

# MÉTHODE D'OBTENTION DE POLYPLOÏDES DANS LE GENRE *COFFEA* PAR TRAITEMENTS LOCALISÉS DE BOURGEONS À LA COLCHICINE

F. BERTHOU

Généticien, chargé de recherches ORSTOM

Opération conjointe ORSTOM-IFCC, Côte d'Ivoire

L'espèce *Coffea arabica* est réputée pour la qualité de ses grains. Dans les régions défavorables à sa culture, les hybrides interspécifiques qui lui ressemblaient ont suscité un intérêt particulier (Cramer, 1957). Mais le niveau de ploïdie de *C. arabica* ( $2n = 44$  chromosomes) est un obstacle aux croisements avec les autres espèces de caféiers, toutes diploïdes ( $2n = 22$  chromosomes). Si leur duplication chromosomique s'observe exceptionnellement à l'état spontané (Narasimhaswamy, 1961), elle se pratique couramment ; elle a permis notamment de réaliser les hybrides « Arabusta » entre *C. arabica* et *C. canephora* (Capot, 1972).

Grâce aux propriétés mitoclasiques de la colchicine, la duplication chromosomique de caféiers a été effectuée le plus souvent par traitement de graines en cours de germination (Capot, 1968) ou de plantules en croissance (Vishveshwara, 1965). Mais ces méthodes ne permettent pas de réaliser commodément la duplication chromosomique d'une souche déterminée.

Dans ce but, deux types de traitements localisés ont été appliqués : le prélèvement, l'imprégnation

de colchicine et le greffage des sommets des tiges coupées sur l'hybride triploïde *C. arabica* × *C. canephora*, pour obtenir l'hexaploïde correspondant (Mendes, 1947) ; des injections de colchicine par microcapillaires, sur les méristèmes apicaux en place de *C. canephora* (Sondahl, 1971). Mais ces expériences n'ont pas été répétées : l'action de la colchicine sur des cellules méristématiques intégrées dans des amas cellulaires déjà différenciés est très aléatoire.

Pour pallier le caractère aléatoire des méthodes d'obtention de polyploïdes issus de clones déterminés, nous avons mis au point en Côte d'Ivoire une autre technique. Dans ce cas, l'application de colchicine est réalisée localement, au voisinage de nombreux bourgeons axillaires, choisis parmi les plus réduits (méristèmes paucicellulaires) ; simultanément à l'application de la colchicine, la mise en activité des bourgeons traités est provoquée par la levée d'inhibition apicale résultant de la cassure de la partie de tige située au-dessus d'eux. C'est cette nouvelle méthode d'obtention de polyploïdes que nous allons présenter.

## MÉTHODE DE POLYPLOÏDISATION

La méthode de production de polyploïdes par traitements localisés de bourgeons à la colchicine s'inspire de techniques expérimentales utilisées pour mettre en évidence les corrélations d'inhibition (Nozeran, 1971).

### Le matériel végétal

Les clones utilisés proviennent de la collection de l'IFCC. Une cinquantaine de clones de l'espèce *C. canephora* sont installés en parc à bois pour préparer des essais agronomiques ou de sélection.

Trente de ces clones ont été choisis pour représenter la variation morphologique de l'espèce et la variation des teneurs en caféine en Côte d'Ivoire, de 2,0 % à 3,7 %. De plus, un clone triploïde hybride interspécifique naturel a été traité en ombrière à l'état de bouture âgée de huit mois (clone 393).

La conduite des caféiers en parc à bois présente les particularités suivantes : tous les plants sont issus de boutures élevées en ombrière sur une seule tige. Cette tige est inclinée et arquée à la plantation pour favoriser le développement de nouvelles tiges orthotropes. Tous les bourgeons plagiotropes sont supprimés dès leur apparition.

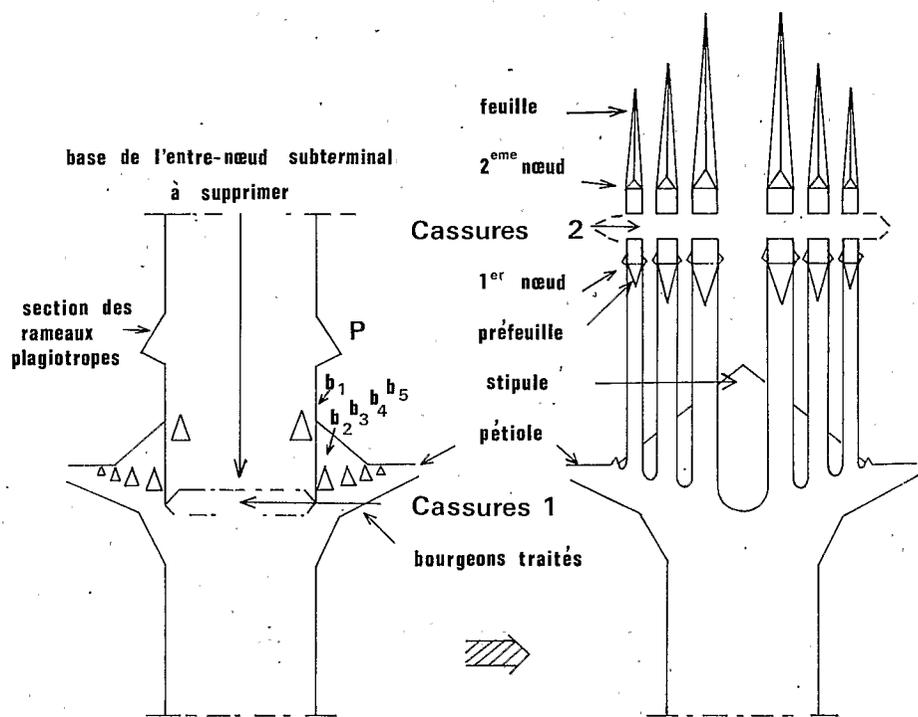


Schéma 1. — Emplacement des bourgeons latents à supprimer ou à traiter, localisation des cassures successives de tiges, situation de la zone d'application de la colchicine

Le renouvellement et le renforcement des tiges sont assurés par la taille, de manière à maintenir toutes les nouvelles tiges à l'état vert, non lignifié. Enfin l'état sanitaire des clones reçoit une surveillance particulière.

## La méthode de traitement

Au sommet de chaque tige, à partir d'un stade déterminé de la différenciation, les formations méristématiques sont spécialisées à chaque aisselle foliaire : un seul bourgeon à développement immédiat constitue l'axe plagiotrope ; à sa suite, plusieurs bourgeons latents sont susceptibles de reconstituer des axes orthotropes en cas de mortification du méristème apical. Ces bourgeons sont de plus en plus réduits au fur et à mesure que l'on descend dans la série des bourgeons latents (Moens, 1963). Dans le schéma 1, et dans la suite du texte, ces bourgeons sont numérotés, des plus développés aux plus réduits, de 1 à 5, et de 1' à 5'.

La cassure de la tige, à la base de l'entre-nœud subterminal, provoque la levée de l'inhibition apicale, et supprime les bourgeons  $b_1$  et  $b'_1$  : ceux-ci ont été entraînés en position subaxillaire, au cours de l'élongation de la tige, laissant

en place les autres bourgeons sériaux, qui sont conservés.

Dégagée par l'ablation soignée de la tige pour ménager l'intégrité des stipules, la blessure interstipulaire destinée à recevoir la colchicine a l'aspect d'une petite cuvette, dont le fond est la section des segments foliaires, et dont les bords sont les stipules, en position opposée, et les portions basales des pétioles ;  $b_2$  et  $b'_2$  sont visibles de part et d'autre.

Situées à l'aisselle d'ébauches de préfeuilles au moment du traitement, les cellules méristématiques axillaires des bourgeons sériaux  $b_2$ ,  $b_3$ ,  $b_4$  et  $b'_2$ ,  $b'_3$ ,  $b'_4$  forment, avec les cellules apicales des bourgeons sériaux les plus réduits  $b_5$  et  $b'_5$ , les cibles soumises à l'agent mitoclasique. Elles sont donc localisées dans quatorze amas méristématiques distincts.

La première intervention consiste donc à casser la tige à la base de l'entre-nœud subterminal et à appliquer dans le creux interstipulaire deux gouttes de colchicine à 1 % dans l'eau en une dose unique.

La solution de colchicine est laissée à l'air libre saturé, à une température extérieure de 30 °C environ, tôt en matinée, ou tard l'après-midi, au cours des périodes favorables à la croissance de la végétation, soit en début soit en fin de saison des pluies à Divo (Côte d'Ivoire).

Photo 1. — Rameau de l'arbre triploïde hybride *C. arabica* × *C. canephora* : clone 393 (en bas) ; rameau de l'arbre hexaploïde 393 H, issu du précédent par duplication chromosomique (en haut)

Cl. ORSTOM, photos D. Le Pierrès.



## Le tri des formations polyplôïdes

Les lignées cellulaires polyplôïdes sont triées et retenues à la suite de trois phases successives d'observation, puis de tri des rejets mixoploïdes et enfin de tri de rejets polyplôïdes au sein des formations mixoploïdes.

## Le développement des bourgeons

Simultanément les six bourgeons entrent en activité et inhibent les bourgeons des aisselles inférieures ; ces bourgeons sont laissés en croissance libre pendant trois semaines environ.

La paire de préfeuilles opposées est toujours laissée en place, car sa forme, trop irrégulière, n'intervient pas dans la distinction des modifications induites. Au contraire, peu après leur apparition, les deux feuilles opposées au-dessus des préfeuilles permettent de déceler les modifications sous-jacentes éventuelles : tant que leur allongement n'excède pas 4 cm, elles poussent en position verticale, appliquées l'une contre l'autre. A ce stade, toute dissymétrie dans la croissance d'un bourgeon ou de ses feuilles s'observe facilement. Dans le cas contraire, lorsque les jeunes feuilles poussent de façon symétrique et sans modification secondaire (feuilles bifides, feuilles arrondies), la jeune tige est décapitée par cassure, dans le second entre-nœud nouvellement formé ; la crois-

sance des bourgeons issus des cellules-cibles est alors stimulée. Ces cassures sont provoquées régulièrement toutes les semaines pendant deux mois et affectent la majorité des bourgeons non touchés.

## Le repérage des formations mixoploïdes

Un bourgeon chimère comportant des secteurs polyplôïdes a un développement plus lent et anarchique : feuilles opposées inégales ou bifides.

Dès l'apparition de ces perturbations, tous les autres bourgeons sont supprimés pour provoquer le développement des bourgeons modifiés ; cette suppression respecte l'équilibre des corrélations d'inhibition, pour maintenir à l'état latent les bourgeons axillaires de la tige situés en position inférieure.

Sur le limbe des feuilles, les plages cellulaires polyplôïdes se repèrent facilement, par leur aspect foncé, épais et profondément nervé. Les bourgeons d'aisselles situés dans ces secteurs sont stimulés en deux temps : maintien des bourgeons des secteurs non modifiés, quand ils servent provisoirement de nourrice, puis ablation de ces mêmes bourgeons lorsqu'ils entrent en compétition.

Les feuilles portées par des bourgeons polyplôïdes ont un développement symétrique, de part et d'autre de l'axe de la tige ou de la nervure centrale. De plus, dès leur apparition, leur forme est modifiée, suivant des données caractéristiques (tableau I, p. 200) ; leur aspect est très différencié (photo 1).

TABLEAU I

Modification de la taille et de la forme des feuilles induite par polyploïdisation sur quatre clones diploïdes *C. canephora*

Clones	Longueur (cm)		Largeur (cm)		Rapport diamétral	
	2 x	4 x	2 x	4 x	2 x	4 x
A 03 .....	20,9 ± 3,6	14,9 ± 2,8	9,1 ± 1,8	7,5 ± 1,6	2,26 ± 0,24	1,98 ± 0,26
60 .....	14,3 ± 3,4	12,5 ± 3,0	5,8 ± 1,4	6,2 ± 1,6	2,37 ± 0,42	2,02 ± 0,24
149 .....	22,7 ± 4,0	19,7 ± 3,8	9,2 ± 2,6	9,8 ± 2,8	2,45 ± 0,36	2,02 ± 0,36
200 .....	16,4 ± 4,2	15,9 ± 3,6	7,5 ± 1,6	8,4 ± 1,8	2,19 ± 0,34	1,89 ± 0,28

### L'élimination des formations non polyploïdes

L'élimination des cellules du génotype initial, au sein de lignées cellulaires polyploïdes a été réalisée par bouturages successifs : sur douze clones tétraploïdes issus de clones mixoploïdes après un premier bouturage, seul l'un d'eux s'est révélé encore mixoploïde. Dans leur ensemble, les résultats d'hybridations avec *C. arabica* montrent qu'il n'y aurait pas, chez le caféier, de chimères très stables.

Une autre technique d'élimination des cellules du génotype initial a consisté à effectuer la sélection des formations polyploïdes en place : un type de croissance sympodial est provoqué par cassures successives du sommet, induisant chaque fois la mise en activité de bourgeons dans la zone polyploïde néoformée ; le contrôle de la mixoploïdie met à profit le type d'architecture articulée acrotone des caféiers (Mangenot, 1973).

### Le contrôle de la polyploïdie

On peut affirmer que les bourgeons à l'aisselle de ces feuilles modifiées sont le plus souvent polyploïdes : d'une part, la fécondation de *C. arabica* par différents pollens issus de clones de *C. canephora* tétraploïdes a donné trois cent quatre « Arabusta » tétraploïdes, pour vingt-six hybrides triploïdes (la présence de ces hybrides triploïdes

montre que la tétraploïdisation était incomplète pour l'un des trois clones considérés) ; d'autre part, le dénombrement des chromosomes en métaphase I de la méiose pollinique a montré qu'il s'agissait bien de polyploïdes.

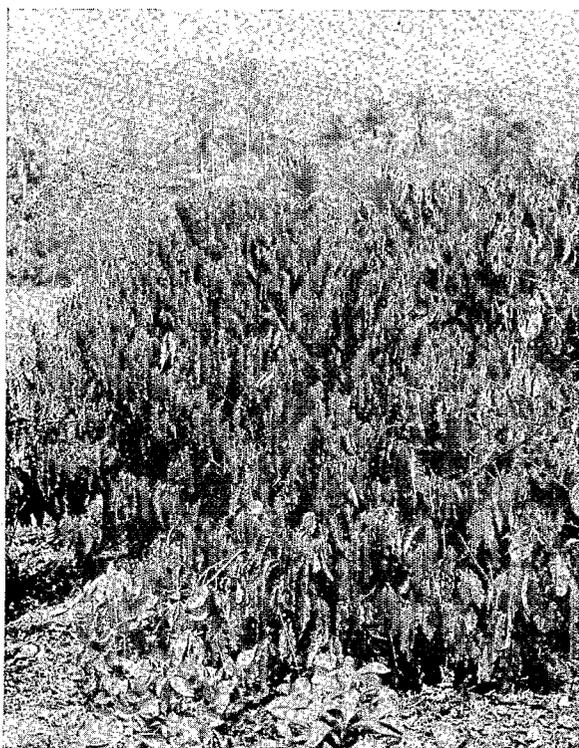


Photo 2. — Aspect général de l'arbre hybride 393 triploïde.

## RÉSULTATS

Dans les conditions de la Côte d'Ivoire, cette technique convient parfaitement aux caféiers de l'espèce *C. canephora* et à ses hybrides avec *C. ara-*

*bica*. Ces arbres sont pour la plupart spontanément multicaules, à croissance rapide et à lignification différée.

Les résultats acquis répondent au but assigné à cette technique : assurer, en un an, la polyploïdisation d'un clone déterminé.

Les tétraploïdes des clones diploïdes de *C. canephora* ont été obtenus sans difficulté. Mesurée par le nombre de tiges diploïdes traitées pour obtenir à coup sûr une tige tétraploïde, l'efficacité de la méthode est de soixante par clone en moyenne ; ce qui représente huit cent quarante méristèmes-cibles soumis à l'agent mitoclasique.

Dans le cas de l'hybride triploïde *C. arabica* × *C. canephora* (clone 393), l'efficacité de la méthode est de six tiges traitées pour obtenir une tige hexaploïde, soit au total quatre vingt-quatre méristèmes-cibles traités (photos 1, 2 et 3).

La technique s'applique aussi aux *C. arabica* cultivés dans les conditions d'altitude moyenne.

Par contre, elle reste aléatoire dans le cas des espèces *C. stenophylla* et *C. excelsa* : les tiges en champ sont trop lignifiées et trop peu nombreuses pour permettre la multiplication de traitements localisés.



Photo 3. — Aspect général de l'arbre hybride 393 H issu du clone 393 par duplication chromosomique

## DISCUSSION — CONCLUSION

La technique décrite est simple : elle est utilisée en série sur de grandes quantités de matériel.

Elle se résume en effet aux opérations suivantes :

— cassure du sommet de la tige, au niveau de la base des stipules qui enserrant l'entre-nœud subterminal,

— application locale de colchicine par l'ouverture entre les stipules,

— cassure des nouvelles tiges non modifiées, ou section au greffoir des secteurs non touchés, au-dessus des préfeuilles néoformées.

Elle permet une économie de moyens : elle est plus rapide que la méthode de polyploïdisation par traitement de semences ou de jeunes plants ; les modifications induites apparaissent dès le premier mois en cas de réussite, alors qu'elles ne sont décelables qu'après deux mois de croissance plus lente lorsque le traitement est appliqué à de jeunes caféiers ; ultérieurement, pour obtenir leur floraison dans le délai d'un an, il suffit de maintenir les formations polyploïdes nouvelles sur l'arbre qui les a produites. Dans le cas similaire de boutures traitées localement, la floraison peut intervenir en deux ans. De plus, si la teneur en colchicine de la solution utilisée est plus élevée (1 %,

au lieu de 0,3 % dans le cas du traitement de graines en germination), la quantité de colchicine nécessaire est bien moindre en traitement localisé.

C'est enfin une technique générale : elle est équivalente à la technique de polyploïdisation par greffage des tiges imprégnées de colchicine, lorsque l'arbre traité a une croissance vigoureuse (Mendes, 1947). Son champ d'application s'étend aussi au matériel végétal inapte à la reproduction par graines (hybrides triploïdes, dihaploïdes de *C. arabica*). Il suffit que le matériel de départ soit élevé dans de bonnes conditions de croissance végétative.

En plus de ces avantages pratiques, cette technique permet, comme dans toutes les techniques de traitements localisés, de conserver le génotype sous sa forme initiale, qu'ils réussissent ou qu'ils échouent. Par contre, dans une plantule modifiée issue de traitement de graines, à moins de précautions jamais prises jusqu'à présent, le génotype de départ est perdu.

A chaque génotype polyploïde obtenu correspond donc un génotype diploïde de l'espèce *C. canephora* ou un génotype triploïde hybride *C. arabica* × *C. canephora* connu. De plus, le transfert des caractères spécifiques de ce génotype s'effectue à travers les auto-duplications de ses chromosomes.

Elles affectent soit leur totalité, dans le cas d'auto-tétraploïdes, soit la moitié d'entre eux, dans le cas d'un hexaploïde issu de triploïde : le transfert des caractères par auto-duplication est relatif aux arrangements chromosomiques initiaux (Demarly, 1972). L'avantage de la méthode est de permettre le contrôle des conditions génétiques initiales de la duplication chromosomique, par le choix de l'arbre à polyploïdiser. Cette méthode apporte donc une meilleure précision dans l'analyse des

problèmes posés par les hybridations interspécifiques dans le genre *Coffea*.

En conclusion, il est démontré que les traitements localisés à la colchicine ont une efficacité remarquable sur des bourgeons latents situés à l'aisselle de jeunes feuilles, dans l'espèce *C. canephora* et ses hybrides triploïdes avec *C. arabica*. Cette technique est maintenant appliquée aux autres espèces de caféiers et à des hybrides interspécifiques variés, tant en Côte d'Ivoire qu'à Madagascar.

## BIBLIOGRAPHIE

1. CAPOT (J.) *et al.* — L'amélioration du caféier en Côte d'Ivoire. Duplication chromosomique et hybridation. *Café Cacao Thé* (Paris), XII, n° 2, 1968, p. 114-126.
2. CAPOT (J.) — L'amélioration du caféier en Côte d'Ivoire. Les hybrides « Arabusta ». *Café Cacao Thé* (Paris), XVI, n° 1, 1972, p. 3-18.
3. CRAMER (P. J. S.) — A review of literature of coffee research in Indonesia. SIC Editorial IAIAS (Turrialba, Costa Rica), 1957, 262 p.
4. DEMARLY (Y.) — Commentaires sur les aptitudes à la combinaison. *Ann. Amél. Plantes*, INRA (Paris), 1972, 2, p. 187-200.
5. MANGENOT (M.) — Données élémentaires sur l'angiospermie. *Ann. de l'Université d'Abidjan*, 1973, E-VI-Fasc. 1, 233 p.
6. MENDES (A. J. T.) — Observações citológicas em *Coffea*. XI. Métodos de tratamento pela colchicina. *Bragantia* (Campinas), 1947, 7, p. 221-230.

7. MOENS (P.) — Etude morphologique et morphogénétique des bourgeons végétatifs et génératifs de *Coffea canephora*. *La cellule*, 1963, t. 63, n° 2, 244 p.
8. NARASIMHASWAMY (R. L.), VISHVESHWARA (S.) — Report on hybrids between some diploid species of *Coffea*. *Indian coffee* (Bangalore), 1961, vol. XXV, n° 3, p. 104-109.
9. NOZERAN (R.) — Intervention of internal correlations in the morphogenesis of higher plants. *Adv. Morphogenesis*, 1971, 9, p. 1-66.
10. SONDAHL (M. R.), MONACO (L. C.), CARVALHO (A.) — Novo método de obtenção de poliploidia em café usando colchicina. *Ciência e cultura*, 1971, vol. 23, VI, suplemento, p. 101.
11. VISHVESHWARA (S.), CHINNAPPA (C. C.) — Induced autotetraploid in *Coffea canephora* Pierre ex-Froehner. *Curr. Sci.*, 1965, 34, n° 3, p. 90-92.

BERTHOU (F.) — Méthode d'obtention de polyploïdes dans le genre *Coffea* par traitements localisés de bourgeons à la colchicine. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XIX, n° 3, juil.-sept. 1975, p. 197-202, sch., photos, tabl., réf.

BERTHOU (F.) — Method for obtaining polyploids of the genus *Coffea* by localized treatments of buds with colchicine. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XIX, n° 3, juil.-sept. 1975, p. 197-202, photos, sch., tabl., réf.

L'auteur décrit une méthode originale d'obtention de polyploïdes de caféiers mise au point en Côte d'Ivoire. Elle consiste en des applications localisées de colchicine au niveau de la série de bourgeons axillaires latents, simultanément à la levée d'inhibition apicale de ces méristèmes. Le tri des rejets polyploïdes est basé sur les modifications des caractères morphologiques dues à cette transformation. Cette technique simple est applicable à tous les types de matériel végétal, surtout s'il s'agit d'hybrides interspécifiques stériles. Elle permet en outre de réaliser la duplication chromosomique d'un génotype choisi sans le détruire.

The author describes an original method for obtaining polyploids in coffee trees developed in the Ivory Coast. It consists of localized applications of colchicine at the level of the set of latent axillary buds, simultaneously with the apical inhibition break of these meristems. The sorting out of polyploid young sprouts is based on the modifications of morphological characteristics due to this transformation. This simple technique is applicable to all types of plant material especially if sterile interspecific hybrids are involved. It makes it possible, in addition, to effect chromosomal duplication of a chosen genotype without destroying it.

BERTHOU (F.) — Methode zur Erlangung von Polyploidien in der Gattung *Coffea* durch lokalisierte Behandlung der Knospen mit Colchizin. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XIX, n° 3, juil.-sept. 1975, p. 197-202, photos, sch., tabl., réf.

BERTHOU (F.) — Método para obter poliploides en el género *Coffea* mediante tratamientos localizados de yemas con colchicina. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XIX, n° 3, juil.-sept. 1975, p. 197-202, sch., photos, tabl., réf.

Der Autor beschreibt eine originale Methode zur Erlangung von Polyploidien von Kaffeebäumen, die in der Elfenbeinküste fertiggestellt wurde. Sie besteht in lokalisierten Applikationen von Colchizin in der Höhe der Reihe der latenten Axillarknospen gleichzeitig mit der Aufhebung von Gipfelhemmung dieser Meristeme. Das Sortieren der polyploiden Schösslinge beruht auf den Veränderungen der morphologischen Charaktere, die dieser Verwandlung zuzuschreiben sind. Diese einfache Technik ist für jede Art von Pflanzenmaterial anwendbar, besonders wenn es sich um unfruchtbare interspezifische Hybriden handelt. Sie erlaubt ausserdem eine Duplikation der Chromosome eines gewählten Genotypus zu verwirklichen ohne ihn zu zerstören.

El autor describe un método original para obtener poliploides de café que fue desarrollado en la Costa de Marfil. Consiste en aplicaciones localizadas de colchicina a altura de la serie de yemas axilares latentes, simultáneamente al levantamiento de la inhibición apical de estos meristemas. La selección de los retoños poliploides se base en las alteraciones de los caracteres morfológicos debidas a dicha transformación. Esta técnica sencilla es aplicable a todos los tipos de material vegetal, sobre todo cuando se trata de híbridos interespecíficos estériles. Gracias a este método es posible, además, realizar la duplicación cromosómica de un genotipo seleccionado sin destruirlo.