

# LE TRI PRÉCOCE DES HAPLOÏDES D'ORIGINE SPONTANÉE DE *COFFEA CANEPHORA* PIERRE

*manuscrit*

E. COUTURON  
ORSTOM \*

## INTRODUCTION

La méthode d'isolement d'haploïdes spontanés mise au point à la station de l'ORSTOM à Man (Côte d'Ivoire) à partir de graines polyembryonnées immatures de l'espèce allogame diploïde *Coffea canephora* ( $2n = 22$  chromosomes) a permis, grâce au greffage d'embryons, l'obtention de quatre-vingt-deux plantes haploïdes dès 1980. Après dénombrement chromosomique, multiplication par greffage puis traitement à la colchicine, quarante génotypes haplo-diploïdes ont été installés en champ (Couturon, 1982 ; Couturon et Berthaud, 1982).

Ce nouveau matériel végétal a permis à Berthaud (1984) d'établir la transmission héréditaire des marqueurs enzymatiques chez cette espèce. L'obtention par croisements contrôlés entre ces souches diploïdes « homozygotes » des premières descendances  $F_1$  morphologiquement homogènes va permettre de développer des études de base sur la génétique de *C. canephora* et de déterminer leur intérêt pour l'amélioration de cette espèce (Charrier, 1985).

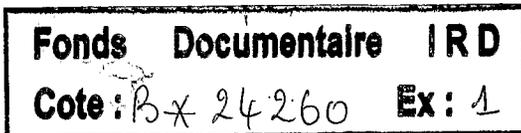
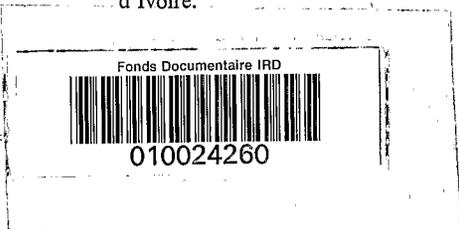
Afin d'assurer la diversification du matériel végétal haplo-diploïde disponible, une chaîne de

production a été mise au point. Plusieurs centaines de génotypes haploïdes sont ainsi isolés chaque année. Il n'est plus possible d'effectuer leur tri par dénombrement chromosomique. Leur reconnaissance à un stade précoce grâce à des caractères morphologiques foliaires et à une meilleure maîtrise des opérations techniques conduisant à la création des plantes « diploïdes homozygotes » a fait l'objet de recherches techniques, dont les résultats sont rapportés ici.

La relation entre le niveau de ploïdie et la densité stomatique établie chez les caféiers par Franco (1939) est couramment citée en bibliographie. Utilisée par Noirot (1978) dans le cadre d'une étude de la polyploïdisation de *C. canephora*, elle permet une séparation nette entre diploïdes et tétraploïdes. Il en est de même du rapport diamétral foliaire également utilisé par cet auteur pour le repérage des polyploïdes obtenus par traitement à la colchicine.

En se référant à ces travaux, nous présentons une méthode de tri des haploïdes qui évite leur contrôle cytologique. Elle est basée sur la mesure, au stade précoce, des rapports allométriques et des densités stomatiques foliaires chez les jeunes plantes issues des polyembryons de deux souches parentales de *C. canephora*.

(\*) ORSTOM (Institut français de Recherche scientifique pour le Développement en Coopération), B.P. 434, Man, Côte d'Ivoire.



# MATÉRIELS ET MÉTHODES

Nous avons étudié deux clones de *C. canephora* en collection, IF 200 et IF 420, qui produisent des polyembryons à une fréquence élevée (1 %). Après greffage, une sélection des jeunes plants possédant une à trois paires de feuilles est réalisée à la sortie des bacs de multiplication.

Ces plants présentent, à des degrés divers, des caractères morphologiques juvéniles — tige grêle, entre-nœuds réduits et feuilles étroites — qui ne nous permettent pas de déterminer leur nature haploïde ou diploïde. Nous avons retenu trois cent soixante et onze jeunes plantes issues de la souche IF 200 et soixante-six issues de la souche IF 420.

Ces jeunes plantes ont été élevées en pépinière, dans des conditions homogènes et soignées. Lorsqu'elles ont atteint le stade « quatre paires de feuilles », les dimensions du limbe foliaire (longueur et largeur) sont alors mesurées sur l'une des feuilles du niveau 3, après prélèvement. Cette feuille sert aussi à la prise d'une empreinte de 0,5 cm<sup>2</sup> environ sur la face inférieure du limbe, grâce à du rholoïd ramolli par l'acétone. Cette empreinte foliaire permet le dénombrement et la mensuration des stomates de chaque génotype par la moyenne de huit champs de microscope (surface d'un champ = 0,0962 mm<sup>2</sup>).

## RÉSULTATS

### Densité stomatique

Les histogrammes des fréquences des densités stomatiques mesurées chez les jeunes plantes issues des souches IF 200 et IF 420 montrent nettement l'existence de distributions bimodales (fig. 1 et 2). Les deux sous-populations mises en évidence ont les caractéristiques mentionnées dans le tableau I pour le nombre moyen de stomates par champ.

Ces deux groupes correspondent sans ambiguïté à la distinction des plantes haploïdes et des plantes diploïdes. Elles sont facilement reconnaissables d'après l'évolution de leurs caractères végétatifs. Les génotypes haploïdes conservent des tiges grêles et des feuilles lancéolées et correspondent

TABLEAU I

Nombres moyens de stomates par champ de microscope de 0,0962 mm<sup>2</sup> chez les plantes issues des souches IF 200 et IF 420

	IF200		IF420	
	2x	x	2x	x
Bornes	8 à 15	15 à 41	10 à 15	17 à 29
Moyenne	11,43	23,60	11,55	21,88
Ecart-type	1,27	4,49	1,09	2,46
Effectif	63	308	33	33

aux individus possédant en moyenne quinze à quarante et un stomates par champ sur la troisième paire de feuilles. Par contre, les génotypes diploïdes manifestent un épaississement et un allongement des entre-nœuds, qui s'accompa-

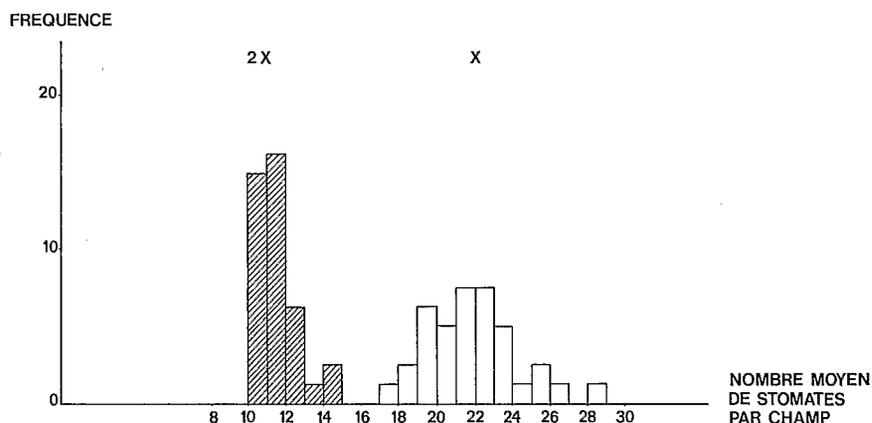


Fig. 1. — Histogramme des fréquences des densités stomatiques mesurées chez les jeunes plantes issues de la souche IF 420

gnent d'un élargissement des feuilles chez les individus à faible densité stomatique (huit à quinze stomates en moyenne par champ). L'état haploïde a été vérifié sur une dizaine de plantes par dénombrement chromosomique.

Nous n'avons pas effectué de mesure sur la taille des stomates. Néanmoins, nous avons observé qu'elle est environ le double chez les plantes diploïdes par rapport à celle des haploïdes (photos A et B).

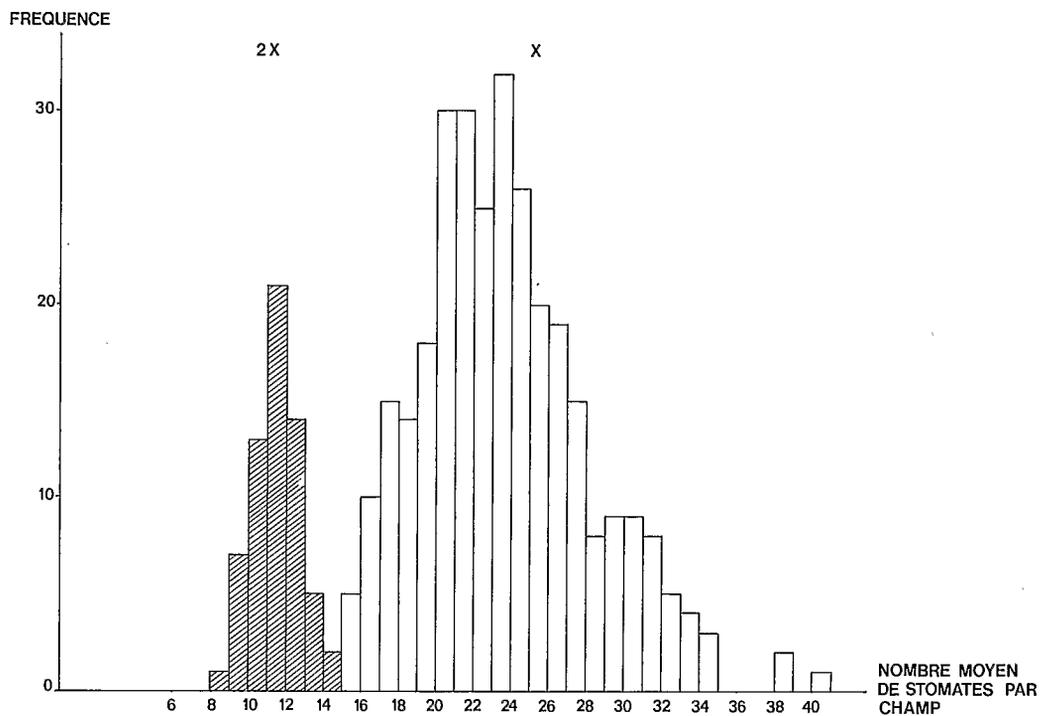


Fig. 2. — Histogramme des fréquences des densités stomatiques mesurées chez les jeunes plantes issues de la souche IF 200

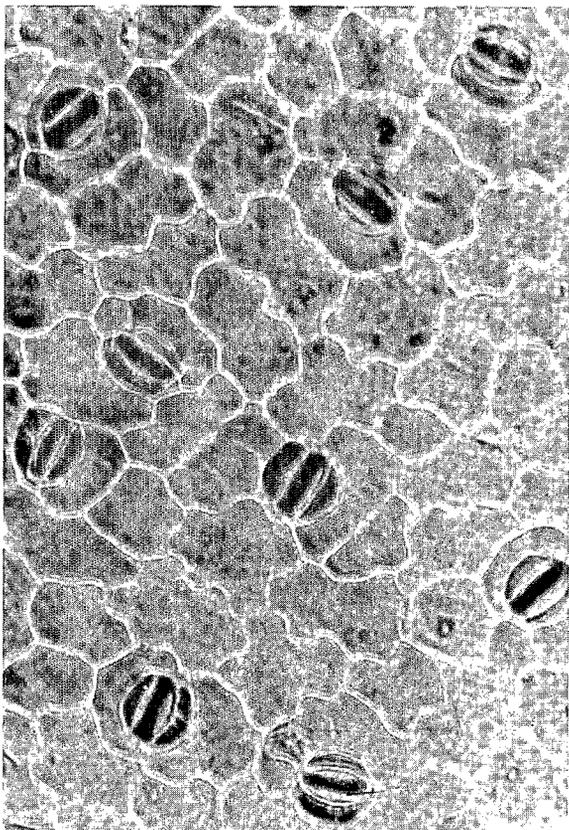


Photo A. — Stomates de plantes diploïdes (2x), grossissement 250x

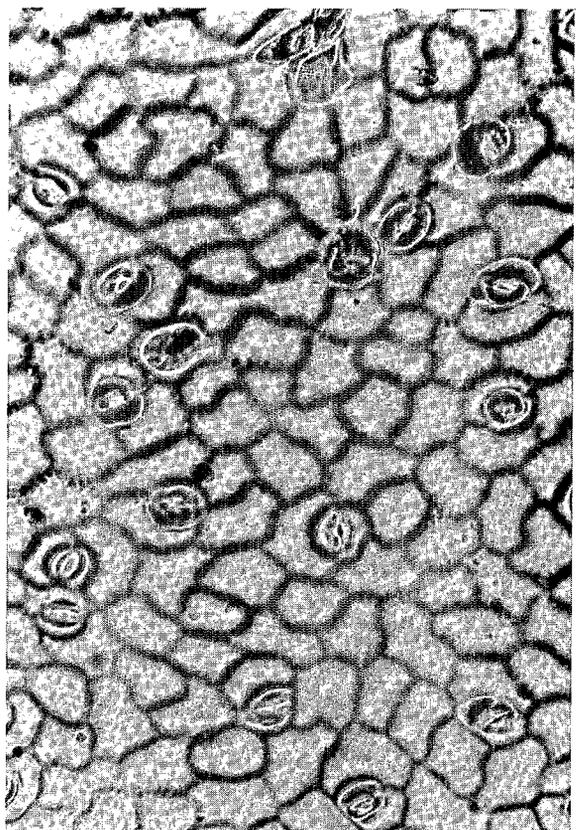


Photo B. — Stomates de plantes haploïdes (x), grossissement 250x

## Allométrie foliaire

L'histogramme des fréquences du rapport longueur/largeur de la troisième paire de feuilles des jeunes plantes issues de la souche IF 200 a une distribution normale (fig. 3). Ce critère ne permet donc pas à ce stade une discrimination précoce des individus haploïdes.

Cependant, si l'on considère les deux groupes identifiés par leurs densités stomatiques qui correspondent aux formes haploïdes et diploïdes, il apparaît clairement que la distribution du rapport longueur/largeur résulte de la juxtaposition de

deux sous-ensembles (fig. 3). Les plantes diploïdes possèdent une troisième paire de feuilles plus arrondies ( $L/l = 2$  à  $3$ ) que celles des plantes haploïdes ( $L/l = 3$  à  $4$ ).

Leur rapport diamétral moyen est significativement différent au seuil de probabilité 0,999.

Si l'on porte le rapport foliaire longueur/largeur en ordonnée et le nombre moyen de stomates par champ en abscisse, le diagramme de dispersion obtenu pour les jeunes plantes provenant des polyembryons de la souche IF 200 permet de visualiser la séparation nette existant entre le groupe des plantes haploïdes et celui des plantes diploïdes (fig. 4).

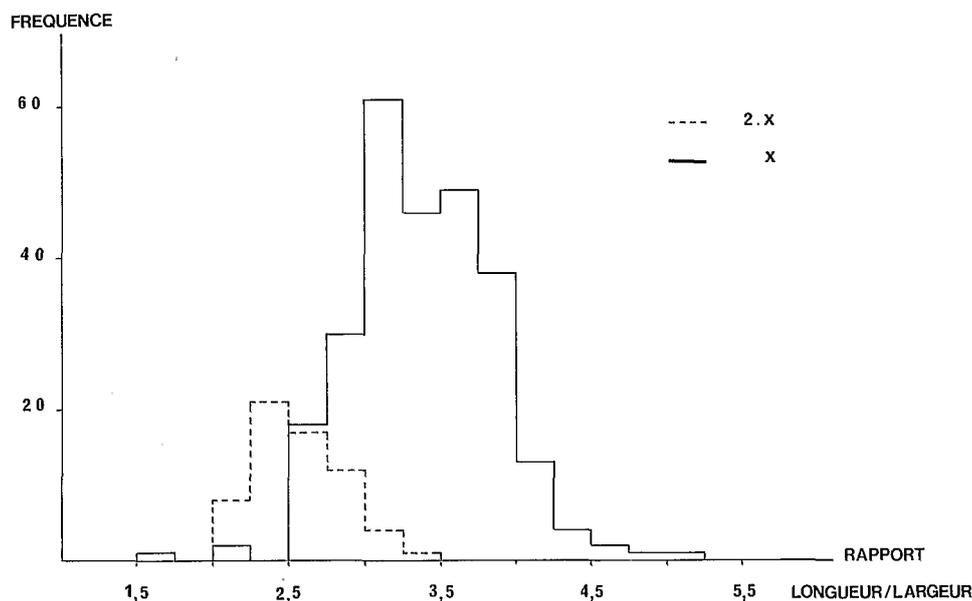


Fig. 3. — Histogramme des fréquences du rapport longueur/largeur de la troisième paire de feuilles des jeunes plantes issues de la souche IF 200

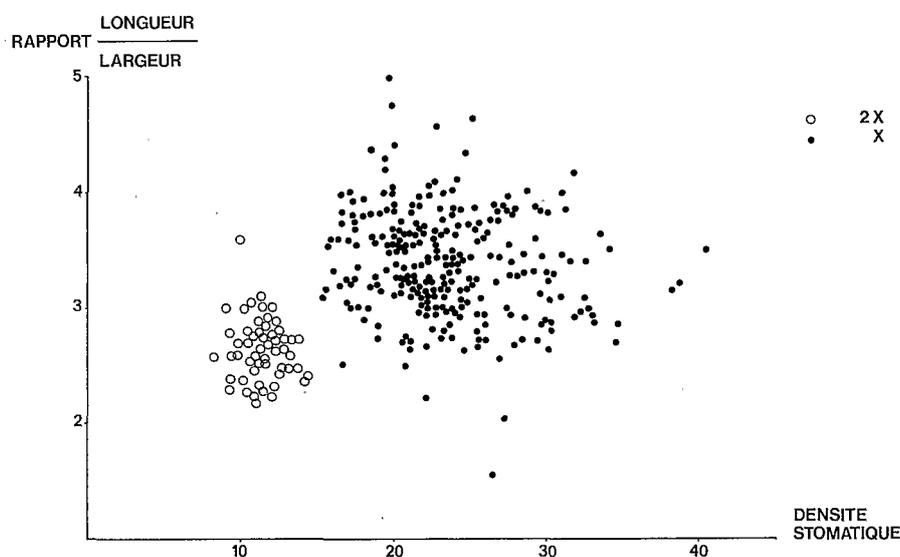


Fig. 4. — Diagramme de dispersion pour les jeunes plantes provenant des polyembryons de la souche IF 200

## CONCLUSION

Le repérage des jeunes plantes haploïdes de *C. canephora* parmi les individus obtenus par greffage de polyembryons est aisé lorsqu'elles ont atteint un développement végétatif suffisant pour les reconnaître en pépinière d'après leurs caractères morphologiques. Par contre, au stade jeune, nombre de plants chétifs possédant trois ou quatre paires de feuilles et qui paraissent haploïdes sont en réalité des diploïdes à croissance réduite.

La mesure du rapport diamétral de la troisième paire de feuilles montre qu'un tri basé sur la forme des limbes n'est pas réalisable à ce stade. En revanche, les densités stomatiques observées au même stade autorisent une sélection efficace

des génotypes haploïdes. La prise en compte simultanée de ces deux critères confirme l'existence de deux groupes distincts au sein de la population des polyembryons issus d'une même souche parentale.

En définitive, l'observation des stomates est une opération aisée qui permet, comparativement au dénombrement chromosomique, le contrôle rapide d'un grand nombre d'individus. L'application précoce de cette méthode permet une multiplication rapide des jeunes plantes haploïdes en vue de leur duplication chromosomique par la colchicine.

## BIBLIOGRAPHIE

- BERTHAUD (J.). — Les ressources génétiques pour l'amélioration des caféiers africains diploïdes. Evaluation de la richesse génétique des populations sylvestres et de ses mécanismes organisateurs. Conséquences pour l'application. Thèse de Doctorat Sciences Naturelles, Université Paris XI, Orsay, déc. 1984, 364 p.
- CHARRIER (A.). — Progrès et perspectives de l'amélioration génétique des caféiers. XI<sup>e</sup> Colloque Scientifique International sur le Café, Lomé, 11-15 févr. 1985. ASIC (Paris), 1986, p. 403-426.
- 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.
- 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.
- COUTURON (E.), BERTHAUD (J.). — Présentation d'une méthode de récupération d'haploïdes spontanés et d'obtention de plantes diploïdes homozygotes chez les caféiers de l'espèce *C. canephora*. X<sup>e</sup> Colloque Scientifique International sur le Café, Salvador de Bahia, 11-14 oct. 1982. ASIC (Paris), 1983, p. 385-391.
- DUBLIN (P.), PARVAIS (J. P.). — Sur la recherche des haploïdes issus des polyembryons chez le *C. arabica*. VII<sup>e</sup> Colloque International sur la chimie des cafés, Hambourg, 9-14 juin 1975. 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.
- MARKS (G. E.). — Selecting asparagus plants as source of haploïds. *Euphytica* (Wageningen), vol. 22, 1973, p. 310-316.
- NOIROT (M.). — Polyploïdisation de caféiers par la colchicine : adaptation de la technique sur bourgeons axillaires aux conditions de Madagascar ; mise en évidence de chimères périclinales stables. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XXII, n° 3, juil.-sept. 1978, p. 187-194.
- COUTURON (E.). — **Le tri précoce des haploïdes d'origine spontanée de *Coffea canephora* Pierre.** *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XXX, n° 3, juil.-sept. 1986, p. 171-176, 4 fig., 1 tabl., 2 photos, 9 réf.
- COUTURON (E.). — **The early sorting of spontaneous haploid plants of *Coffea canephora* Pierre.** *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XXX, n° 3, juil.-sept. 1986, p. 171-176, 4 fig., 1 tabl., 2 photos, 9 réf.

La méthode d'isolement d'haploïdes spontanés des *C. canephora* mise au point à la station ORSTOM de Man (Côte d'Ivoire) assure depuis 1980 la production d'un grand nombre de génotypes haploïdes. Leur tri parmi les polyembryons étant jusque là effectué par contrôle cytologique, une nouvelle méthode de tri applicable au stade précoce et d'utilisation plus aisée est présentée. Celle-ci est basée sur l'observation de la « troisième paire de feuilles » de jeunes plantules.

The method of isolating spontaneous haploid plants of *C. canephora* developed at the ORSTOM station at Man (Ivory Coast) has since 1980 produced a large number of haploid genotypes. As until then they had been sorted out from polyembryos by cytology checks, a new sorting method applicable to the early stage and easier to use is presented. It is based on the observation of the « third pair of leaves » of young seedlings.

At this stage, the measurement only of the foliar

A ce stade, la mesure de l'allométrie foliaire seule ne permet pas une discrimination entre haploïdes et diploïdes ; en revanche, l'observation des densités stomatiques autorise une sélection efficace des génotypes haploïdes (155 à 425 stomates/mm<sup>2</sup>) par rapport aux diploïdes (80 à 150 stomates/mm<sup>2</sup>). La prise en compte simultanée de ces deux critères confirme l'existence de deux groupes distincts au sein de la population des polyembryons issus d'une même souche parentale.

Comparée au dénombrement chromosomique, l'observation des stomates est une opération aisée permettant le contrôle rapide d'un grand nombre d'individus. Son application précoce permet une multiplication accélérée des jeunes haploïdes en vue de leur duplication chromosomique par la colchicine.

COUTURON (E.). — Die Frühauslese von Haploiden spontanen Ursprungs bei *Coffea canephora* Pierre. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XXX, n° 3, juil.-sept. 1986, p. 171-176, 4 fig., 1 tabl., 2 photos, 9 réf.

Die in der Versuchsstation ORSTOM von Man (Elfenbeinküste) entwickelte Methode der Isolierung spontaner Haploide bei *C. canephora* gewährleistet seit 1980 die Produktion einer Vielzahl haploider Genotypen. Da ihre Auslese unter den Polyembryonen bis jetzt zytologisch kontrolliert wurde, hat man eine neue Methode der Auslese im Frühstadium und einfacher in der Abwicklung vorgestellt. Die neue Methode basiert auf der Beobachtung des « dritten Blattpaars » von Jungpflanzen.

In diesem Stadium gelingt die Unterscheidung zwischen Haploiden und Diploiden im Wege des Messens der Blattallometrie allein nicht. Dagegen erlaubt die Beobachtung der Stomatadichte die wirksame Selektion haploider Genotypen (155 bis 425 Stomata/mm<sup>2</sup>) im Vergleich zu Diploiden (80 bis 150 Stomata/mm<sup>2</sup>). Die gleichzeitige Berücksichtigung beider Kriterien bestätigt den Umstand, dass ein und dieselbe Population von Polyembryonen aus dem gleichen Elternstamm zwei getrennte Gruppen umschließt.

Im Vergleich zur Chromosomenauszählung ist die Beobachtung der Stomata ein einfacher Vorgang, der die rasche Kontrolle sehr zahlreicher Individuen ermöglicht. Die früh einsetzende Beobachtung erlaubt eine beschleunigte Vermehrung der jungen Haploide mit dem Ziel ihrer chromosomischen Doppelung durch Colchizin.

allometry does not allow haploid plants to be distinguished from diploid plants. On the other hand, observation of stomata densities enables an efficient selection of the haploid genotypes to be made (155 to 425 stomata/mm<sup>2</sup>) as compared with the diploid genotypes (80 to 150 stomata/mm<sup>2</sup>). The simultaneous consideration of these two criteria has confirmed the existence of two distinct groups within the population of polyembryos derived from the same parental strain.

Compared with a chromosome count, the observation of stomata is an easy procedure enabling a large number of individuals to be checked rapidly. Its early application makes it possible to accelerate the multiplication of young haploid plants with a view to doubling their chromosome number by means of colchicine.

COUTURON (E.). — El escogimiento precoz de los haploides de origen espontáneo de *Coffea canephora* Pierre. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XXX, n° 3, juil.-sept. 1986, p. 171-176, 4 fig., 1 tabl., 2 photos, 9 réf.

El método seguido para el aislamiento de haploides espontáneos de los *C. canephora*, que se ha perfeccionado en la estación ORSTOM de Man (Costa de Marfil) viene permitiendo, desde 1980, la producción de un gran número de genotipos haploides. Dado que su escogimiento entre los poliembryones se venía efectuando hasta entonces por control citológico, se presenta en este artículo un nuevo método de escogimiento aplicado en la etapa precoz y cuya utilización es más cómoda y fácil. Este está basado en la observación de la « tercera par de hojas » de las plantas jóvenes.

En esta etapa, la medición de la alometría foliar únicamente, no permite obtener una discriminación entre haploides y diploides ; en cambio, la observación de las densidades estomáticas permite una selección eficaz de los genotipos haploides (155 a 425 estomas/mm<sup>2</sup>) con respecto a los diploides (80 a 150 estomas/mm<sup>2</sup>). El hecho de tener en cuenta simultáneamente ambos criterios viene a confirmar la existencia de dos grupos distintos en el interior de la población de los poliembryones procedentes de una misma estirpe parental.

Cuando se procede a su comparación con el recuento cromosómico, la observación de los estomas constituye una operación fácil y cómoda, que permite el control rápido de un gran número de ejemplares. Su aplicación precoz permite una multiplicación acelerada de los jóvenes haploides con miras a su duplicación cromosómica por la colchicina.