

3EX

CONSERVATION DES RESSOURCES GÉNÉTIQUES CAFÉIÈRES EN VITROTHÈQUE

A. BERTRAND-DESBRUNAIS, A. CHARRIER
ORSTOM, B.P. 5045, 34032 Montpellier Cedex (France)

Depuis plus d'une vingtaine d'années, plusieurs prospections ont été réalisées en Afrique et à Madagascar par la FAO, le Muséum, l'ORSTOM et l'IRCC (Berthaud et Charrier, 1988). Ces prospections ont permis de constituer des collections de base de caféiers spontanés qui rassemblent plus de 30 espèces différentes du genre *Coffea* ainsi que quelques genres apparentés.

Les graines de caféiers sont de courte viabilité. Elles sont dites "récalcitrantes" aux méthodes de stockage couramment appliquées aux semences de céréales après dessiccation et maintien à basse température (-18°C à +5°C). Les méthodes de stockage utilisées par Van der Vossen au Kenya et Couturon en RCI consistent à maintenir les graines de caféiers dans une atmosphère à humidité saturante à des températures de 15 à 20°C. Leur survie ne dépasse pas, dans ces conditions, un ou deux ans.

Pour cette raison, les collections de caféiers sont rassemblées au champ dans les stations de recherche, véritables conservatoires des ressources génétiques de cette plante pérenne. Le maintien de telles collections comporte de nombreux risques bioclimatiques ou d'erreur humaine. Aussi, pour plus de sécurité, d'autres systèmes de conservation sont à l'étude.

Sous l'impulsion de l'IPBGR (1983), les techniques de culture *in vitro* ont été conseillées comme méthodes de conservation des ressources génétiques des espèces récalcitrantes. En multipliant *in vitro* les plantes, à partir des collections de base, les différents centres de recherche caféière peuvent ainsi disposer du patrimoine génétique en vitrothèque et échanger aisément du matériel sain. Pour limiter les problèmes de repiquages (main d'oeuvre, risque de contamination ou d'erreur d'étiquetage) et de variation au cours du temps, on préconise aussi de stocker pour le long terme dans l'azote liquide (cryoconservation).

La culture *in vitro* est déjà au point pour les espèces cultivées de caféier. On se reportera aux synthèses de Monaco *et al.* (1977), de Söndahl et Sharp (1979) et de Dublin (1984). Nous avons étudié, dans les laboratoires ORSTOM de Montpellier, les possibilités de multiplication et de stockage *in vitro* des ressources génétiques des caféiers c'est à dire une grande diversité d'espèces et de souches. Nous avons ainsi réalisé des essais pour la mise en place d'une vitrothèque formée de microboutures en vue d'un stockage de plantules à moyen terme en vie ralentie et des études de cryoconservation d'embryons somatiques pour le stockage à long terme.

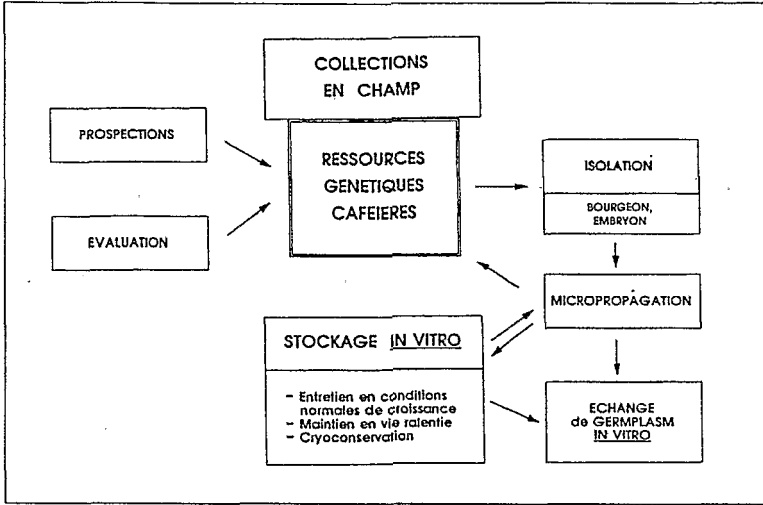
16 NOV. 1990

N° : 31 152 ex 1

Cote : B

III p13

Figure 1 : diagramme Ressources Génétiques



I - MATERIEL VEGETAL

L'introduction du matériel végétal *in vitro* peut se faire à partir des diverses parties de la plante : boutures de noeuds orthotropes, explants foliaires, embryons zygotiques...

Dans notre cas, la principale voie d'introduction en vitrothèque d'espèces nouvelles a été la culture d'embryons zygotiques. Les plantules ainsi obtenues *in vitro* sont multipliées par microbouturage. Cette technique a été privilégiée, car elle utilise comme matériel de départ, des graines à différents stades de développement, facilement transportables et supportant une désinfection très poussée.

Pour le *C. arabica*, qui est autogame, la descendance issue d'une même origine peut être considérée comme fixée lorsque l'on part d'une lignée identifiée. Mais il ne faut pas sous-estimer la part d'hétérozygotie résiduelle trouvée dans le matériel sauvage d'Ethiopie (Charrier, 1978b). Les autres espèces de caféiers, cultivés ou spontanés, sont allogames. Le prélèvement des échantillons de graines se fait donc soit réparti équitablement sur l'ensemble des arbres d'une même origine, par exemple une graine par arbre (SSD), l'ensemble des génotypes nous donne alors une image de la population, soit, plus rarement, sur un même arbre, on a donc, dans ce cas, une descendance maternelle.

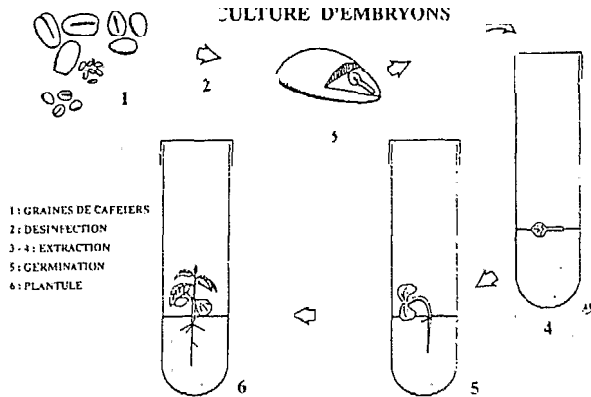
En comparaison, la mise en culture de noeuds orthotropes (Custers, 1980) permettant le clonage de souches hétérozygotes (des espèces allogames sélectionnées) nécessite des étapes supplémentaires, car le prélèvement se fait sur des plants, obtenus par bouturage, qui sont élevés en serre pour limiter les infections.

I - CULTURE *IN VITRO* D'EMBRYONS ZYGOTIQUES

Elle a été réalisée tout d'abord par Colonna (Colonna *et al.*, 1971) sur *C. canephora* et *C. dewevrei*. Plus récemment, Söndahl (Söndahl *et al.*, 1981) a étudié la croissance et le développement des embryons de *C. arabica* en plantules capables de pousser en serre.

Nous avons mis au point un protocole de germination *in vitro* d'embryons zygotiques matures et immatures, applicable à la mise en culture de nombreuses espèces.

Figure 2 : Culture d'embryons



Les embryons sont cultivés sur un milieu de Gamborg (1968) modifié, contenant de la cystéine comme anti-oxydant, mais dépourvu de toute substance de croissance. Les premières phases de la germination s'effectuent à l'obscurité, un passage ultérieur à la lumière permet le verdissement et le développement des premières feuilles.

PROTOCOLE DE GERMINATION *IN VITRO* D'EMBRYONS ZYGOTIQUES DE CAFEIER

DESINFECTION :

On stérilise la surface des graines par trempage dans une solution aqueuse d'Hypochlorite de Sodium à 12,5 % de Chlore actif pendant 20 mn.
Rinçage trois fois à l'eau stérile

EXTRACTION ASEPTIQUE DE L'EMBRYON :

L'embryon est dégagé par des incisions dans l'albumen corné. Il est prélevé dans des conditions stériles, et déposé à plat sur le milieu de culture dans un tube.

MILIEU DE CULTURE :

Eléments minéraux de B5 dilués de moitié,		
cystéine	11,4	mM
acide nicotinique	30	μ M
thiamine-HCl	30	μ M
pyridoxine	15	μ M
méso-inositol	550	μ M
saccharose	58,4	mM
agar	6,5	g/l

CONDITIONS DE CULTURES :

La température est à tout moment de 27°C.

STADES DE DEVELOPPEMENT**A L'OBSCURITE**

- .la racicule s'enfonce dans la gélose
- .la plantule se redresse
- .les cotylédons s'ouvrent

**A LA LUMIERE
12^h / 12^h**

- .la gemmule débourre et la tigelle s'allonge
- .la plantule a 2 ou 3 paires de feuilles

A ce stade du développement, on sectionne l'hypocotyle. La tigelle, ainsi prélevée, est repiquée sur le milieu de multiplication utilisé pour les microboutures.

III - LA VITROTHERQUE

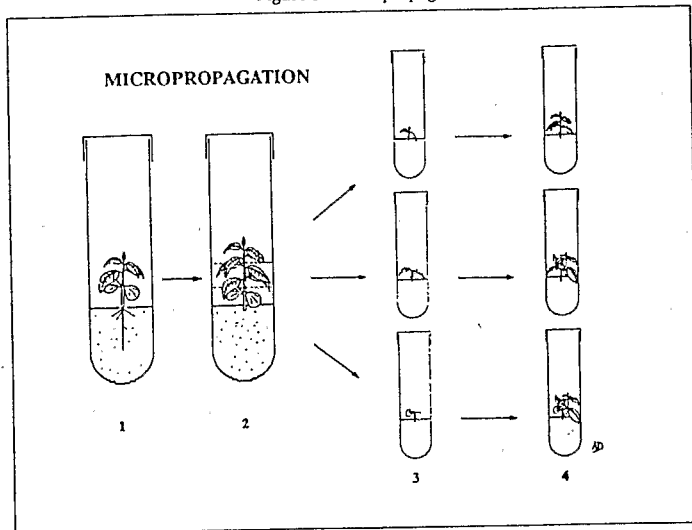
Dans la vitrothèque la plupart des espèces sont multipliées à partir d'un échantillon des différents génotypes de la population mise en culture. Dans certains cas, pour permettre des études de variabilité, toutes les microboutures issues d'une même plantule forment un clone et des sous-clones identifiés qui sont alors multipliés séparément.

La collection est entretenue en assurant au maximum le maintien de la stabilité génétique. Sur les milieux de croissance utilisés, la plupart des plantes miniaturisées montrent une forte dominance apicale. La multiplication se fait par la section des tiges en segments de deux à trois noeuds. Ces axes orthotropes sont issus du développement des bourgeons sériés latents, normalement formés à l'aisselle des feuilles. Il faut, en effet, proscrire toute utilisation des bourgeons adventifs que l'on peut trouver à la base de la microbouture, ou même sur l'hypocotyle.

Les microboutures sont repiquées sur des milieux différents selon les exigences des génotypes. Ils contiennent les éléments minéraux du B5 (Gamborg, 1968) ou du MS (Murashige & Skoog, 1962), avec ou sans BAP (Benzylaminopurine) à 1.3 μ M.

Ce protocole a permis l'introduction *in vitro*, et la multiplication par microbouturage de l'ensemble des espèces étudiées, malgré leur diversité d'origine et de comportement. La vitrothèque de travail, ainsi établie, est formée d'une quinzaine d'espèces.

Figure 3 : Micropropagation



MISE EN CULTURE

ESPECE	EXPLANT	POPULATION
<i>C. arabica</i>	ci, em, no	14
<i>C. bertrandi</i>	em	1
<i>C. canephora</i>	ci, no	10
<i>C. congensis</i>	ei	4
<i>C. heimii</i>	em	1
<i>C. liberica</i>	ei	1
<i>C. millotii</i>	em	3
<i>C. pseudozanguebariae</i>	ei	1
<i>C. pervilleana</i>	em	1
<i>C. racemosa</i>	ei	1
<i>C. resinosa</i>	em	1
<i>C. richardii</i>	em	1
<i>C. sessiliflora</i>	ei	1
<i>C. tetragona</i>	em	1
<i>C. vatovavyensis</i>	em	1
<i>C. sp. (A 527)</i>	em	1
<i>C. sp. (A 801)</i>	em	1
<i>C. sp. (A 955)</i>	em	1

Légende : ci : embryon immature em : embryon mature no : noeud orthrope

L'utilisation de facteurs limitants la croissance (éléments minéraux, saccharose, température) permet d'espacer les repiquages (Galzy, 1985) (Westcott, 1981). L'intervalle maximum entre deux repiquages peut être de l'ordre d'un an pour des génotypes de *C. arabica*, dans les conditions de culture à 27°C.

**INTERVALLE MAXIMUM ENTRE DEUX REPIQUAGES
EN CONDITIONS NORMALES DE CULTURES (CHAMBRE A 27°C) :**

<i>C. arabica</i>	12 mois
<i>C. canephora</i>	6 - 8 mois
<i>C. liberica</i>	6 - 8 mois
<i>C. racemosa</i>	4 - 6 mois
<i>C. sessiliflora</i>	3 - 5 mois
<i>C. pseudozanguebariae</i>	3 - 5 mois

IV - CRYOCONSERVATION

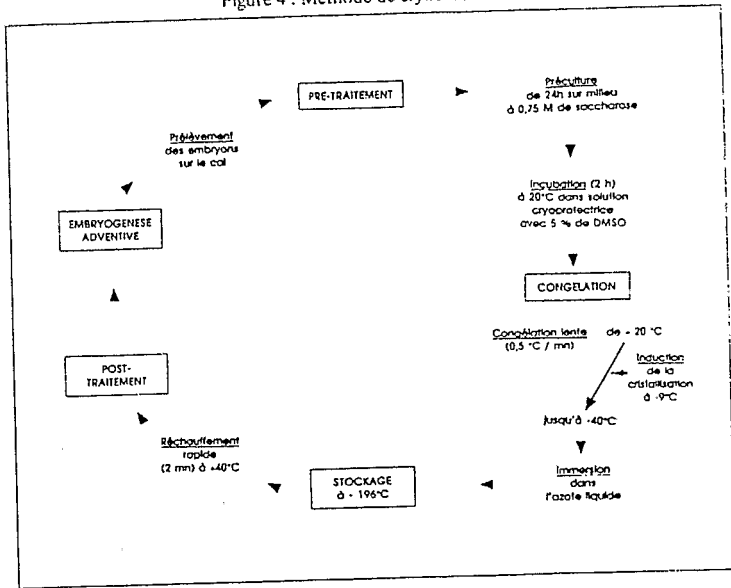
Un autre aspect de la conservation des caféiers *in vitro* a été abordé en utilisant la cryoconservation de souches embryogènes. C'est une méthode de stockage de méristèmes, embryons, cellules dans l'azote liquide (-196°C) à très long terme pendant laquelle toute activité métabolique cellulaire est arrêtée.

Les souches embryogènes proviennent d'explants qui sont mis en culture dans des conditions particulières décrites par Dublin (1981). Ils forment des cals porteurs d'embryons somatiques. Ces embryons, une fois isolés du cal, sont placés sur un milieu de croissance et se développent en plantule. Cette technique permet un taux de multiplication très élevé. Actuellement, une dizaine d'espèces de caféiers peuvent être multipliées par embryogenèse somatique. Les premiers essais de cryoconservation d'embryons somatiques ont été réalisés par A. Bertrand-Desbrunais (1988) avec des souches embryogènes de *C. arabica*.

Prélevés au stade globulaire, les embryons sont cultivés, pendant 24 heures, sur un milieu enrichi en saccharose. Placés dans un milieu liquide, le prétraitement des embryons se poursuit par l'adjonction de DMSO (Diméthylsulfoxyde) jusqu'à la concentration finale de 5 %. On répartit les embryons (par lot de 30 environ), avec 1 ml de milieu, dans des ampoules à cryogénie. Après un refroidissement lent, de 0,5°C/ mn, jusqu'à -40°C, les ampoules sont aussitôt plongées dans l'azote liquide. Les embryons peuvent être ainsi stockés à long terme. Après un réchauffement rapide, les embryons sont repiqués toutes les 24 h, sur des milieux dont la concentration en saccharose diminue progressivement, soit respectivement : 0,5 M ; 0,3 M et 0,1 M.

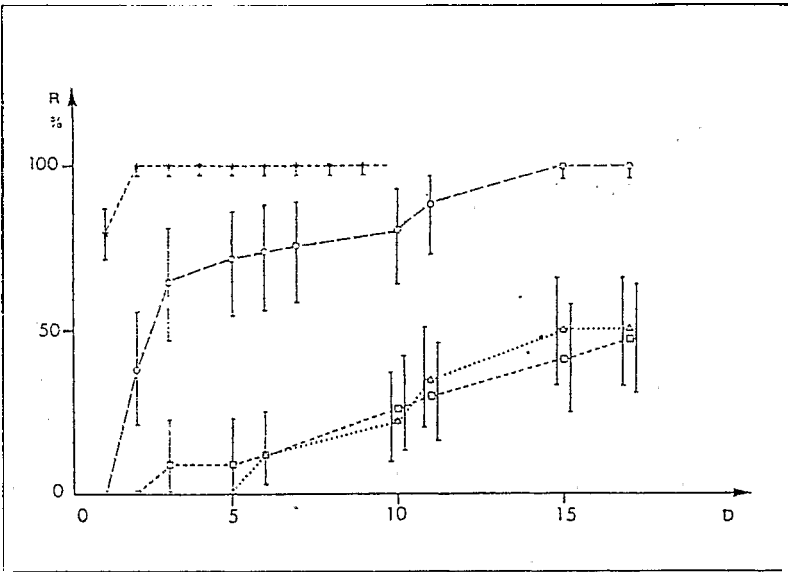
On note la survie des embryons traités par la reprise de la prolifération embryogène. Pour les embryons témoins, les premiers embryons adventifs apparaissent moins d'une semaine après la mise en culture, et quinze jours suffisent pour obtenir un taux de reprise de 100 %. Dans le cas des embryons ayant subi le prétraitement (saccharose et DMSO), le taux maximum est également atteint, mais plus progressivement, puisque quinze semaines sont nécessaires. La congélation à -40°C, ou dans l'azote liquide, a pour effet de diminuer le pourcentage de reprise. Les embryons néoformés n'apparaissent que dans 45 à 50 % des cas, après 17 semaines de latence. De plus 3 semaines sont nécessaires pour que l'on observe les premiers signes de l'embryogenèse adventive. Aucune différence significative n'apparaît entre les embryons congelés à -40°C et ceux ayant subi, en plus, le traitement à l'azote liquide.

Figure 4 : Méthode de cryoconservation



Le taux de reprise, proche de 50 %, est très encourageant. Les embryons néoformés, que l'on isole sur un milieu favorisant la croissance, se développent en plantules. Un processus similaire a été utilisé avec une souche de *C. canephora*, avec un taux de survie relativement élevé ; près de 55 %. La méthode décrite n'emploie pas d'hormone organochlorée toxique, comme le 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique), souvent utilisée pour accélérer la reprise de la prolifération. La régénération est lente mais ne passe par aucune dédifférenciation qui serait favorable aux variations somaclonales.

Figure 5 : Reprise de l'embryogenèse adventive



CONCLUSIONS

Les méthodes de culture *in vitro* mises au point sur quelques génotypes de cafiers cultivés sont donc applicables à diverses espèces : microbouturage, culture d'embryons et embryogenèse somatique sur cal.

L'utilisation du protocole, mis au point pour la culture d'embryons zygotiques, nous permet d'introduire de nouvelles espèces en vitrothèque. La collection en tube nous donne du matériel de base pour de nombreuses recherches de laboratoire et échange de matériel végétal.

L'établissement de la vitrothèque permet de continuer les expérimentations de conservation de vitroplants en vie ralentie et d'autres études de cryoconservation.

La conservation en vie ralentie va être facilitée par la mise en service d'une chambre de culture à température réduite (20°C) fin 89.

Une amélioration de la technique de cryoconservation sera aussi recherchée, les études porteront sur la diminution du temps de latence entre le réchauffement et la reprise de l'embryogenèse adventive par la recherche de conditions optimales (stade et état des pré-embryons, prétraitement, vitesse de congélation entre autres). D'autres approches sont envisagées comme celle préconisée par Pétiard (1989) qui, réfutant l'utilisation du DMSO, jugé trop toxique, obtient une reprise directe de chaque embryon congelé.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BERTHAUD J. et CHARRIER A., 1988 : in : Coffee, vol.4 Agronomy, Clarke R.J. et Macrae R. Eds, Elsevier, Londres, 1-42
- BERTRAND - DESBRUNAIS A. *et al.*, 1988 : C. R. Acad. Sci., (Paris), t. 307, 795-801
- CHARRIER A., Ed, 1978 b : Bulletin de l'IFCC (Paris) n°14
- CHARRIER A., 1986 : Café Cacao Thé 30 (2), 139-142
- COLONNA J.P. *et al.*, 1971 : C. R. Acad. Sci. (Paris), t 272, 60-63
- COLONNA J.P., 1972 : Café Cacao Thé 26 (3), 193-203
- COUTURON E., 1980 : Café Cacao Thé 24 (1), 27-32
- CUSTERS J.B.M., 1980 : 9^{ème} Colloque ASIC, 589-596
- DUBLIN P., 1981 : Café Cacao Thé, 25 (4), 237-242
- DUBLIN P., 1984 : Café Cacao Thé, 28 (4), 231-244
- GALZY R., 1985 : Bulletin de l'O.I.V., 650-651, 377-390
- GAMBORG O.L. *et al.*, 1968 : Exp. Cell Res., 50, 151-158
- IPBGR, 1983 : Report of the first meeting advisory comitee on *in vitro* storage, IPBGR, Rome
- IPBGR, 1984 : in : Crop genetic resources, HOLDEN J.H.T. et WILLIAMS J.T. Eds, IPBGR, Rome.
- KARTHA K.K. *et al.*, 1981 : Plant Science Letters, 22, 301-307
- MONACO L.C. *et al.*, 1977 : in : Applied and fundamental aspect of plant cell, tissue and organ culture, Reinert J. and Bajaj Y.P.S. Eds, Springer Verlag, Berlin
- MURASHIGE T. et SKOOG F., 1962 : Physiol. Plant., 15, 473-497
- PETIARD V., 1989 : communication personnelle
- SÓNDAHL M.R. et SHARP W.R., 1979 : in : Plant cell and tissue culture, 527-584, SHARP (W.R.) *et al.* Eds, Ohio State University Press (USA)
- SÓNDAHL M.R. *et al.*, 1981 : in : Plant Tissue Culture, Thorpe T.A. Ed, Academic press, New-York, 325-347
- VAN DER VOSSSEN H.A.M., 1979 : Seed Sci. and Technology, 7, 65-75
- WESTCOTT R.J., 1981 : Potato res., 24, 331-342
- WITHERS L.A., 1984 : in : Crop genetic resources, HOLDEN J.H.T. et WILLIAMS J.T. Eds, IPBGR, Rome, 138-157.

CONSERVATION DES RESSOURCES GENETIQUES CAFEIERES

EN VITROTHERQUE

Anna BERTRAND-DESBRUNAIS et André CHARRIER
ORSTOM, Montpellier (France)

Les prospections ORSTOM en Afrique ont permis d'établir d'importantes collections en champ de différentes espèces de caféiers cultivés et spontanés (Berthaud et Charrier, 1988). Leur conservation et leur utilisation pourraient être facilitées par les nouvelles technologies telles la culture *in vitro* et la cryogénie. L'ORSTOM a démarré des expériences de conservation des ressources génétiques en laboratoire, en vue d'apprécier les possibilités et les limites de cette approche. La micropropagation et l'embryogénèse somatique sur cal sont déjà opérationnelles pour les caféiers cultivés (Söndahl, 1988 ; Dublin, 1984).

L'introduction au laboratoire des caféiers par la culture *in vitro* d'embryons zygotiques a permis d'établir une vitrotèque de travail. Outre les deux espèces cultivées *C. arabica* et *C. canephora*, nous disposons d'une quinzaine d'autres espèces du genre *Coffea*.

Cette collection de plantes miniaturisées en tube est multipliée par un microbouturage avec développement des bourgeons latents pour assurer au maximum le maintien de la stabilité génétique. Pour le stockage à moyen terme, les microplantes sont maintenues en vic ralentie en limitant la croissance par appauvrissement du milieu de culture ou abaissement de la température.

La conservation à long terme en laboratoire relève d'autres techniques comme la cryoconservation. Celle-ci a été réalisée avec succès à partir de deux souches embryogènes, l'une d'*arabica* l'autre de *canephora* : il y a reprise de l'embryogénèse adventive sur des embryons somatiques, après leur congélation dans l'azote liquide.

IN VITRO COFFEE GERMLASM PRESERVATION

ORSTOM expeditions in Africa have allowed to establish important field collections from different species of cultivated and spontaneous coffee trees (Berthaud and Charrier, 1988). Conservation and exploitation should be improved by new technologies such as *in vitro* culture and cryopreservation. Micropropagation and somatic embryogenesis on calluses are already operational for the cultivated coffee trees (Söndahl, 1988; Dublin, 1984). ORSTOM, in Montpellier, has started several genetic resources conservation experiments in laboratory, in order to appreciate the possibilities and the limits of this approach.

The introduction of coffee trees in laboratory has been performed by *in vitro* culture of zygotic embryos which permitted to establish a working *in vitro* collection. In addition to the two cultivated species *C. arabica* and *C. canephora*, fifteen species from the *Coffea* genus are yet available.

This collection of miniaturized plants in tubes is multiplied by microcutting based on the development of latent buds in the aim of obtaining an optimal security for the maintenance of the genetic stability. For the medium-term storage, the microplants are maintained under growth-limiting conditions (lower nutrients contents, low temperatures).

The long-term storage in the laboratory comes under other techniques such as cryopreservation. This has been realized successfully with two embryogenic strains, one from *C. arabica*, the other from *C. canephora* : in both cases we noticed the recovery of an adventive embryogenesis of somatic embryos after freezing in liquid nitrogen.