

**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

F. BERTHOU, P. TROUSLOT, S. HAMON

ORSTOM, Centre d'Adiopodoumé, B.P. V51, Abidjan, 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 O.R.S.T.O.M.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.

1° partie : la 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 7 taxons étudiés :

ASIC, 9^e Colloque, Londres, 1980

15 NOV. 1983

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

N° : 3731

Cote : B

B 3731

Tableau I : Les échantillons analysés dans 7 taxons du genre Coffea

Lettre de code (population)	Taxon	Localité d'origine		Nbre d'individus analysés
A	<u>C. congensis</u>	Anginga	400 km E. Bangui	42
B	"	Louma	200 km E. Bangui	46
C	"	Mboulou	Bangui	45
D	"	Aval Bogassa	10 km S. Bangui	30
N	<u>C. liberica</u>	Ira	Côte d'Ivoire	29
P	"	Aboisso		23
Q	"	Bimbo		20
R	"	Pama	Centrafrique	15
H	<u>C. eugenioïdes</u>	Taressia	Est du Kenya	20
I	"	Nandi		20
J	"	Cheptuyet		20
S	<u>C. stenophylla</u>	Ira	Côte d'Ivoire	13
T	"	Assabli		10
L	<u>C. humilis</u>	Taï	Côte d'Ivoire	40
M	"	Momy		19
E	<u>C. canephora</u>	Libengé	Centrafrique	32
G	"	Ira	Côte d'Ivoire	41
F	Caféier de la Nana*	Dongué	Centrafrique	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.

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. eugenioïdes), 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 8 électrophorégrammes d'enzymes différents sur 20 à 40 individus d'une même population (Figure I).

Elle met en jeu un procédé d'extraction rapide (BERTHOU et TROUSLOT, 1977) et 4 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 4 aliquots qui migrent simultanément dans 4 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 4 enzymes : Phosphoglucomutase BREWER (1970) Estérase α et β SCANDALIOS (1969), Leucine aminopeptidase

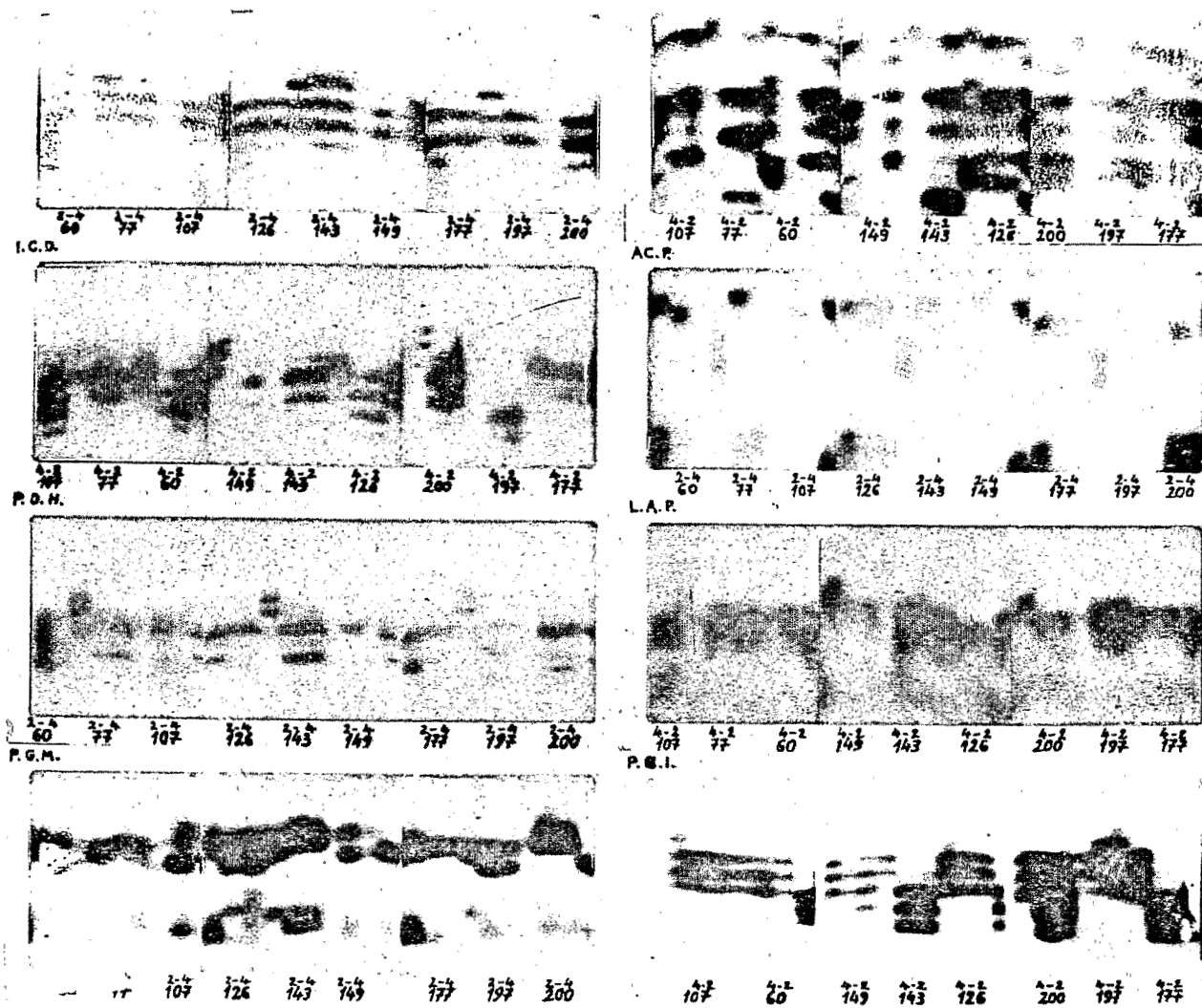


Fig. I - Les 8 zymogrammes révélés en électrophorèse simultanée de 8 enzymes, pour identifier une série de 9 génotypes *C. canephora* ; colonne de gauche : 3 oxydoréductases : Malate déshydrogénase ; Isocitrate déshydrogénase ; 6 Phosphogluconate déshydrogénase et 1 transférase : Phosphoglucomutase ; colonne de droite : 2 hydrolases : Estérases, Phosphatase acide, 1 peptidase : Leucine aminopeptidase et une isomérase : Phosphoglucose isomérase

et Phosphatase acide selon SHAW et PRASAD (1970); d'autre part, celle de BREWER (1970) pour les enzymes : Malatedeshydrogénase SHAW et PRASAD (1970), Isocitrate déshydrogénase, 6 Phosphogluconate déshydrogénase et Phosphoglucose isomérase BREWER (1970).

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 (Figure II).

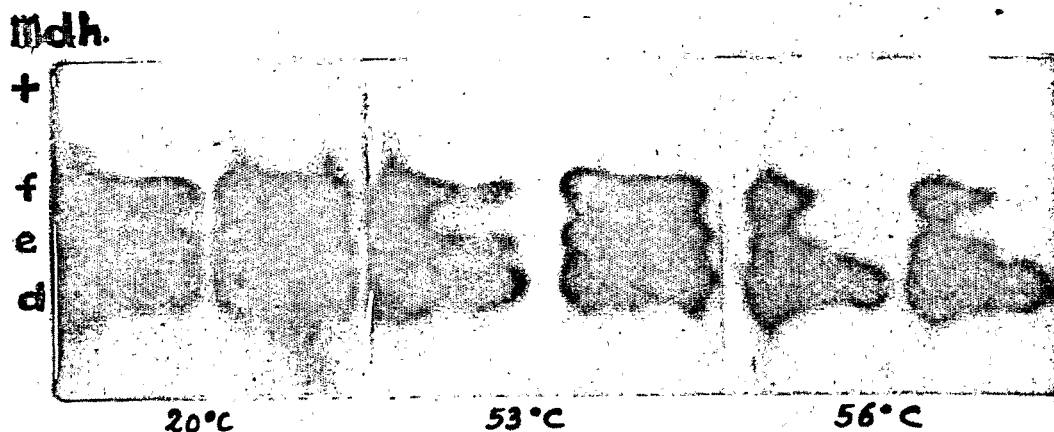


Figure II - Les 6 zymogrammes Malate déshydrogénase correspondent à 6 individus appartenant, dans l'ordre, aux espèces, C. canephora, C. eugenioides et C. arabica (2 fois). Les types observés, identiques à 20°C (types f), se subdivisent en deux sous-types à 56°C : f bande frontale thermorésistante (C. canephora) et e bande frontale thermosensible (C. eugenioides et C. arabica).

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 3 cas de variations observés dans la même population, pour 3 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 absence de démonstration formelle du déterminisme génétique des caractères lus en électrophorèse, nous donnons l'analyse, à titre d'exemple, de 3 cas de variation rencontrés dans une même population et illustrés par les zymogrammes des Figures III, IV et V.

La variation pour l'enzyme 6-Phosphogluconate déshydrogénase (Figure III) représente la situation la plus simple : sur le schéma des électrophorégrammes porté en bas de cette Figure, nous observons des numéros (02, 04, etc...) qui désignent 21 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 allozymes présents chez l'hétérozygote, dont la constitution est notée (b,j), (b,e) ou (e,j). Dans cette population, les 41 individus analysés se répartissent comme suit : 10 (e,e) - 15 (b,e) - 5 (b,b) - 4 (b,j) et 7 (e,j), ce qui permet de calculer les fréquences alléliques au locus "3" (colonne "F" du tableau I de l'annexe.)

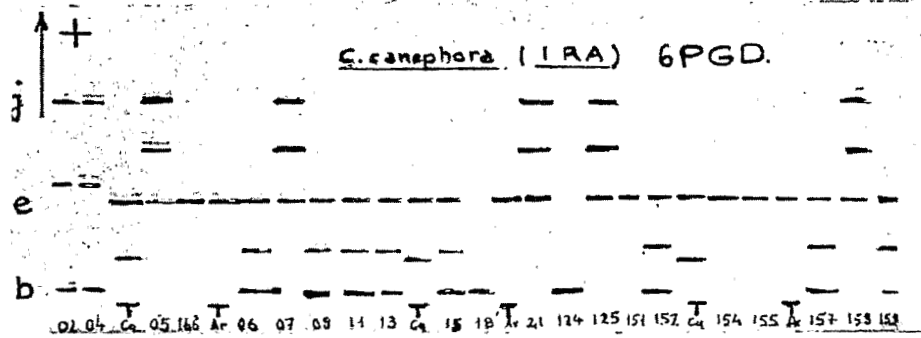
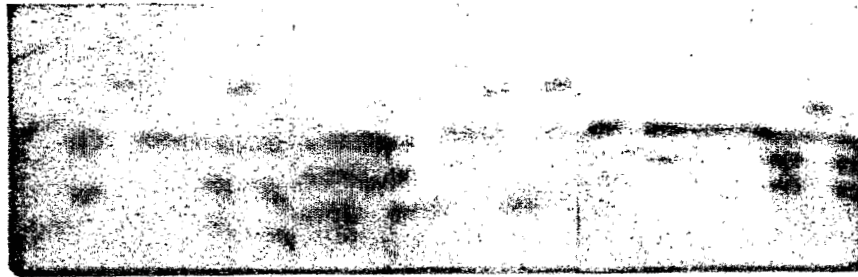


Fig. III - Série de zymogrammes 6Pgd, observés dans la population *C. canephora* Ira : deux types correspondants à des génotypes homozygotes, b et e, et trois types correspondants à des génotypes hétérozygotes, be, bj et ej ; l'homozygote de type j à été également observé dans les mêmes conditions.

La variation pour l'enzyme Phosphoglucose isomérase dénote une situation presque identique : présence de 3 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 3 bandes inséparables et d'intensité 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 3 bandes, et les hétérozygotes 5 ou 7 bandes (Figure IV). Sur 41 individus analysés, nous avons observé : 26 types (d,d) - 8 types (d,f) - 3 types (f,f) - 3 types (d,h) et 1 type (h,h).

Enfin, la variation pour l'enzyme Phosphoglucomutase 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, 3 bandes, et les hétérozygotes aux deux loci, 4 bandes (Figure V).

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

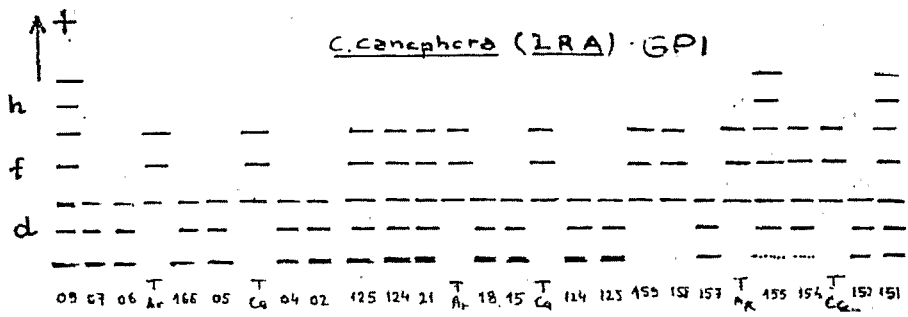
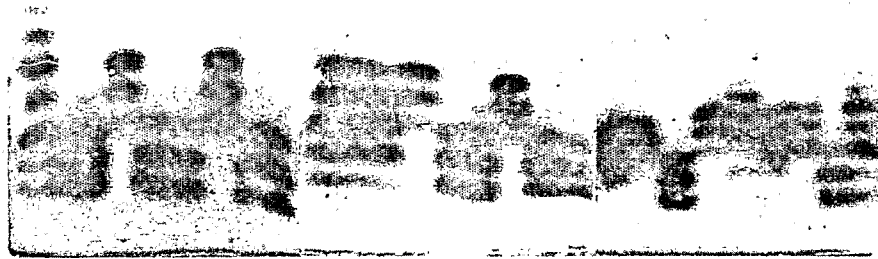


Fig. IV - Série de zymogrammes : Phosphoglucose isomérase observés dans la population C. canephora Ira : les types à 3 bandes : d (clônes 07 et autres) ou f (clône 158 et 159) manifestent deux des trois génotypes homozygotes présents ; les types à 5 et 7 bandes df (clônes 125 et 124) dh (09 et autres) manifestent deux des trois génotypes hétérozygotes.

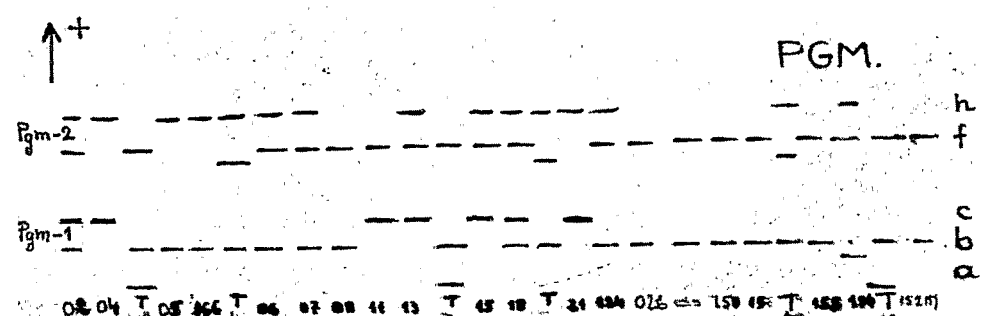
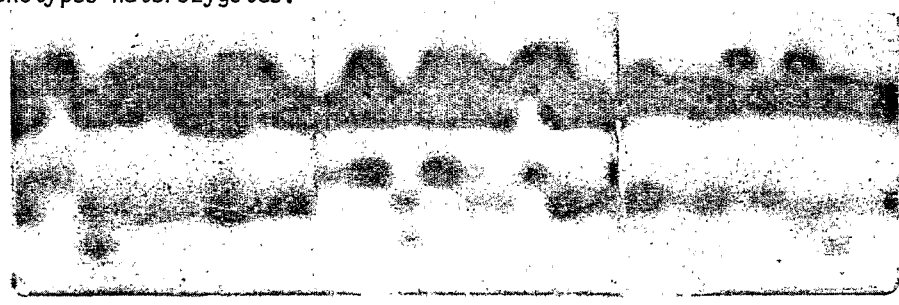


Fig. V - Série de zymogrammes : Phosphoglucomutase observés dans la population C. canephora Ira : les types à deux bandes bf, bh ou cf, ch correspondent à des génotypes homozygotes aux loci pgm-1 et pgm-2 ; Les types à 3 bandes sont hétérozygotes à l'un ou l'autre de ces loci ; Les types à 4 bandes sont hétérozygotes à ces deux loci.

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-Phosphoglucuronate déshydrogénase	0	0	1	1	3
4 Phosphoglucosmutases	0	1	1	2	3 - 4
5 Estérases α	0	1	1	2	3 - 4
5 Estérases β	0	0	1	1	2
6 Phosphatases acides	0	1	1	2	3 - 4
7 Leucine aminopeptidase	0	0	1	1	2
8 Phosphoglucose isomérase	1	0	1	3	5 - 9

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 - Disposition des résultats analytiques

Taxons	nombre de populations	Matières	Disposition
<u>C. congensis</u> - <u>C. canephora</u> - Caféier de la Nana	7	8 enzymes 12 locus 36 allèles	Tableau I de l'annexe. (voir annexe)
<u>C. humilis</u> - <u>C. liberica</u> - <u>C. stenophylla</u>	8	7 enzymes 7 locus 35 allèles	Tableau II (id.)
<u>C. eugenioides</u>	3	6 enzymes 6 locus 13 allèles	Tableau III (id.)

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 18 populations sauvages. Les situations rencontrées sont diverses et fort instructives.

Les caractéristiques du tableau IV, c.à.d. l'Hétérozygotie moyenne par population et la Distance génétique 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 7 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 7 loci. Dans ce cas, nous avons affaire à une espèce qui subsiste sous forme d'isolats, c.à.d. 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 7 loci étudiés ; une Distance génétique intraspécifique traduit le fait que les deux populations les plus éloignées possèdent en commun encore 13 des 22 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 intrapays faible :

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

et une distance interpays 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 Liberio-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 interpays est du même ordre que la distance génétique interpays déterminé pour l'espèce C. liberica :

$$D = 0,44$$

et les Hétérozygoties moyennes sont comparables :

$$H = 0,210 \pm 0,064 \text{ (C. liberica)}$$

$$H = 0,204 \pm 0,084 \text{ (C. canephora)}$$

La distance génétique intrapays 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 intrapays 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 :

$$H = 0,228 \text{ (C. congensis : Anginga)}$$

$$H = 0,181 \text{ à } 0,202 \text{ (C. congensis : Louma et M'Boulou)}$$

$$H = 0,140 \text{ (C. congensis : Aval Bogassa)}$$

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 clîne 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. eugenioïdes* est caractérisée par une hétérozygotie moyenne forte et une Distance génétique intraspecies forte.

$$H = 0,273 \pm 0,101 \quad D = 0,06 \text{ à } 0,15.$$

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 ($H = \frac{1-\Sigma X^2}{n}$) et Distance génétique ($D = -\log_e \frac{\Sigma XY}{\sqrt{\Sigma X^2 \Sigma Y^2}}$), en fonction de l'espèce considérée et de sa provenance (NEI, 1974), sont rassemblées dans le tableau IV.

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. eugenioïdes</i>		0,273±0,101		0,06 (H-J) 0,15 (I-J)		

L'intérêt et les limites de l'analyse enzymatique

Pour l'analyse des relations phyllétiques, la comparaison des Distances génétiques interspecies (Tableau V) est rarement opérante en raison de la valeur toujours élevée des Distances génétiques intraspecifics (Tableau IV).

(a) Dans le couple d'espèce *C. humilis* - *C. liberica*, il faut tenir compte de la distance interprovenances : *C. liberica* Côte d'Ivoire et *C. liberica* Centrafrique

$$D = 0,45 \pm 0,09$$

$$\text{C. humilis - C. liberica (Côte d'Ivoire)} \quad D = 0,38 \pm 0,08$$

$$\text{C. humilis - C. liberica (Centrafrique)} \quad D = 0,74 \pm 0,10$$

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).

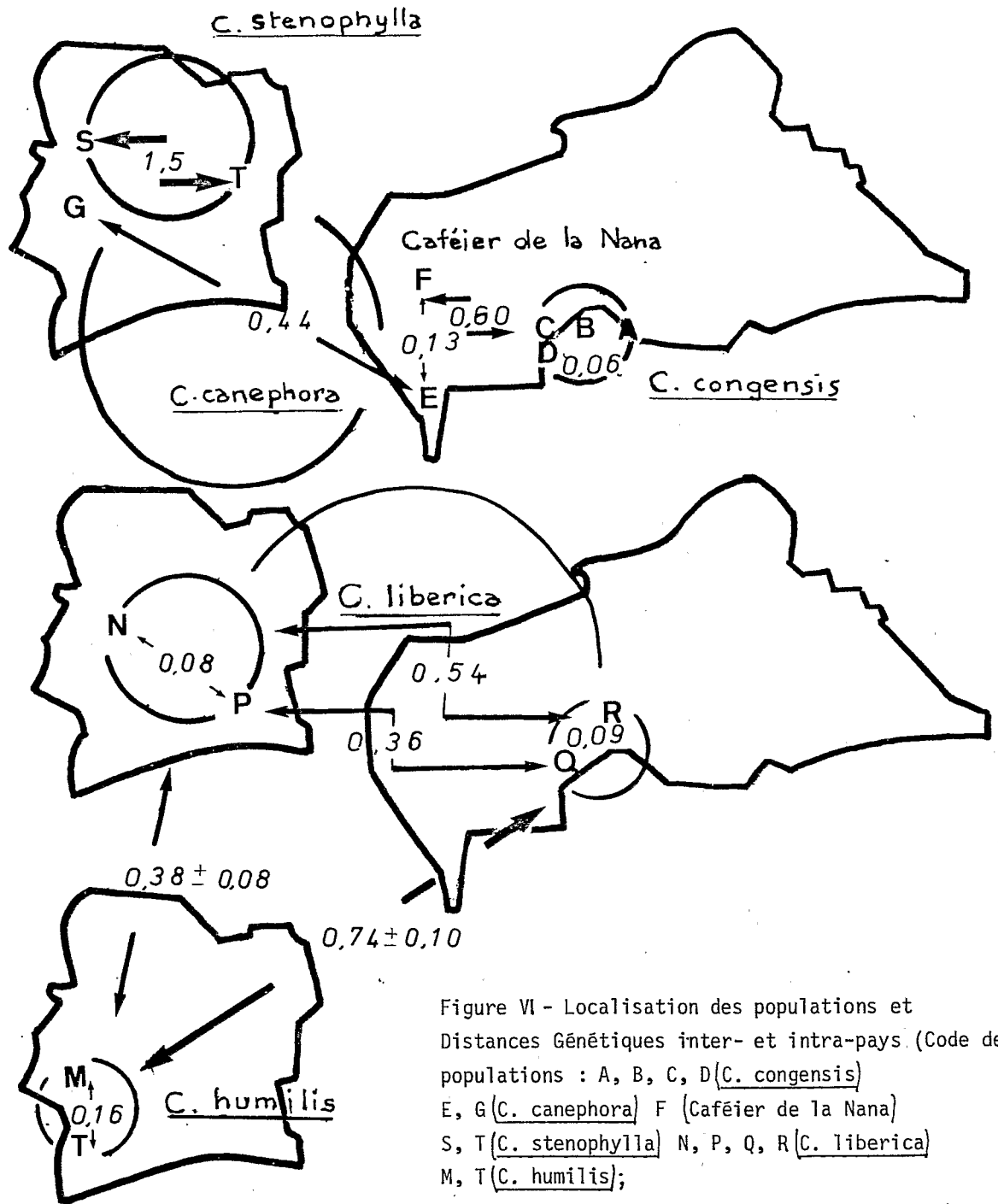


Figure VI - Localisation des populations et Distances Génétiques inter- et intra-pays. (Code des populations : A, B, C, D (C. congensis) E, G (C. canephora) F (Caféier de la Nana) S, T (C. stenophylla) N, P, Q, R (C. liberica) M, T (C. humilis);

La Côte d'Ivoire est représentée à gauche, le Centrafrique à droite.)

- (b) Le couple *C. canephora* - *C. congensis* fait exception : la Distance Génétique interspécies est très supérieure à la Distance Génétique interprovenance 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 singularise de cet ensemble *C. canephora* - "Caféier de la Nana".

La Fig. VI rassemble nos conclusions sur la situation des diverses populations.

Tableau V : Distances Génétiques interspécies

Distances	Espèces (provenances)				
	<i>C. congensis</i> (Anginga) A	<i>C. congensis</i> (Aval Bogassa) B	<i>C. canephora</i> (Centrafrique) E	"Caféier de la Nana" F	<i>C. canephora</i> (Côte d'Ivoire) G
0,06	[Barre horizontale]		[Barre horizontale]		
0,13	[Barre horizontale]		[Barre horizontale]		
0,35	[Barre horizontale]		[Barre horizontale]		
0,60	[Barre horizontale]				

En conclusion, l'intérêt de l'analyse de la variation allozymique dans les populations sauvages de caféier 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, 1979), 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 II 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.

2e partie : 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 VI).

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. eugenioïdes 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 serre à Bondy. L'isolement des mitochondries, l'extraction et l'hydrolyse de l'ADN mitochondrial sont réalisés suivant les procédés développés par VEDEL et QUETIER (1978).

Les profils manifestent des homologues :

- très faibles entre C. canephora, (a) et les 2 autres: - C. eugenioïdes, (b) et C. arabica, (c)
- très fortes entre C. arabica, (b) et C. eugenioïdes, (c)

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. VI)

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
<u>C. Arabica</u> (c)	39	39	100
<u>C. eugenioïdes</u> (b)	40	36	90
<u>C. canephora</u> (a)	36	7	18

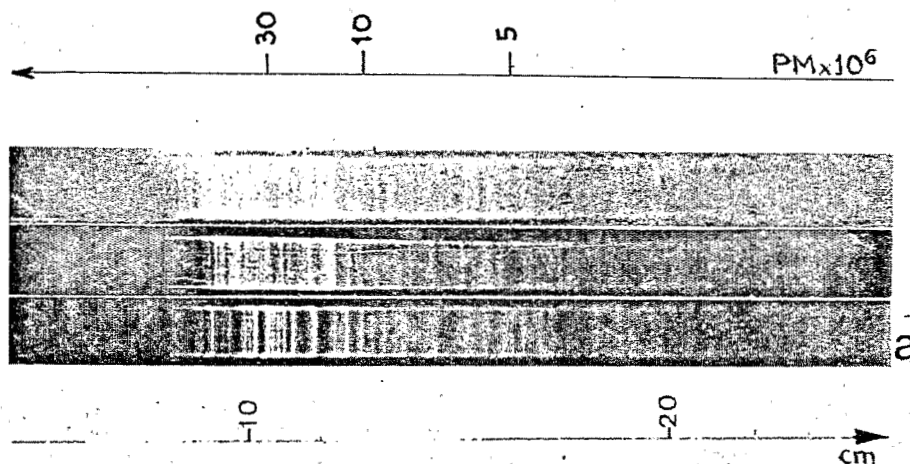


Figure VII - Electrophorèse en gel d'agarose des fragments d'ADN mitochondriaux obtenus à partir de feuilles (a) C. canephora (b) C. eugenioïdes (c) C. arabica, par l'enzyme de restriction Sal I.

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

Ce résultat étaye une hypothèse déjà ancienne qui fait intervenir une espèce diploïde proche de C. eugenioïdes à l'origine de la formation de l'espèce tétraploïde C. arabica, hypothèse récemment corroborée par l'étude du Polymorphisme enzymatique (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. eugenioïdes descendent d'un même ancêtre proche de C. eugenioïdes.

BIBLIOGRAPHIE

- BERTHAUD (J.) et GUILLAUMET (J.L.) (1978-1980) Rapport de prospection des caféiers sauvages en Centrafrique. Café, Cacao, Thé Vol. XXII et XXIV .
- BERTHOU (F.), TROUSLOT (P.) (1977). L'analyse du polymorphisme enzymatique dans le genre Coffea : adaptation d'une méthode d'électrophorèse en série ; premiers résultats. 8e Coll. ASIC, Abidjan.
- BREWER (C.J.) (1971). An introduction to isozymes techniques. Acad. Press New York, 185 p.
- HARRIS (H.) et HOPKINSON (D.A.) (1976). Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North Holland Publishing Company, Amsterdam.
- 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 3 : 37-79.
- SHAW (C.R.) et PRASAD (R.) (1970). Starch gel electrophoresis of enzymes, a compilation of recipes. Biochemical Genetics 4 : 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 61 : 629-641.
- TROUSLOT (P) et SECOND (G) (1980). Technique d'électrophorèse en gel d'amidon appliquée au Riz. Travaux et Documents O.R.S.T.O.M. n° 120.
- VEDEL (F.) et QUETIER (F.) (1978). Hydrolyse spécifique de l'ADN chloroplastique et de l'ADN mitochondrial des végétaux supérieurs par les enzymes de restriction. Physiol. vég. 16 (3) : 441-425.
- VEDEL (F.) et QUETIER (F.) (1978). Study of wheat phylogeny by EcoRI analysis of chloroplast and mitochondrial DNAs . Plant Sci. Letters 13 : 97-102.
- NEI (M) (1972). Genetic distance between populations. Amer. Nat. , vol. 106 , p. 283.
(1974) Genetics, vol. 76, p 379.

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

Locus et allèle	Anginga (A)	Louma (B)	M'Boulou (C)	Ava1 Bogassa (D)	Libengé (E)	Ira (G)	N'dongué (F)
1. Malatedeshydro- génése							
Mdhe	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 deshydrogénése							
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 deshydrogénése							
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. Phosphoglu- comutase-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. Phosphoglu- comutase-2							
Pgm-2 ⁱ	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-1et-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 ^l	0,92	0,84	0,97	0,98	1,00	0,38	0,78
P.ac.-2 ⁱ	-	-	-	-	-	-	0,22
11. Leucine amino- peptidase							
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	-

Annexe II - 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>	
	Taī (L)	Momy (M)	Ira (N)	Aboisso (P)	Bimbo (Q)	Pama (R)	Ira (S)	Assabli (T)
1. Malate déshydrogénase								
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 déshydrogénase								
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. Phosphoglucose mutase-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	-	-

Annexe III - Fréquences alléliques dans le groupe d'espèces *C. eugenioïdes*

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

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

BERTHAUD (J.).- L'incompatibilité chez Coffea canephora : méthode de test et déterminisme génétique. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 10 p., 2 fig., 11 tabl., 12 réf.

Une méthode de test en laboratoire de l'incompatibilité des caféiers a été mise au point. Cette méthode permet de mettre à l'épreuve un grand nombre de combinaisons. Elle est basée sur l'observation de la progression des tubes polliniques émis par des grains de pollen déposés sur des styles isolés, en boîte. Dans une combinaison "pollen-style" compatible, les tubes polliniques se retrouvent à la base du style 24 h après la pollinisation. Quand la combinaison est incompatible, aucun tube pollinique ne dépasse la base des stigmates.

Cette méthode est utilisée pour mettre en évidence le déterminisme génétique de l'incompatibilité chez C. canephora par l'étude des descendants des croisements entre trois souches de C. canephora. Les résultats concordent avec l'hypothèse d'un système gamétophytique à un seul gène comportant une série allélique.

BERTHAUD (J.).- Incompatibility in Coffea canephora : test method and genetic determinism. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 10 p., 2 fig., 11 tabl., 12 réf.

A method of testing incompatibility of coffee trees in the laboratory has been developed. This method allows a large number of combinations to be tested. It is based on the observation of the progression of the pollen tubes produced by pollen grains deposited on isolated styles in a box. In a compatible "pollen-style" combination, the pollen tubes are found at the base of the style 24 hours after pollination. When the combination is incompatible, no pollen tube projects from the base of the stigma.

This method is used to show the genetic determinism of incompatibility in C. canephora by studying the progeny of the crosses between three strains of C. canephora. The results confirm that the hypothesis of a gametophytic system with only a single gene comprising an allelic series is correct.

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. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 16 p., 7 fig., 7 tabl., 3 tabl. en annexe, 13 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 phyllétique 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.).- 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. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 16 p., 7 fig., 7 tabl., 3 tabl. en annexe, 13 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 heterozygotes 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.

Van der VOSSEN (H.A.M.), WALYARO (D.J.).- Le caractère héréditaire de la résistance à l'antracnose des baies du caféier chez le caféier Arabica. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 4 p., 13 réf.

Le caractère héréditaire de la résistance à l'antracnose des baies du caféier a été étudié en appliquant un test de pré-sélection à des descendance F₂ d'un croisement semi-diallèle entre onze variétés de caféiers possédant différents degrés de résistance, et à des ensembles de parents, générations F₁, F₂, B₁₁ et B₁₂ de croisements entre des variétés résistantes et susceptibles. La véritable résistance à l'antracnose des baies semble être contrôlée par des gènes majeurs en trois différents loci.

La variété très résistante Rume Sudan porte les gènes R₁ dominant et K récessif. L'interaction non allélique entre ces deux gènes est d'une nature double. Le locus R a des allèles multiples avec les allèles R₁ R₁ présents chez Rume Sudan et les allèles R₂ R₂ un peu moins efficaces, présents chez Pretoria, qui a aussi le gène K.

La variété moyennement résistante K7 ne possède que le gène récessif K. La variété hybride de Timor (hybride interspécifique naturel entre Arabica et Robusta), semblable à l'Arabica, porte un gène de résistance à l'antracnose sur le locus T avec une action génique intermédiaire. Il a probablement hérité ce gène de son parent Robusta. Il apparaît avec évidence que la résistance à l'antracnose des baies est de nature stable, mais il est prudent d'accumuler autant de gènes de résistance que possible dans un génotype, en combinant, dans un programme de sélection, la résistance de Rume Sudan à celle de l'hybride de Timor.

Van der VOSSEN (H.A.M.), WALYARO (D.J.).- The inheritance of CBD resistance in Arabica coffee. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 4 p., 13 réf.

The inheritance of resistance to coffee berry disease (CBD) was studied by applying a pre-selection test to F₂ progenies of a half diallel cross between 11 coffee varieties with different degrees of resistance and to sets of parental, F₁, F₂, B₁₁ and B₁₂ generations of crosses between resistant and susceptible varieties. True resistance to CBD appears to be controlled by major genes on three different loci.

The highly resistant variety Rume Sudan carries the dominant R₁ - and the recessive K - genes. The non-allelic interaction between these two genes is of a duplicate nature. The

Ruffon



NEUVIÈME COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ

Londres, 16-20 juin 1980

2 Volumes II

B3729 → 3734

B3729 → B3734

Association Scientifique Internationale du Café
(ASIC)
42, rue Scheffer, 75016 Paris

D.L. Paris 1981