

ANALYSE EN ÉLECTROPHORÈSE DU POLYMORPHISME BIOCHIMIQUE DES CAFÉIERS :

Variation enzymatique dans dix-huit populations sauvages

Variation de l'ADN mitochondrial dans les espèces : *C. canephora*, *C. eugenioides* et *C. arabica*

F. BERTHOU, P. TROUSLOT, S. HAMON
ORSTOM, Centre d'Adiopodoumé, Côte d'Ivoire *

F. VEDEL, F. QUETIER
Université de Paris-Sud, Orsay, France

L'analyse en électrophorèse du polymorphisme des caféiers regroupe deux études réalisées, la première, au Centre ORSTOM d'Adiopodoumé (Côte d'Ivoire), sur la variation enzymatique dans les populations sauvages de caféiers, la seconde, à l'Université de Paris-Sud à Orsay (France), sur la variation de l'ADN mitochondrial dans quelques espèces du genre *Coffea*.

Le premier type d'analyse caractérise la population par ses fréquences allozymiques. Il contribue essentiellement à déterminer pour chaque espèce les modèles de variation qui lui sont propres, en

fonction des hétérozygoties moyennes et des distances génétiques entre populations. Notons qu'un allozyme est une forme moléculaire repérée en électrophorèse comme l'expression d'un gène : c'est un marqueur nucléaire.

Le second type d'analyse concerne l'ADN mitochondrial dans les espèces *C. canephora*, *C. eugenioides* et *C. arabica*, caractérisé en électrophorèse après son hydrolyse par l'enzyme de restriction Sal I. Les profils d'ADN mitochondriaux constituent des marqueurs génétiques non nucléaires, à hérédité maternelle.

L'une et l'autre de ces méthodes s'avèrent de bons outils pour la compréhension de l'organisation du genre *Coffea*. Nous présentons leur intérêt et leurs limites.

Exposé présenté au 9^e colloque scientifique international sur le café, Londres, juin 1980.

* BP V51, Abidjan, Côte d'Ivoire.

Café Cacao Thé, vol. XXIV, n° 4, oct.-déc. 1980

O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire

N° : 98 ex 1

Cote : B

Date ? 13 MARS 1981

TABLEAU I
Les échantillons analysés dans sept taxons du genre *Coffea*

Lettre de code (population)	Taxon	Localités d'origine	Nombre d'individus analysés
A	<i>C. congensis</i>	Anginga	42
B	<i>C. congensis</i>	Louma	46
C	<i>C. congensis</i>	M'houlou	45
D	<i>C. congensis</i>	Aval Bogassa	30
N	<i>C. liberica</i>	Ira)	29
P	<i>C. liberica</i>	Aboisso)	23
Q	<i>C. liberica</i>	Bimbo)	20
R	<i>C. liberica</i>	Pama)	15
H	<i>C. eugenioides</i>	Taressia	20
I	<i>C. eugenioides</i>	Nandi	20
J	<i>C. eugenioides</i>	Cheptuyet	20
S	<i>C. stenophylla</i>	Ira	13
T	<i>C. stenophylla</i>	Assabli	10
L	<i>C. humilis</i>	Taï	40
M	<i>C. humilis</i>	Momy	19
E	<i>C. canephora</i>	Libengé	32
G	<i>C. canephora</i>	Ira	41
F	Caféier de la Nana *	Dongué	45

* Le taxon "Caféier de la Nana" représente une seule population d'aspect hétérogène, certains individus sont morphologiquement proches de *C. canephora* et d'autres de *C. congensis*.

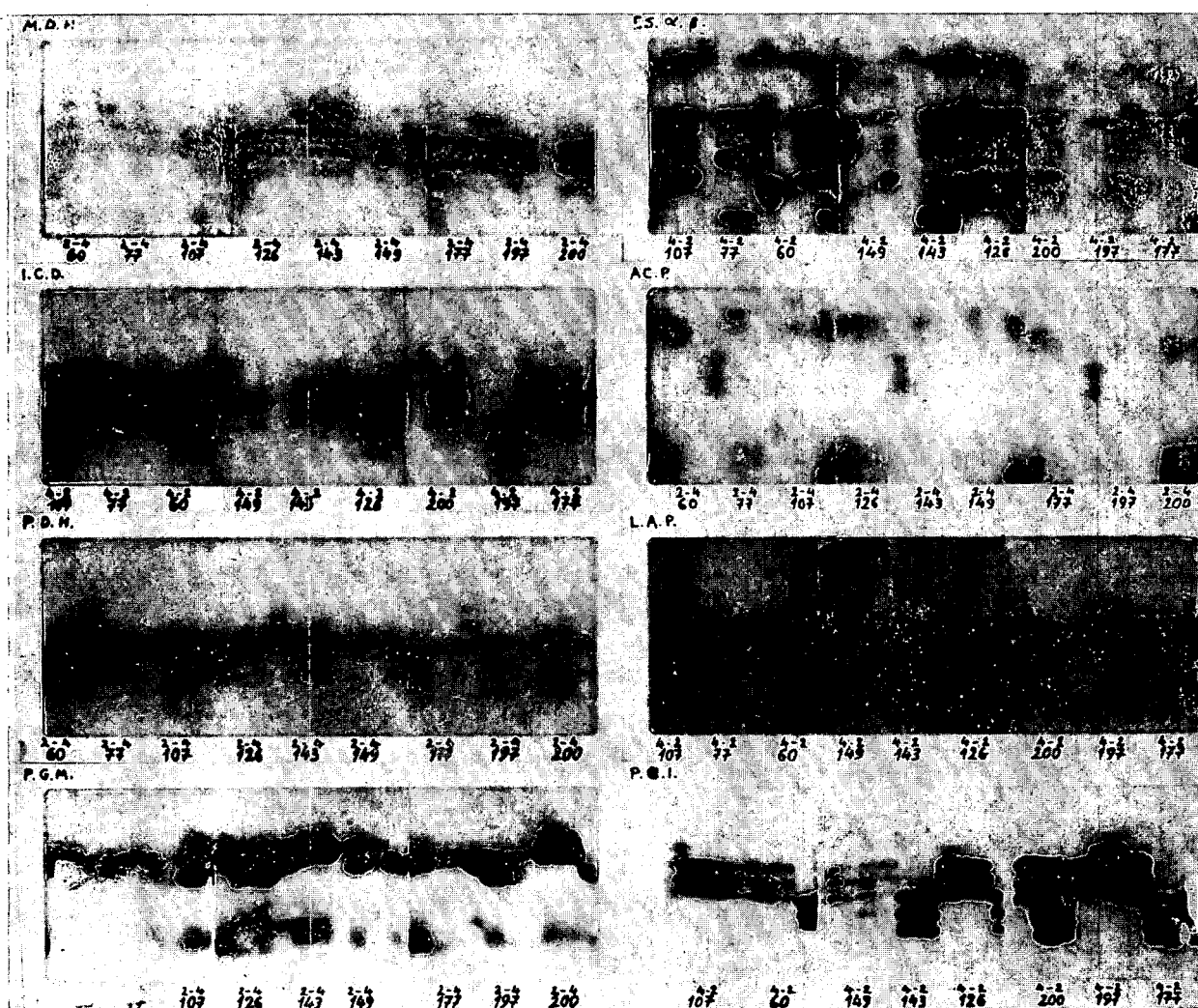


Fig. 1. — Les huit zymogrammes révélés en électrophorèse simultanée de huit enzymes, pour identifier une série de neuf génotypes *C. canephora*; colonne de gauche: trois oxydoréductases: malate déshydrogénase; isocitrate déshydrogénase; 6-phosphogluconate déshydrogénase et une transférase: phosphoglucomutase; colonne de droite: deux hydrolases: estérase, phosphatase acide, une peptidase: leucine aminopeptidase et une isomérase: phosphoglucose isomérase

VARIATION ENZYMATIQUE DANS LES POPULATIONS SAUVAGES

Nous examinerons : le matériel végétal, les méthodes biochimiques, les bases génétiques du polymorphisme, les fréquences allozymiques par population, les modèles de variation pour chaque espèce, l'intérêt et les limites de cette méthode pour l'analyse des relations phyllétiques.

Le matériel végétal

Sur le tableau I figurent les localités d'origine et les effectifs par population dans les sept taxons étudiés.

D'après leur localisation, les populations sont soit regroupées dans une même région de dimension restreinte vis-à-vis de l'aire de répartition (*C. congensis*, *C. eugenioides*), soit espacées sur toute l'étendue de l'aire de répartition (*C. liberica*), soit encore isolées à des pôles extrêmes de leur aire de répartition (*C. stenophylla*, *C. humilis*, *C. canephora*). Dans ce dernier cas, les populations intermédiaires n'ont pas été étudiées pour différentes raisons : ou bien elles n'existent pas (*C. stenophylla*, échantillonné à l'est (Assabli) ou à l'ouest (Ira) du « V » baoulé), ou bien elles présentent une richesse de formes intermédiaires telle que leur analyse n'a pu être conduite dans le détail (*C. humilis*), ou bien elles ne figurent pas en collection sous forme de populations locales (*C. canephora*).

Les méthodes biochimiques

Nous résumons brièvement la présentation des techniques, renvoyant à la partie « Bibliographie » pour une plus ample information.

Une série d'analyses se propose pour but l'observation de huit électrophorogrammes d'enzymes différents sur vingt à quarante individus d'une même population (fig. 1).

Elle met en jeu un procédé d'extraction rapide (Berthou et Trouslot, 1977) et quatre électrophorèses simultanées, utilisant deux variantes de la technique d'électrophorèse en gel d'amidon de Smithies, 1955 : pour chaque individu, en effet, l'extrait brut utilisé est fractionné en quatre parties aliquotes qui migrent simultanément dans quatre gels différents, durant 20 h, sous une tension de 6 V/cm, à 10 °C.

Les deux variantes de la technique d'électrophorèse adoptée sont, d'une part, celle de Spencer, Harris et Hopkinson (1964) in I. Smith (1968) pour l'analyse des quatre enzymes : **phosphoglucomutase** Brewer (1970), **estérase α et β** Scandalios (1969), **leucine aminopeptidase** et **phosphatase acide** selon Shaw et Prasad (1970) ; d'autre part, celle de Brewer (1970) pour les enzymes : **malate déshydrogénase** Shaw et Prasad (1970), **isocitrate déshydrogénase**, **6-phosphogluconate déshydrogénase** et **phosphoglucose isomérase** Brewer (1970).

mdh

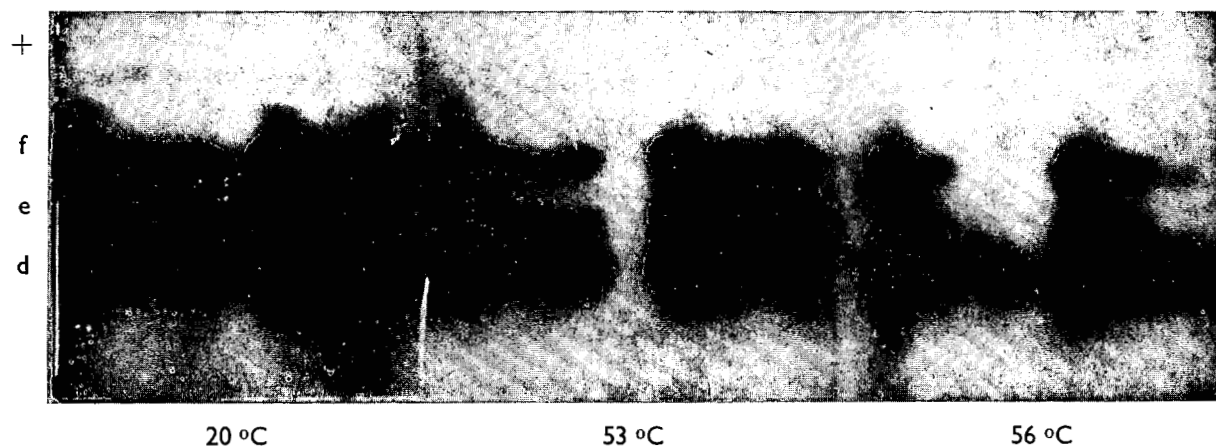


Fig. 2. — Les six zymogrammes **malate déshydrogénase** correspondent à six individus appartenant, dans l'ordre, aux espèces *C. canephora*, *C. eugenioides* et *C. arabica* (deux fois). Les types observés, identiques à 20 °C (types f), se subdivisent en deux sous-types à 56 °C : f bande frontale thermorésistante (*C. canephora*) et f' bande frontale thermosensible (*C. eugenioides* et *C. arabica*)

Utilisé pour contrôler la validité des similarités de structure enzymatique notées en électrophorèse, le test de thermosensibilité est une technique complémentaire qui consiste à vérifier la stabilité des zymogrammes à différentes températures (Trouslot et Second, 1980). A l'intérieur d'une même espèce, la thermosensibilité des enzymes est la même. Mais pour des espèces éloignées, ce test met en évidence des différences (cf. l'enzyme : **malate déshydrogénase** (fig. 2).

Les bases génétiques de la variation enzymatique

Sur les caractères lus en électrophorèse, les analyses mendéliennes dans les descendance n'ont pas été faites dans la plupart des cas. Mais d'une part, il s'agit de caractères simples : nous allons le montrer à l'aide de trois cas de variations observés dans la même population, pour trois enzymes différents ; d'autre part, les proportions de génotypes possédant ces caractères, à l'état homozygote et à l'état hétérozygote, s'accordent bien avec l'hypothèse d'une répartition allélique dans des populations en équilibre panmictique.

En l'absence de démonstration formelle du déterminisme génétique des caractères lus en électrophorèse, nous donnons l'analyse, à titre d'exemple, de trois cas de variation rencontrés dans une même population et illustrés par les zymogrammes des figures 3, 4 et 5.

La variation pour l'enzyme **6-phosphogluconate déshydrogénase** (fig. 3) représente la situation la plus simple : sur le schéma des électrophorogrammes porté en bas de cette figure, nous observons des numéros (02, 04, etc...), qui désignent vingt et un génotypes au total de la population *C. canephora* Ira, et des lettres (Tcg et TAr), qui désignent les génotypes témoins appartenant à d'autres espèces. Abstraction faite des témoins, les zymogrammes présentent deux cas de figure : soit une seule bande qui est basse et notée b (voir les clones 18 et 124), médiane et notée e (voir les clones 166 et autres), ou haute et notée j ; soit trois bandes qui ont les caractéristiques suivantes : associations des bandes : b-j (voir les clones 02 et 04), b-e (voir le clone 166 et autres), e-j (voir les clones 05 et 07) avec bande intermédiaire, généralement deux fois plus intense, et située en position médiane vis-à-vis des précédentes. Ce cas de figure manifeste une structure de l'enzyme de type dimère : les bandes extrêmes sont les homodimères et la bande médiane, l'hétérodimère formé par l'association des deux allo-

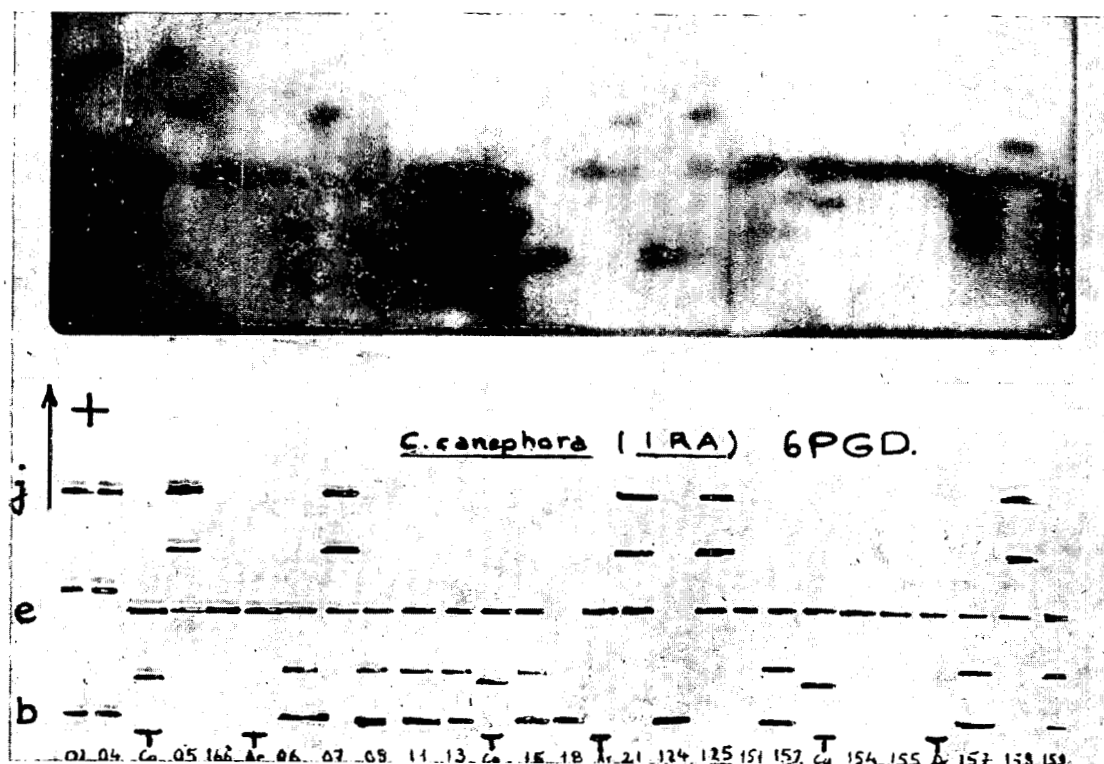


Fig. 3. — Série de zymogrammes 6-phosphogluconate déshydrogénase, observés dans la population *C. canephora* Ira : deux types correspondant à des génotypes homozygotes, e et b, et trois types correspondant à des génotypes hétérozygotes be, bj et ej ; l'homozygote de type j à été également observé dans les mêmes conditions

zymes présents chez l'hétérozygote, dont la constitution est notée (b, j), (b, e) ou (e, j). Dans cette population, les quarante et un individus analysés se répartissent comme suit : dix (e, e), quinze (b, e), cinq (b, b), quatre (b, j) et sept (e, j), ce qui permet de calculer les fréquences alléliques au locus « 3 » (colonne « F » du tableau B de l'annexe).

La variation pour l'enzyme **phosphoglucose isomérase** dénote une situation presque identique : présence de trois allèles à un même locus. Dans ce cas, les allozymes sont aussi désignés par les lettres d, f et h en fonction de leur position, mais cette fois, chaque allozyme se présente sous la forme de trois bandes inséparables et d'intensité

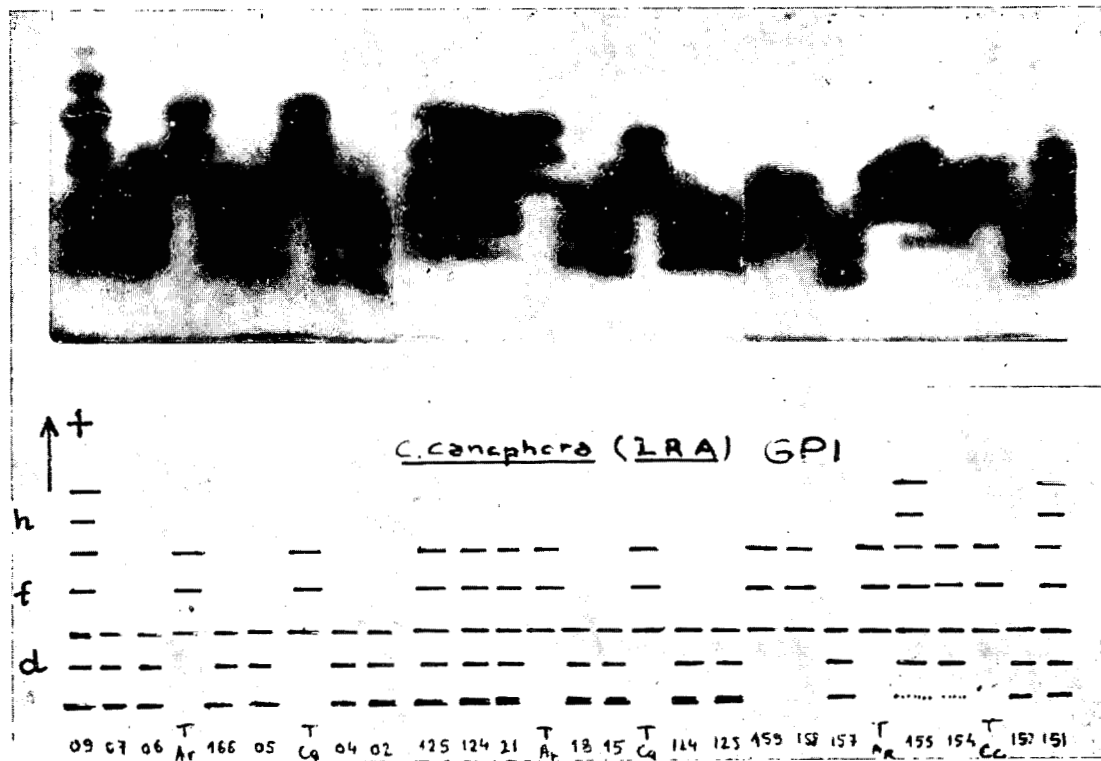


Fig. 4. — Série de zymogrammes : phosphoglucose isomérase observés dans la population *C. canephora* Ira : les types à trois bandes : d (clones 07 et autres) ou f (clone 158 et 159) manifestent deux des trois génotypes homozygotes présents ; les types à cinq et sept bandes dh (09 et autres) manifestent deux des trois génotypes hétérozygotes

TABLEAU II

Caractères analysés des huit zymogrammes

	Déterminisme			Nombre de bandes	
	non génétique	à plusieurs loci	pluri-allélique	à l'état homozygote	à l'état hétérozygote
1 Malate-déshydrogénase	0	0	1	3	5-7
2 Isocitrate déshydrogénase	1	0	1	3	4-7
3 6-Phosphogluconate déshydrogénase	0	0	1	1	3
4 Phosphoglucomutases	0	1	1	2	3-4
5 Estérase α	0	1	1	2	3-4
5 Estérase β	0	0	1	1	2
6 Phosphatases acides	0	1	1	2	3-4
7 Leucines aminopeptidase	0	0	1	1	2
8 Phosphoglucose isomérase	1	0	1	3	5-8

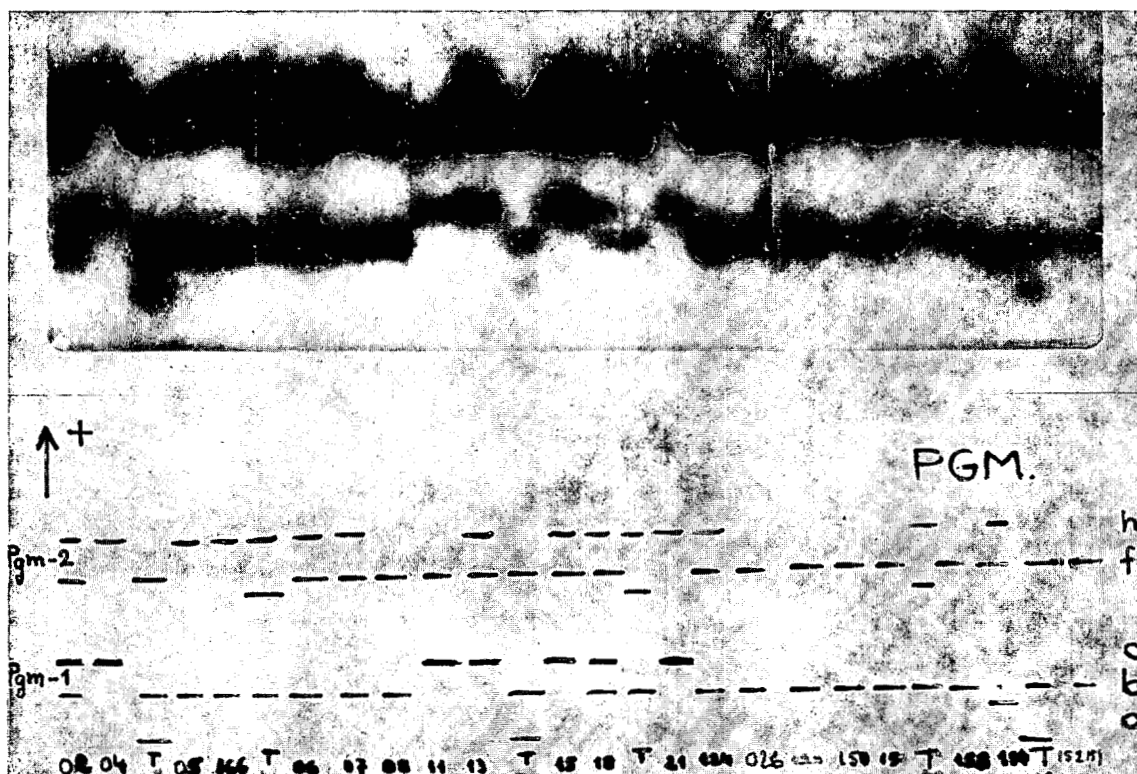


Fig. 5. — Série de zymogrammes : phosphoglucosaminase observés dans la population *C. canephora* Ira : les types à deux bandes bf, bh ou cf, ch correspondent à des génotypes homozygotes aux loci *pgm-1* et *pgm-2* ; les types à trois bandes sont hétérozygotes à l'un ou l'autre de ces loci ; les types à quatre bandes sont hétérozygotes à ces deux loci

TABLEAU III
Disposition des résultats analytiques

Taxons	Nombre de populations	Matières	Disposition
<i>C. congensis</i> - <i>C. canephora</i> - Caféier de la Nana	7	8 enzymes 12 locus 36 allèles	(voir annexe)
<i>C. humilis</i> - <i>C. liberica</i> - <i>C. stenophylla</i>	8	7 enzymes 7 locus 35 allèles	(voir annexe)
<i>C. eugenioides</i>	3	6 enzymes 6 locus 13 allèles	(voir annexe)

(Annexes : tableau B, p. 324 ; tableau C, p. 325 ; tableau A, p. 323)

TABLEAU IV
Caractéristiques de la variation allozymique

Espèce Population	Hétérozygoties moyennes par population			Distances génétiques par couple de population		
	+	++	+++	+	++	+++
<i>C. congensis</i>		0,184 ± 0,044		0,06(A-D)		
<i>C. canephora</i>		0,204 ± 0,084			0,44(E-G)	
<i>C. humilis</i>			0,381 ± 0,001	0,16(L-M)		
<i>C. liberica</i>		0,210 ± 0,064		0,08(N-P) 0,09(Q-R)	0,36(P-Q) 0,54(N-R)	
<i>C. stenophylla</i>	0,062 ± 0,006					1,5(S-T)
<i>C. eugenioides</i>		0,273 ± 0,101		0,06(H-J) 0,15(I-J)		

égale. Cette figure a déjà été analysée chez d'autres organismes : Noltmann (1975) : elle correspond dans certains organismes à une modification post-transcriptionnelle du produit du gène codant la **phosphoglucose isomérase**. Il s'agirait d'« isozymes secondaires » suivant la classification de Harris et Hopkinson (1976). Les génotypes homozygotes manifestent donc trois bandes, et les hétérozygotes cinq ou sept bandes (fig. 4). Sur quarante et un individus analysés, nous avons observé : vingt-six types (d, d), huit types (d, f), trois types (f, f), trois types (d, h) et un type (h, h).

Enfin, la variation pour l'enzyme **phosphoglucose mutase** manifeste deux types de protéines qui migrent en électrophorèse en deux zones différentes du gel. Cette situation indique probablement un déterminisme génétique qui fait intervenir deux loci : *pgm-1* et *pgm-2*, avec, pour chacun d'eux, une série allélique comportant deux allèles désignés par les lettres : (*pgm-1*) b et c, (*pgm-2*) e et f. Les génotypes homozygotes présentent deux bandes, les hétérozygotes partiels, trois bandes, et les hétérozygotes aux deux loci, quatre bandes (fig. 5).

Le tableau II résume l'allure générale et le déterminisme supposé de tous les caractères enzymatiques observés.

Les fréquences allozymiques par population

Au niveau de l'étude de polymorphisme, la présentation des résultats occupe deux parties : la présentation analytique des fréquences allozymiques par population, suivie d'une présentation synthétique d'indices calculés à partir des fréquences alléliques (l'hétérozygotie moyenne par population ; la distance génétique par couple de population). (Tableau III).

Distribution de la variabilité enzymatique

A la suite des prospections de caféiers en Centrafrique (J. Berthaud et J.-L. Guillaumet, 1978), au Kenya (J. Berthaud *et al.*, 1980) et en Côte d'Ivoire (J. Berthaud c. v.), l'analyse de la variation enzymatique porte sur dix-huit populations sauvages. Les situations rencontrées sont diverses et fort instructives.

Les caractéristiques du tableau IV, c'est-à-dire l'hétérozygotie moyenne (H) par population et la distance génétique (D) par couple de population, intraspécifique, selon Nei (1972, 1974) contribuent à établir pour chacune des espèces les différents modèles de distribution de la variation qui lui sont propres.

a) Le modèle le plus rapidement analysable est rencontré dans l'espèce *C. stenophylla* en Côte d'Ivoire :

$$H = 0,062 \pm 0,006 \quad D = 1,50$$

Une hétérozygotie moyenne aussi faible correspond à l'observation d'un seul locus polymorphe (**isocitrate déshydrogénase**) sur les sept loci analysés chez cette espèce ; une distance génétique intraspécifique aussi forte entre deux populations correspond à un couple de populations ayant fixé des allèles différents aux sept loci. Dans ce cas, nous avons affaire à une espèce qui subsiste sous forme d'isolats, c'est-à-dire de populations dispersées et appauvries, séparées depuis fort longtemps.

b) Le modèle le plus difficile à analyser en détail est présenté par l'espèce *C. humilis* en Côte d'Ivoire :

$$H = 0,381 \pm 0,01 \quad D = 0,16$$

Une hétérozygotie moyenne aussi forte correspond à l'observation de l'état polymorphe dans la totalité des sept loci étudiés ; une distance génétique intraspécifique moyenne traduit le fait que les deux populations les plus éloignées possèdent en commun encore treize des vingt-deux allèles observés.

Dans ce cas, il s'agit d'une espèce présentant au contraire une grande richesse allélique. Nous savons qu'il existe à l'état naturel un grand nombre de populations sauvages, qui servent de relais pour des échanges génétiques encore actuels entre ces populations.

c) L'espèce *C. liberica* est caractérisée par une distance génétique intra-pays faible :

$$D = 0,08 \text{ et } 0,09$$

et une distance génétique inter-pays forte :

$$D = 0,36 \text{ et } 0,54.$$

Cette situation est en rapport avec l'étendue de son aire de répartition et se traduit du point de vue botanique par la distinction d'espèces au sein des Libério-excelsoïdes entre les formes *C. abeocutae* de Côte d'Ivoire et les formes *C. dewevrei* var. *excelsa* de Centrafrique.

Dans l'espèce *C. canephora*, la distance génétique inter-pays est du même ordre que la distance génétique inter-pays déterminée pour l'espèce *C. liberica* :

$$D = 0,44$$

et les hétérozygoties moyennes sont comparables :

H = 0,210 ± 0,064 (*C. liberica*)
 H = 0,204 ± 0,084 (*C. canephora*)

La distance génétique intra-pays n'a pas été déterminée, car nous ne disposons pas en Côte d'Ivoire ou en Afrique Centrale de plusieurs populations sauvages isolées. Dans cette espèce, comme dans l'espèce *C. liberica*, les distances génétiques intra-pays sont probablement très variables : une telle observation manque à nos résultats.

d) Le modèle de variation dans l'espèce *C. congensis* a pu être analysé avec précision sur une échelle géographique réduite : d'amont en aval, l'hétérozygotie moyenne de chaque population décroît régulièrement :

H = 0,228 (*C. congensis* : Anginga)
 H = 0,181 à 0,202 (*C. congensis* : Louma et M'Boulou)
 H = 0,140 (*C. congensis* : Aval Bogassa).

Pour les caractères : **malate déshydrogénase** (e et f), **phosphoglucomutase-1** (a et b) ; **estérase α-1** (b et c) ; **leucine aminopeptidase** (e et f), le cline de variation est orienté de la même manière (pour tous les gènes) : l'hétérozygotie moyenne la plus forte est située en amont (Anginga).

e) La variation dans l'espèce *C. eugenioides* est caractérisée par une hétérozygotie moyenne forte et une distance génétique intraspécifique forte.

H = 0,273 ± 0,101 D = 0,06 à 0,15.

Il y a donc intérêt à prospecter en détail l'aire de répartition de cette espèce.

Les différentes valeurs des caractéristiques de la variation allozymique

hétérozygotie moyenne $\left(H = 1 - \frac{\sum x^2}{n} \right)$ et distance génétique $\left(D = -\log_e \frac{\sum xy}{\sqrt{\sum x^2 \sum y^2}} \right)$

en fonction de l'espèce considérée et de sa provenance (Nei, 1974) sont rassemblées dans le tableau IV.

L'intérêt et les limites de l'analyse enzymatique

Pour l'analyse des relations phyllétiques, la comparaison des distances génétiques interspécifiques (tableau V) est rarement opérante en raison de la valeur toujours élevée des distances génétiques intraspécifiques (tableau IV).

a) Dans le couple d'espèces *C. humilis-C. liberica*, il faut tenir compte de la distance interprovenances : *C. liberica* Côte d'Ivoire et *C. liberica* Centrafrique D = 0,45 ± 0,09,

C. humilis-C. liberica (Côte d'Ivoire) D = 0,38 ± 0,08,

C. humilis-C. liberica (Centrafrique) D = 0,74 ± 0,10.

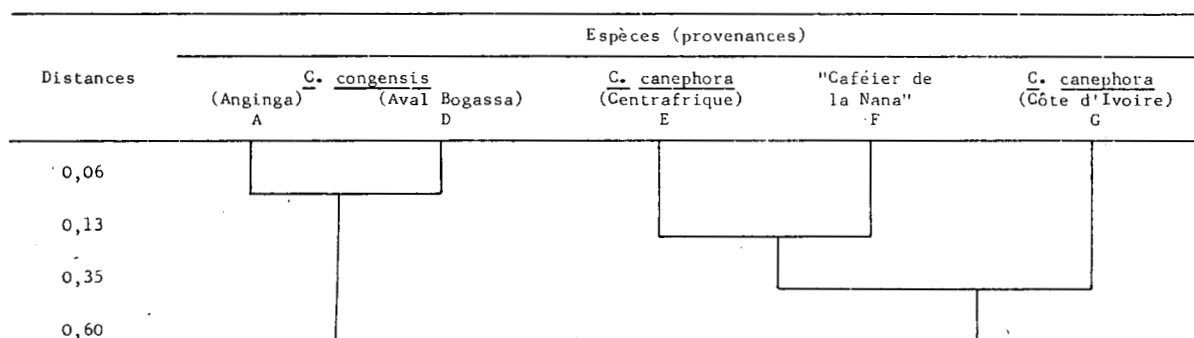
Les distances génétiques sont du même ordre de grandeur entre deux populations de *C. liberica* de deux pays éloignés (RCI, RCA) qu'entre une population *C. liberica* et une population *C. humilis* du même pays (RCI).

b) Le couple *C. canephora-C. congensis* fait exception : la distance génétique interspécifique est très supérieure à la distance génétique interprovenances intraspécifique *C. canephora-C. congensis* D = 0,61 ± 0,09, (*C. canephora*-Côte d'Ivoire et *C. canephora*-Centrafrique D = 0,44). Les deux espèces se distinguent bien en électrophorèse.

c) De même, le couple *C. congensis*-« Caféier de la Nana » D = 0,50 ± 0,05. Par contre, le couple *C. canephora*-« Caféier de la Nana » est inséparable par ces méthodes, D = 0,20. Seuls quelques génotypes qui portent le marqueur **phosphatase acide-1** (b) de l'espèce *C. congensis* se singularisent de cet ensemble *C. canephora*-« Caféier de la Nana ».

La figure 6 rassemble nos conclusions sur la situation des diverses populations.

TABLEAU V
Distances génétiques interspécifiques



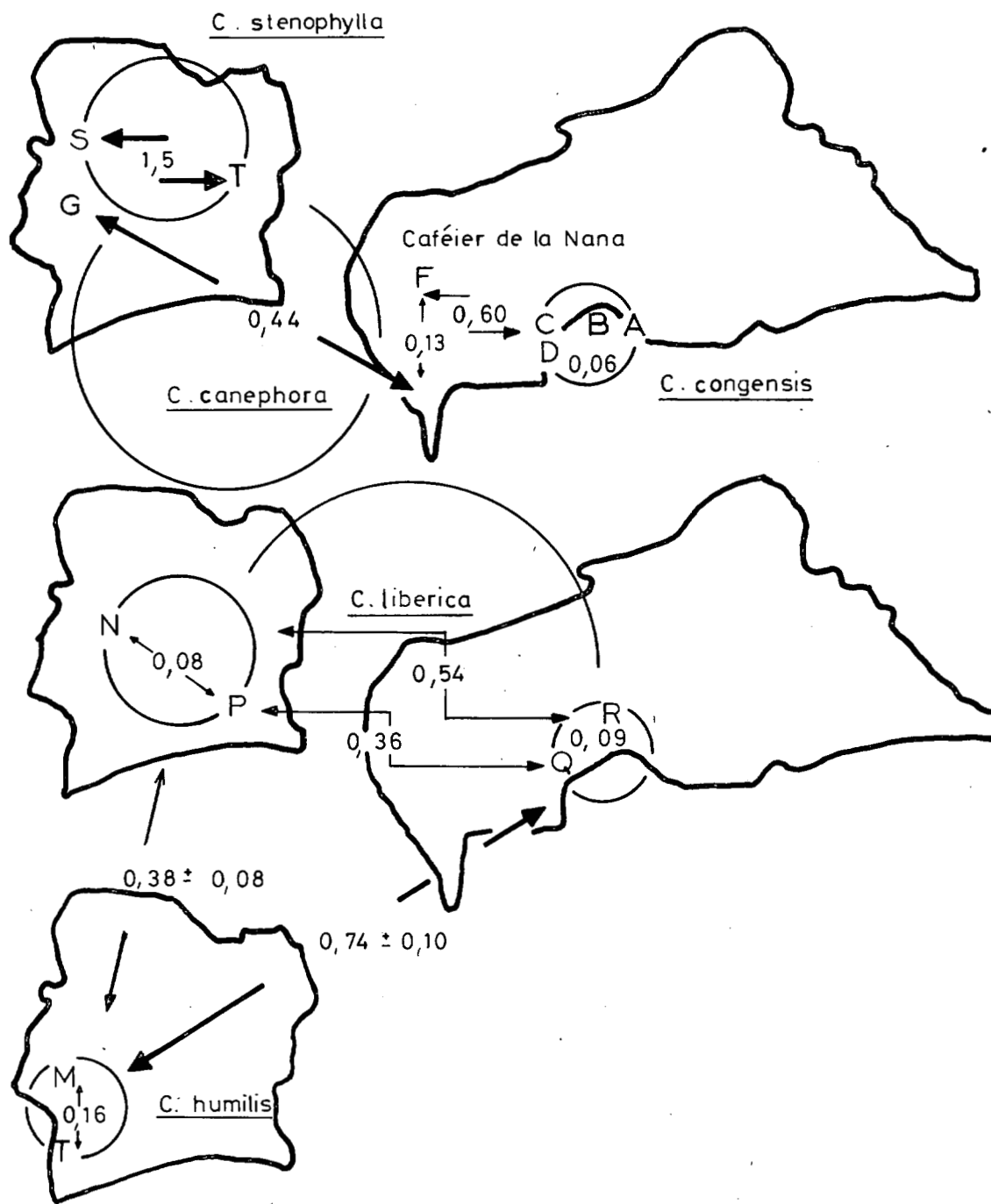


Fig. 6. — Localisation des populations et distances génétiques inter et intra-pays. Code des populations : A, B, C, D (*C. congensis*), E, G (*C. canephora*), F (Caféier de la Nana), S, T (*C. stenophylla*), N, P, Q, R (*C. liberica*), M, T (*C. humilis*) (La Côte d'Ivoire est représentée à gauche, la Centrafrique à droite)

En conclusion, l'intérêt de l'analyse de la variation allozymique dans les populations sauvages de caféiers réside dans cette détermination de la distribution géographique et phyllétique de la variation génétique, dans la reconnaissance des affinités entre espèces (voir aussi Berthou et Trouslot, 1977), et de la répartition des marqueurs dans

les zones prospectées. Par exemple, les marqueurs **6-phosphogluconate déshydrogénase** (l) et **phosphatase acide** (k) caractéristiques de *C. arabica* et peu représentés chez *C. eugenioides* se retrouvent essentiellement dans la zone de Taressia ; les limites de cette méthode se manifestent sur le plan génétique et sur le plan biochimique : (a) génétique :

les marqueurs sont d'importance réduite, en nombre et en signification évolutive ; (b) biochimique : le test de similarité électrophorétique peut être invalidé par un test de thermosensibilité. Par exemple, la figure 2 montre que des zymogrammes *C. canephora*, *C. eugenioides*, *C. arabica* identiques à

20 °C se révèlent différents à 56 °C, l'isozyme situé en position distale étant thermorésistant chez *C. canephora* et thermosensible chez *C. eugenioides* et *C. arabica*. Pour l'analyse des relations phyllétiques entre espèces, il est donc nécessaire d'envisager d'autres méthodes biochimiques.

ANALYSE DE L'ADN MITOCHONDRIAL PREMIERS RÉSULTATS

Pour la première fois, des profils de distribution des fragments de restriction de l'ADN mitochondrial dans le genre *Coffea* ont été obtenus dans les espèces *C. canephora*, *C. eugenioides* et *C. arabica*, après hydrolyse par l'enzyme de restriction Sal I (profils (a), (b) et (c) de la figure 7).

Les profils (b) et (c) ont été reproduits à deux reprises, pour un résultat strictement identique : (c) *C. arabica* provenant soit d'un mélange de deux clones (Ethiopie 8 et 362) prélevé en collection à Man (Côte d'Ivoire), soit d'un mélange d'un plus grand nombre de clones d'Ethiopie cultivés en serres à Bondy (France) ; (b) *C. eugenioides* provenant d'un mélange de clones de l'Est kenyan, prélevé soit en collection à Divo (Côte d'Ivoire), soit en serres à Montpellier (France). Le profil (a) correspond à un seul clone *C. canephora* 315 cultivé en serres à Bondy. L'isolement des mitochon-

dries, l'extraction et l'hydrolyse de l'ADN mitochondrial sont réalisés suivant les procédés développés par Vedel et Quetier (1978).

Les profils manifestent des homologies :

- très faibles entre *C. canephora* (a) et les deux autres : *C. eugenioides* (b) et *C. arabica* (c),
- très fortes entre *C. arabica* (c) et *C. eugenioides* (b).

Le tableau VI donne le taux d'homologie des deux espèces diploïdes par rapport à *C. arabica*, calculé à partir du nombre de bandes communes dans les dix premiers centimètres du gel (fig. 7).

En première approximation, nous en concluons que les espèces *C. eugenioides* et *C. arabica* présentent le même génome mitochondrial, très différent de celui de *C. canephora*.

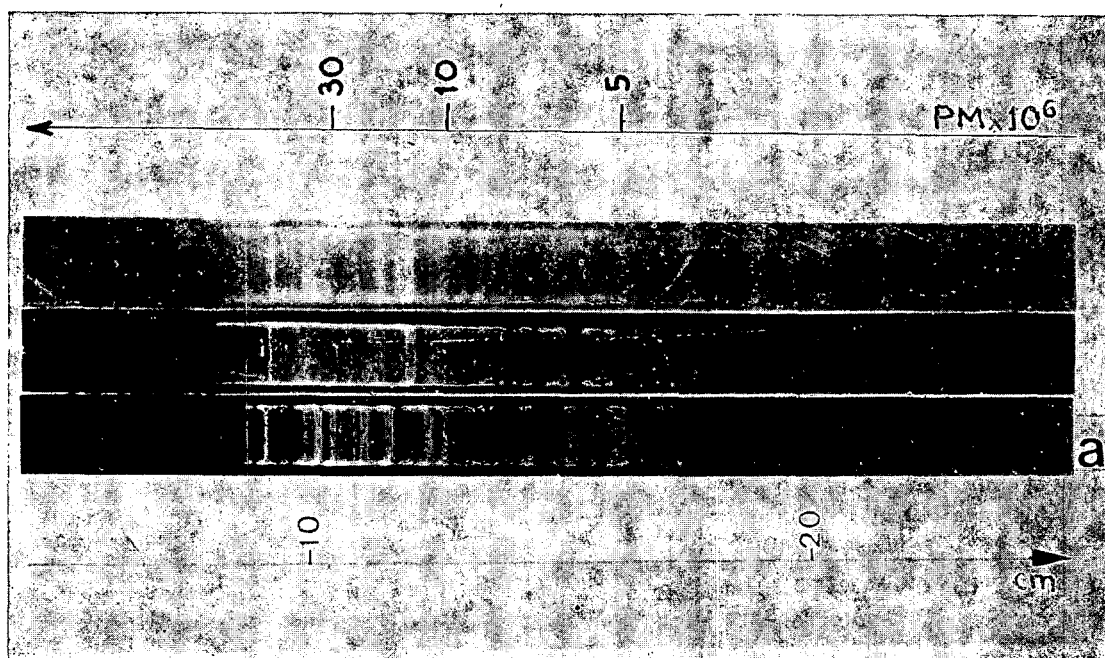


Fig. 7. — Électrophorèse en gel d'agarose des fragments d'ADN mitochondriaux obtenus à partir de feuilles : (a) *C. canephora*, (b) *C. eugenioides*, (c) *C. arabica* par l'enzyme de restriction Sal I

TABLEAU VI

Nombre de fragments d'ADN mitochondrial et taux d'homologie avec *C. arabica*

Espèces	Nombre total de fragments	Nombre de fragments communs	Taux d'homologie
<i>C. arabica</i> (c)	39	39	100
<i>C. eugenioides</i> (b)	40	36	90
<i>C. canephora</i> (a)	36	7	18

Ce résultat étaye une hypothèse déjà ancienne qui fait intervenir une espèce diploïde proche de *C. eugenioides* à l'origine de la formation de l'espèce tétraploïde *C. arabica*, hypothèse récemment corroborée par l'étude du polymorphisme enzy-

matique (Berthou et Trouslot, 1979). Comme l'ADN mitochondrial est un marqueur génétique non nucléaire, ce résultat permet de supposer en outre que *C. arabica* et *C. eugenioides* descendent d'un même ancêtre proche de *C. eugenioides*.

BIBLIOGRAPHIE

- BERTHAUD (J.), GUILLAUMET (J.-L.), 1978. — Les caféiers sauvages en Centrafrique. Résultats d'une mission de prospection (janv.-févr. 1975). *Café Cacao Thé* (Paris), vol. 22, n° 3, p. 171-186.
- BERTHOU (F.), TROUSLOT (P.), 1977. — L'analyse du polymorphisme enzymatique dans le genre *Coffea*: adaptation d'une méthode d'électrophorèse en série; premiers résultats. 8^e Colloque scientifique international sur le café, Abidjan, ASIC (Paris), 1979, p. 373-384.
- BREWER (C. J.), 1971. — An introduction to isozymes techniques. Acad. Press (New York), 185 p.
- HARRIS (H.), HOPKINSON (D. A.), 1976. — Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North Holland Publishing Company, Amsterdam.
- NEI (M.), 1972. — Genetic distance between populations. *Amer. Nat.* (Lancasters), vol. 106, p. 283.
- NEI (M.), 1974. — *Genetics* (Austin), vol. 76, p. 379.
- NOLTMANN (E. A.), 1975. — The different origin of multiple molecular forms of phosphoglucose isomerase. Isozymes I. molecular structure. Markert CL.
- SCANDALIOS (J. G.), 1969. — Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. *Biochemical Genetics* (New York), 3, p. 37-79.
- SHAW (C. R.), PRASAD (R.), 1970. — Starch gel electrophoresis of enzymes, à compilation of recipes. *Biochemical Genetics* (New York), 4, p. 297-320.
- SMITH (I.), 1968. — Electrophoretic techniques.
- SMITHIES (O.), 1955. — Zone electrophoresis in starch gels. Group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochemical Journal* (Londres), 61, p. 629-641.
- TROUSLOT (P.), SECOND (G.), 1980. — Technique d'électrophorèse en gel d'amidon appliquée au riz. *Travaux et Documents ORSTOM*, n° 120.
- VEDEL (F.), QUETIER (F.), 1978. — Hydrolyse spécifique de l'ADN chloroplastique et de l'ADN mitochondrial des végétaux supérieurs par les enzymes de restriction. *Physiol. vég.* (Paris), (3), p. 441-425.
- VEDEL (F.), QUETIER (F.), 1978. — Study of wheat phylogeny by EcoRI analysis of chloroplastic and mitochondrial DNAs. *Plant Sci. Letters* (Amsterdam), 13, p. 97-102.

ANNEXES

TABLEAU A

Fréquences alléliques dans le groupe d'espèces *C. eugenioides*

Locus et allèle	<i>C. eugenioides</i>		
	Taresia (H)	Nandi (I)	Cheptuyet (J)
1. <u>Malate déshydrogénase</u>			
Mdh ^e	-	-	-
Mdh ^{f*}	1,00	1,00	1,00
2. <u>Isocitrate déshydrogénase</u>			
Icd ^f	0,90	0,62	0,90
Icd ^g	0,10	0,37	0,10
3. <u>6 Phosphogluconate déshydrogénase</u>			
Pgd ^e	0,05	0,33	-
Pgd ^g	0,95	0,67	1,00
4. <u>Phosphoglucomutase-2</u>			
Pgm-2 ^d	0,22	0,29	0,95
Pgm-2 ^e	-	0,13	-
Pgm-2 ^g	0,78	0,58	0,05
Pgm-2 ^h	-	-	-
5. <u>Phosphatase acide-2</u>			
P. ac.-2 ^d	-	-	0,07
P. ac.-2 ^f	0,72	0,43	0,85
P. ac.-2 ^h	0,12	0,57	0,05
P. ac.-2 ^k	0,15	-	0,02
6. <u>Phosphoglucose isomérase</u>			
Pgi ^f	1,00	1,00	1,00

* Mdh^{f1} ≠ Mdh^f par la réaction de thermostabilité à 56°C.

TABLEAU B

Fréquences alléliques dans le groupe d'espèces : *C. congensis*, *C. canephora* et le taxon : caféier de la Nana

Locus et allèle	<i>C. congensis</i>				<i>C. canephora</i>		Caféier de la Nana
	Anginga (A)	Louma (B)	M'Boulou (C)	Aval Bogassa (D)	Libengé (E)	Ira (G)	N'dongué (F)
1. Malate déshydrogénase							
Mdh ^e	0,49	0,29	0,12	0,10	1,00	1,00	1,00
Mdh ^f	0,51	0,51	0,86	0,37	-	-	-
Mdh ^g	-	0,09	-	0,17	-	-	-
Mdh ^h	-	0,04	0,03	0,37	-	-	-
2. Isocitrate déshydrogénase							
Icd ^d	-	-	-	-	-	1,00	-
Icd ^f	0,20	0,04	0,32	0,12	1,00	-	1,00
Icd ^h	0,80	0,96	0,68	0,88	-	-	-
3.6 Phosphogluconate déshydrogénase							
6 Pgd ^b	-	-	-	-	-	0,35	0,11
6 Pgd ^e	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,51	0,89
6 Pgd ^j	-	-	-	-	-	0,13	-
4. Phosphoglucomutase-1							
Pgm-1 ^a	0,38	0,05	0,12	0,10	-	-	-
Pgm-1 ^b	0,62	0,95	0,88	0,90	0,84	0,67	0,72
Pgm-1 ^c	-	-	-	-	0,16	0,33	0,28
5. Phosphoglucomutase-2							
Pgm-2 ^f	1,00	1,00	1,00	1,00	-	0,76	0,57
Pgm-2 ^h	-	-	-	-	1,00	0,24	0,43
6. Estérase β							
Es. β ^b	0,82	0,91	0,46	0,97	0,02	-	0,01
Es. β ^c	0,12	0,09	0,02	0,03	0,14	0,56	0,33
Es. β ^g	0,06	-	0,51	-	0,84	0,44	0,66
7. Estérase α-1							
Es. α-1 ^b	0,58	0,70	0,64	0,12	0,09	0,12	-
Es. α-1 ^c	0,42	0,30	0,36	0,88	0,91	0,88	1,00
8. Estérase α-2							
Es. α-2 ^e	-	-	-	-	-	0,01	0,08
Es. α-2 ^f	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,99	0,92
9. Phosphatase-1 et-2 acide-1							
P. ac.-1 ^b	1,00	1,00	1,00	1,00	-	-	0,09
P. ac.-1 ^c	-	-	-	-	1,00	1,00	0,91
10. P. ac.-2^e							
P. ac.-2 ^j	0,02	0,02	-	-	-	-	-
P. ac.-2 ^k	0,06	0,13	0,03	0,02	-	0,62	-
P. ac.-2 ^k	0,92	0,84	0,97	0,98	1,00	0,38	0,78
P. ac.-2 ^l	-	-	-	-	-	-	0,22
11. Leucine aminopeptidase							
L. ap. ^c	-	-	-	-	-	0,57	0,99
L. ap. ^d	-	-	-	-	0,34	-	0,01
L. ap. ^e	0,50	0,54	0,59	0,82	0,66	0,43	-
L. ap. ^f	0,50	0,46	0,41	0,18	-	-	-
12. Phosphoglucose isomérase							
P. gi. ^b	-	-	-	-	0,16	-	-
P. gi. ^d	-	-	-	-	0,01	0,77	0,04
P. gi. ^f	1,00	1,00	1,00	1,00	0,83	0,17	0,96
P. gi. ^h	-	-	-	-	-	0,06	-

TABLEAU C

Fréquences alléliques dans le groupe d'espèces *C. humilis*, *C. liberica*
et *C. stenophylla*

Locus et allèle	<i>C. humilis</i>		<i>C. liberica</i>				<i>C. stenophylla</i>	
	Tai (L)	Momy (M)	Ira (N)	Aboisso (P)	Bimbo (Q)	Pama (R)	Ira (S)	Assabli (T)
1. Malate déshydrogéné-								
nase								
Mdh ^b	0,09	0,03	-	-	-	0,12	-	-
Mdh ^f	0,82	0,97	1,00	1,00	0,97	0,66	1,00	1,00
Mdh ^g	-	-	-	-	0,03	0,22	-	-
Mdh ^h	0,09	-	-	-	-	-	-	-
2. Isocitrate déshydro-								
génase								
Icd ^f	-	0,37	0,55	1,00	1,00	1,00	0,27	-
Icd ^h	0,85	0,63	0,45	-	-	-	0,73	0,60
Icd ⁱ	0,15	-	-	-	-	-	-	-
Icd ^j	-	-	-	-	-	-	-	0,40
3. 6 phosphogluconate								
déshydrogénase								
6 Pgd ^b	-	-	0,02	0,07	-	0,10	-	-
6 Pgd ^e	0,79	0,58	0,98	0,93	1,00	0,90	1,00	-
6 Pgd ^g	0,21	-	-	-	-	-	-	1,00
6 Pgd ⁱ	-	0,42	-	-	-	-	-	-
4. Phosphoglucomutase-								
2								
Pgm.-2 ^d	0,46	0,26	1,00	0,80	0,95	1,00	-	-
Pgm.-2 ^e	0,42	0,58	-	0,20	-	-	-	1,00
Pgm.-2 ^f	0,12	0,16	-	-	0,05	-	-	-
Pgm.-2 ^g	-	-	-	-	-	-	1,00	-
5. Estérase β								
Es. β ^d	0,42	0,47	-	-	0,69	0,70	-	-
Es. β ^e	-	-	-	0,39	-	-	-	-
Es. β ^f	-	-	0,41	-	0,31	0,30	-	-
Es. β ^g	-	-	-	-	-	-	-	1,00
Es. β ^h	0,50	0,38	0,59	0,61	-	-	-	-
Es. β ⁱ	-	-	-	-	-	-	1,00	-
Es. β ^j	0,08	0,15	-	-	-	-	-	-
6. Phosphatase acide-								
2								
P. ac.-2 ^c	-	-	-	-	-	-	-	1,00
P. ac.-2 ^e	0,05	-	-	-	-	-	-	-
P. ac.-2 ^f	-	-	-	0,21	0,11	0,07	-	-
P. ac.-2 ^g	0,92	1,00	1,00	0,79	-	-	1,00	-
P. ac.-2 ^h	-	-	-	-	0,36	0,30	-	-
P. ac.-2 ⁱ	0,03	-	-	-	-	-	-	-
P. ac.-2 ^j	-	-	-	-	0,53	0,63	-	-
7. Phosphoglucose								
isomérase								
Pgi ^f	0,05	0,39	1,00	0,91	0,16	-	-	1,00
Pgi ^h	0,27	0,61	-	0,09	-	-	-	-
Pgi ⁱ	-	-	-	-	0,68	0,19	-	-
Pgi ^j	0,68	-	-	-	-	-	1,00	-
Pgi ^l	-	-	-	-	0,16	0,81	-	-

BERTHOU (F.), TROUSLOT (P.), HAMON (S.), VEDEL (F.), QUETIER (F.). — Analyse en électrophorèse du polymorphisme biochimique des caféiers : Variation enzymatique dans dix-huit populations sauvages. Variation de l'ADN mitochondrial dans les espèces *C. canephora*, *C. eugenioides* et *C. arabica*. *Café Cacao thé* (Paris), vol. XXIV, n° 4, oct.-déc. 1980, p. 313-326, fig., tabl., réf.

L'analyse en électrophorèse du polymorphisme des caféiers regroupe deux études, l'une sur la variation enzymatique dans les populations sauvages de caféiers, l'autre sur la variation de l'ADN mitochondrial dans les espèces *C. canephora*, *C. eugenioides* et *C. arabica*.

Le premier type d'analyse contribue essentiellement à déterminer pour chaque espèce les modèles de variation qui lui sont propres, en fonction des hétérozygoties moyennes et des distances génétiques entre populations. Après avoir présenté le matériel végétal, les méthodes biochimiques, les bases génétiques du polymorphisme, les fréquences allozymiques par population, les modèles de variation pour chaque espèce, les auteurs concluent que l'intérêt de l'analyse de la variation allozymique dans les populations sauvages de caféiers réside dans la détermination de la distribution géographique et phylétique de la variation génétique, dans la reconnaissance des affinités entre espèces et dans la connaissance des marqueurs dans les zones prospectées.

Le second type d'analyse concerne l'ADN mitochondrial dans les espèces *C. canephora*, *C. eugenioides* et *C. arabica* caractérisé en électrophorèse après son hydrolyse par l'enzyme de restriction Sal I. Les espèces *C. eugenioides* et *C. arabica* présentent le même génome mitochondrial, très différent de celui de *C. canephora*. Les résultats obtenus permettent de supposer que *C. arabica* et *C. eugenioides* descendent d'un même ancêtre proche de *C. eugenioides*.

BERTHOU (F.), TROUSLOT (P.), HAMON (S.), VEDEL (F.), QUETIER (F.). — Analyse durch Elektrophorese des biochemischen Polymorphismus der Kaffeebäume : Enzymatische Variationen bei achtzehn wilden Populationen. Variation von mitochondrialem DNS bei den Arten *C. canephora*, *C. eugenioides* und *C. arabica*. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XXIV, n° 4, oct.-déc. 1980, p. 313-326, fig., tabl., réf.

Die Analyse durch Elektrophorese des Polymorphismus der Kaffeebäume umfasst zwei Untersuchungen, die eine über die enzymatische Variation bei den wilden Populationen der Kaffeebäume, die andere über die Variation von mitochondrialer DNS bei den Arten *C. canephora*, *C. eugenioides* und *C. arabica*.

Die erste Untersuchungsart trägt im wesentlichen dazu bei, für jede Art die ihr eigenen Variationsmodelle in Abhängigkeit der mittleren Heterozygotien und der genetischen Unterschiede zwischen Populationen zu bestimmen. Nach Beschreibung des Pflanzmaterials, der biochemischen Methoden, der genetischen Grundlagen des Polymorphismus, der allozymischen Häufigkeiten pro Population, der Variationsmodelle für jede Art, ziehen die Autoren den Schluss, dass das Interesse der Analyse der allozymischen Variation bei den wilden Populationen der Kaffeebäume in der Bestimmung der geographischen und phylletischen Verteilung der genetischen Variation, in der Anerkennung der Affinitäten zwischen Arten und in der Kenntnis der Markierungsstoffe in den bearbeiteten Zonen liegt.

Die zweite Untersuchungsart betrifft die mitochondriale DNS bei den Arten *C. canephora*, *C. eugenioides* und *C. arabica*, das bei der Elektrophorese nach seiner Hydrolyse durch das Beschränkungsenzym Sal I charakterisiert wird. Die Arten *C. eugenioides* und *C. arabica* weisen das selbe mitochondriale Genom auf, das sehr verschieden von dem des *C. canephora* ist. Die erzielte Ergebnisse lassen darauf schliessen, dass *C. arabica* und *C. eugenioides* von dem selben *C. eugenioides* nahestehenden Vorfahren abstammen.

BERTHOU (F.), TROUSLOT (P.), HAMON (S.), VEDEL (F.), QUETIER (F.). — Electrophoretic analysis of the biochemical polymorphism of coffee trees : Enzymatic variation in eighteen wild populations. Variation of the mitochondrial DNA in the species *C. canephora*, *C. eugenioides* and *C. arabica*. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XXIV, n° 4, oct.-déc. 1980, p. 313-326, fig., tabl., réf.

The electrophoretic analysis of the polymorphism of coffee trees consisted of two studies — one relating to enzymatic variation in wild coffee tree populations, the other to the variation of the mitochondrial DNA in the species *C. canephora*, *C. eugenioides* and *C. arabica*.

The first type of analysis contributed essentially to determining, for each species, models of variation specific to each, in accordance with average heterozygoties and the genetic separations between populations. After presenting the plant material, the biochemical methods, the genetic bases of the polymorphism, the allozymic frequencies per population, and variation models for each species, the authors conclude that the importance of the analysis of the allozymic variation in wild populations of coffee trees resides in the determination of the geographical and phylletic distribution of the genetic variation, in the recognition of the affinities between the species and in the knowledge of the markers in the zones that have been explored.

The second type of analysis concerns the mitochondrial DNA in the species *C. canephora*, *C. eugenioides* and *C. arabica* characterized in electrophoresis after its hydrolysis by the restrictive enzyme Sal I. The species *C. eugenioides* and *C. arabica* have the same mitochondrial genome, very different from that of *C. canephora*. The results obtained suggest that *C. arabica* and *C. eugenioides* are descended from the same ancestor close to *C. eugenioides*.

BERTHOU (F.), TROUSLOT (P.), HAMON (S.), VEDEL (F.), QUETIER (F.). — Análisis por electroforesis del polimorfismo bioquímico de los cafés : Variación enzimática en dieciocho poblaciones silvestres. Variación del ADN mitocondrial en las especies *C. canephora*, *C. eugenioides* y *C. arabica*. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XXIV, n° 4, oct.-déc. 1980, p. 313-326, fig., tabl., réf.

El análisis por electroforesis del polimorfismo de los cafés reúne dos estudios, uno de ellos relativo a la variación enzimática en las poblaciones silvestres de cafés, y el otro, relativo a la variación del ADN mitocondrial en las especies *C. canephora*, *C. eugenioides* y *C. arabica*.

El primer tipo de análisis contribuye principalmente para determinar, para cada especie, los modelos de variación que le son propios, en función de las heterozygotías medias y de las distancias genéticas entre poblaciones. Tras haber presentado el material vegetal, los métodos bioquímicos, los fundamentos genéticos del polimorfismo, las frecuencias alozímicas por población, así como los modelos de variación para cada especie, los autores llegan a la conclusión de que el interés del análisis de la variación alozímica en las poblaciones silvestres de cafés reside en la determinación de la distribución geográfica y filética de la variación genética, en el reconocimiento de las afinidades entre especies y en el conocimiento de los marcadores en las zonas prospectadas.

El segundo tipo de análisis se refiere al ADN mitocondrial en las especies *C. canephora*, *C. eugenioides* y *C. arabica* caracterizado en electroforesis tras su hidrólisis por el enzima de restricción Sal I. Las especies *C. eugenioides* y *C. arabica* presentan el mismo genoma mitocondrial, sumamente diferente de aquél de *C. canephora*. Los resultados obtenidos permiten suponer que *C. arabica* y *C. eugenioides* descienden de un mismo antepasado cercano de *C. eugenioides*.