-74, route d'Aulnay, 93-Bondy, Seine-Saint-Denis.)