

4

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE LA CULTURE *IN VITRO* D'EMBRYONS DE CAFÉIERS

Action de la caféine

J. P. COLONNA
Phytophysiologiste
Centre ORSTOM de Tananarive

INTRODUCTION

Le pouvoir germinatif des semences diminue généralement d'une façon assez rapide chez les diverses espèces et variétés du genre *Coffea* (1). On a pu invoquer les effets de la lumière (2) (3) ou le rôle d'un dessèchement trop important (4) (5) pour expliquer ce fait. La circulation des gaz et des liquides nécessaires à la germination pourrait être entravée par les déformations, dues à une dessiccation trop intense, des plasmodesmes entre cellules de la graine (6). Enfin la libération d'acides gras, après l'activation de la lipolyse en présence d'oxygène de l'air, entraînerait l'inhibition partielle, puis totale, du développement de l'embryon (7).

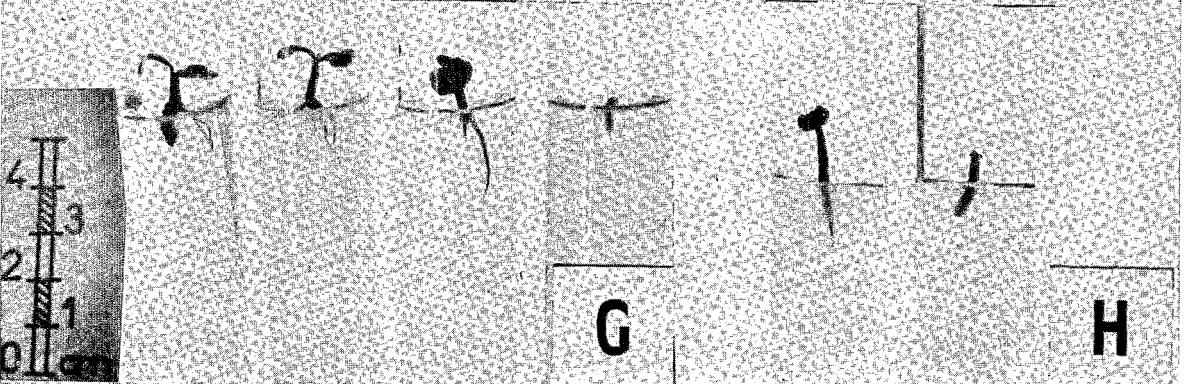
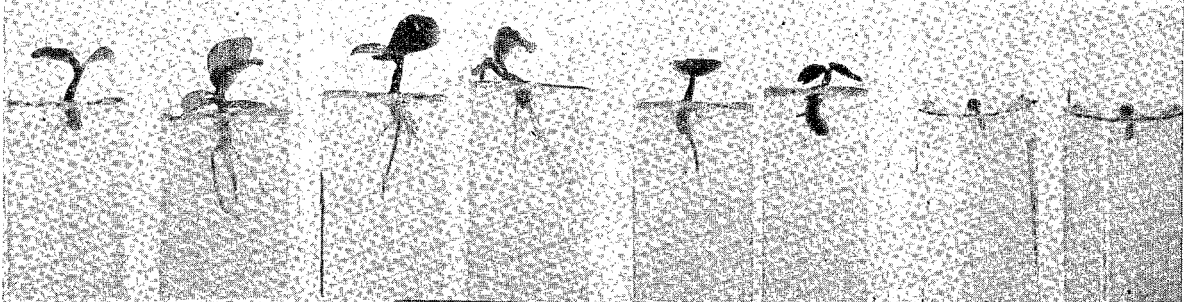
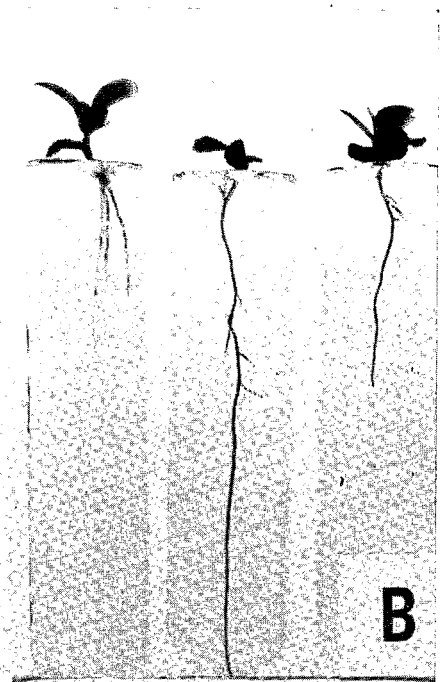
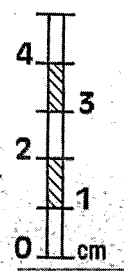
La détermination de ces quelques causes n'aboutit pas à une perception d'ensemble du phénomène provoquant la perte rapide du pouvoir germinatif.

La culture *in vitro* d'embryons de caféiers permettrait d'étudier ce problème. Plusieurs types de recherches biochimiques, phytopathologiques ou génétiques utiliseraient vraisemblablement avec

profit cette technique. Parmi elles, on peut citer celles qui concerneraient :

- la signification biologique des bases purique et pyridique chez le caféier ;
- la signification biologique des depsides et du principal d'entre eux : l'acide chlorogénique (8) (9) ;
- les modalités de la résistance variétale aux agents pathogènes ;
- la croissance d'hybrides à germination délicate ;
- l'influence de diverses substances contenues dans le grain de café, telles que la caféine, la trigonelline, l'acide chlorogénique et ses isomères, l'acide férulyl-quinique et les autres depsides, les acides phénols, sur la germination de l'embryon, etc...

Dans le travail dont nous rendons compte ici nous avons abordé la mise au point des méthodes de culture *in vitro* d'embryons de diverses variétés de caféiers et les applications que l'on peut en tirer.



MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

En ce qui concerne le *Coffea canephora* Pierre, s. var. *robusta* (Linden) Chev., nous avons disposé tout d'abord de semences sélectionnées, récoltées au mois de janvier au Centre de recherches agronomiques de Boukoko en République Centrafricaine. Par la suite nous avons pu poursuivre notre travail sur des graines immatures provenant de la Station du café de Kianjavato, à Madagascar (n° K 44).

Les deux mêmes origines se retrouvent pour le *Coffea dewevrei* de Wild. et Durand, race *C. excelsa* Chev. que nous avons utilisé (a. — sélection de RCA, b. — n° 859 de Kianjavato).

Enfin la Station de Kianjavato a pu aussi nous fournir d'une part des semences, d'autre part des graines immatures de la race *C. neo-arnoldiana* de cette dernière espèce (n° A 14).

Le choix de ces deux races de *C. dewevrei* se justifie, car parmi les caféiers « excelsoides » regroupés par CHEVALIER (10) (11) (12) sous ce nom spécifique, elles apparaissent comme réellement différentes. En effet, sur une plantation de 5 ha issue de semences provenant d'un seul

caféier Excelsa typique (n° Fodé 301), nous avons pu déterminer la variabilité des dimensions des feuilles adultes. La gamme de ces variations recouvre les chiffres correspondants donnés par CHEVALIER pour la plupart des races « excelsoides ». Seules les races *dybowski* et *neo-arnoldiana* sont plus grandes et la race *ituriensis* plus petite.

Désinfection des graines

Dans le but de rechercher le meilleur équilibre entre l'efficacité de la désinfection et le maintien des possibilités de développement (Planche, H), quatre traitements ont été mis en comparaison :

1) trempage de 15 mn dans le chlorure mercurique à 1‰ auquel on a ajouté un « mouillant » (Tween 80 à 1‰), après application du vide (*) pendant 5 mn ;

2) trempage de 5 mn dans le chlorure mercurique à 1‰ auquel on a ajouté le « mouillant » (Tween 80 à 1‰) après application du vide (*) pendant 1 mn ;

3) trempage de 5 mn dans une solution de Tween 80 à 1‰ après application du vide (*) pendant 1 mn, puis trempage de 5 mn dans le chlorure mercurique à 1‰ ;

4) trempage dans l'éthanol à 95° G. L. durant 3 mn, après application du vide (*) pendant 1 mn, suivi d'un trempage de 5 mn dans l'hypochlorite de calcium (200 degrés chlorométriques, 70 g dans un litre d'eau distillée).

LÉGENDE DE LA PLANCHE CI-CONTRE

- A. Meilleurs développements obtenus sur milieu liquide.
- B. Meilleurs développements obtenus sur milieu gélosé.
- C. Caféier Excelsa : développement en l'absence de caféine dans le milieu de culture.
- D. Caféier Excelsa : développement en présence de 1.10^{-6} caféine dans le milieu de culture.
- E. Caféier Excelsa : développement en présence de 1.10^{-4} caféine dans le milieu de culture.
- F. Caféier Excelsa : développement en présence de 1.10^{-2} caféine dans le milieu de culture.
- G. Caféier Néo-arnoldiana : de gauche à droite, développements obtenus en présence de 0, 1.10^{-6} , 1.10^{-4} , 1.10^{-2} caféine dans le milieu de culture.
- H. A gauche embryon se développant normalement, à droite embryon soumis à une désinfection plus traumatisante.

TABLEAU I

Influence des divers protocoles de désinfection

Traitements	% de non-contamination	% d'embryons utilisables	Indice de développement et de régularité
1	95	75	+ +
2	60	50	+ + +
3	85	60	+ +
4	90	85	+ + +

(*) Vide de 30 mm de mercure.

Les résultats consignés dans le tableau I montrent l'efficacité des traitements n° 1 et 4. Par rapport au nombre d'embryons mis en culture, le pourcentage réellement utilisable, c'est-à-dire les embryons non contaminés et se développant d'une façon normale, en réalisant leur photosynthèse, atteint une valeur satisfaisante pour le traitement n° 4 et, à un moindre degré, pour le traitement n° 1. Une évaluation de la régularité du développement fait ressortir un caractère moins traumatisant pour les traitements n° 2 et 4. Ce caractère doit être pris en considération dans le cas des embryons immatures qui semblent moins bien protégés que les embryons mûrs. Par ailleurs, il concourt à l'obtention d'une meilleure homogénéité des cultures.

Le trempage s'effectue évidemment sur des graines nues. L'augmentation du temps de désinfection à 30 ou 45 mn n'apporte aucune amélioration. Par contre, il convient absolument de faire pénétrer le désinfectant dans le sillon du grain, grâce à l'application d'un vide d'environ 30 mm de mercure. Cette simple opération permet de faire progresser le pourcentage de non-contamination d'une façon considérable : dans l'exemple du traitement n° 1 il passe de 30 à 95 %.

La désinfection se termine toujours par trois rinçages aseptiques à l'eau distillée.

Extraction de l'embryon

Sur graines mûres, la nécessité de repérer l'embryon pour l'extraire et la dureté de l'albumen imposent un trempage aseptique de 36 à 48 h dans l'eau distillée stérilisée. Ce trempage se fait dans une quatrième eau de rinçage.

L'extraction de l'embryon et son passage sur milieu de culture sont réalisés, sous tunnel aseptisé, par pulvérisation d'éthanol à 95° G. L. La graine désinfectée, sortant du trempage stérile, est débarrassée de la fine pellicule argentée qui la recouvre, puis immédiatement plongée, durant quelques instants, dans l'éthanol à 95° G. L. L'embryon, situé dans un plan inclus dans l'un des deux feuillets de l'albumen, est alors visible par transparence.

Tenant la graine entre deux doigts, le sillon vers le bas, on effectue au moyen d'un scalpel stérile une entaille transversale, profonde d'un à deux millimètres, vers le milieu de la graine, à l'extrémité et au ras des deux cotylédons accolés de l'embryon. On pratique ensuite sur le côté une seconde entaille longitudinale, dans le plan et au niveau de l'embryon. La portion du feuillet supérieur ainsi délimitée et découpée est soulevée déli-

catement avec la pointe du scalpel, de façon à dégager en premier l'extrémité radicaire de l'embryon, puis l'axe hypocotylé et les cotylédons. L'embryon entièrement découvert, reposant sur le feuillet inférieur auquel il adhère relativement peu, sauf parfois par les cotylédons, est soulevé sur la pointe du scalpel et introduit dans le tube de culture stérile.

Dans le cas de l'embryon immature, dont l'albumen non entièrement formé présente une dureté très inférieure à celle de l'albumen des graines mûres, le trempage préalable dans l'eau stérile n'est pas nécessaire. L'extraction se trouve d'ailleurs facilitée par la faible adhérence, constatée à ce stade, de l'embryon à l'albumen. A la limite, l'embryon immature pourrait, dans certains cas, s'extraire par simple pression sur la graine.

Milieux et conditions de culture

Le milieu de culture de base contient 9 ‰ de « Bacto agar Difco », 20 ‰ de saccharose, les éléments minéraux selon HELLER (13) et diverses substances complémentaires : méso-inositol (200 mg/l), pantothénate de calcium (0,5 mg/l), cystéine HCl (2 mg/l), thiamine HCl (1 mg/l), acide nicotinique (1 mg/l), glycine (3 mg/l), adénine HCl (1 mg/l), pyrodoxine HCl (0,8 mg/l).

Pour étudier l'action de la caféine, on ajoute cette base purique à des doses croissantes pouvant aller jusqu'à 1.10⁻².

Pour les essais en milieu liquide on supprime la gélose ; l'embryon fiché dans une maille d'un manchon de tulle (Planche, A), ligaturé lui-même sur un tube de verre intérieur, est maintenu à hauteur constante ; le niveau est rétabli périodiquement et aseptiquement.

Les embryons sont soumis à un cycle d'obscurité et de lumière de 12 h. La température a été maintenue constante aux environs de 22 °C pour les embryons provenant de RCA, les autres ont subi une variation journalière de la température qui descendait à 21 °C pendant la période obscure et montait à 28 °C durant la période de lumière, cette dernière étant fournie par des tubes « lumière du jour ».

Dosage de la caféine

La méthode de KUM-TATT (14) modifiée par l'IFCC a été utilisée.

RÉSULTATS

Croissance comparée *in vitro* des embryons de diverses variétés de caféiers

Expérience 1

La première expérience porte sur les semences sélectionnées de *C. robusta* et de *C. excelsa* originaires de RCA, ayant subi le traitement désinfectant n° 1 et placées sur milieu gélosé. L'embryon avec ses cotylédons mesurait, au moment de la mise en culture, 6,4 mm de long pour le *C. excelsa* et 5,5 mm pour le *C. robusta*, les longueurs respectives, sans les cotylédons, se situant à 4,7 mm et 4,0 mm (tableau II). La longueur a sextuplé en 100 jours pour le caféier Robusta, alors qu'il n'a fallu que 75 jours pour le caféier Excelsa. Les racines grandissent plus vite que l'axe hypocotylé. Les feuilles cotylédonnaires se développent deux fois plus rapidement chez le *C. excelsa*. Dans les conditions de l'expérience leur développement cesse presque totalement entre le 60^e et le 70^e jour : la transplantation sur un nouveau milieu devient alors nécessaire. La première paire de feuilles au-dessus des cotylédons apparaît vers le 45^e jour pour les deux variétés et se développe rapidement ;

elle peut apparaître plus tôt et s'accroître à la place des cotylédons si ceux-ci ont été abîmés au moment de la mise en culture stérile. Au 75^e jour de culture, on observe la naissance d'une seconde paire de feuilles chez le *C. excelsa*.

Le caféier Excelsa a mieux poussé que le caféier Robusta.

Expérience 2

Conduite sur les graines immatures des trois variétés originaires de Madagascar, la seconde expérience confirme les résultats précédents pour l'ensemble du développement et de la croissance des embryons (tableau III). Au bout de quatre-vingt-dix jours de culture *in vitro*, le poids frais moyen atteignait pour le caféier Robusta 40 % et pour le caféier Néo-arnoldiana 80 % de celui du caféier Excelsa (significatif à $P = 0,99$), de même la longueur de l'hypocotyle se situait à 54 % et 87 % (significatif à $P = 0,999$), la longueur totale à 53 % et 76 % (non significatif).

Le *Coffea neo-arnoldiana* (n° A 14, Kianjavato) s'est ici mieux comporté que le *C. robusta* (n° K 44, Kianjavato) et moins bien que le *C. excelsa* (n° 859, Kianjavato).

TABLEAU II

Croissance en longueur des diverses parties d'embryons de caféiers Robusta (RCA) et Excelsa (RCA) cultivés *in vitro* sur milieu gélosé

Nbre de jours de culture	<i>C. robusta</i>					Nbre de jours de culture	<i>C. excelsa</i>				
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
1	4,0	1,0	3,0	3,0	0	3	4,7	0,5	4,2	3,4	0
18	8,2	3,4	4,8	3,7	0	10	7,6	2,0	5,6	4,1	0
24	10,9	5,6	5,3	3,8	0	21	15,1	7,7	7,4	6,6	0
31	13,5	7,5	6,0	4,1	0	32	19,0	10,9	8,1	8,8	0
39	15,9	9,2	6,7	4,6	0	48	20,9	12,3	8,6	10,1	0,7
48	17,1	10,1	7,0	4,9	0,2	61	23,1	14,3	8,9	10,8	1,2
59	18,8	11,5	7,3	4,6	1,1	75	25,8	16,6	9,2	10,7	4,1
97	23,0	14,8	8,2	4,6	3,5						

1 : Longueur en mm du total racine + axe hypocotylé + tige ;

2 : Longueur en mm de la racine ;

3 : Longueur en mm de la somme axe hypocotylé + tige ;

4 : Somme des « diamètres » en mm des deux cotylédons ;

5 : Somme de la longueur en mm des deux feuilles de rang 1 au-dessus des cotylédons.

TABLEAU III

Croissance et développement d'embryons des trois variétés de caféiers originaires de Kianjavato cultivés *in vitro* sur milieu gélosé pendant 90 jours

	<i>C. robusta</i> (K 44)	<i>C. neo-arnoldiana</i> (A 14)	<i>C. excelsa</i> (859)
Longueur en mm des racines	5,2	8,1	11,3
Longueur en mm de l'hypocotyle	2,6	4,2	4,8
Longueur en mm du total	10,0	14,2	18,7
« Diamètre » moyen en mm d'un cotylédon	3,7	4,1	4,1
Poids de matière fraîche en mg.	11,8	24,0	30,0

Influence de l'âge des semences

La faculté de se développer a diminué rapidement chez les embryons de *C. robusta* (RCA) : de 90 % à quatre semaines, elle est descendue à 6 % dès la dixième semaine. L'embryon de *C. excelsa* a par contre conservé presque totalement cette faculté au bout de onze semaines.

Un essai de germination conduit en serre, en fonction de l'âge des semences, a donné des résultats du même ordre. Ainsi, nous n'avons pu obtenir de développement sur des lots d'embryons provenant de semences vieillissantes à faible pouvoir germinatif. L'embryon extrait d'une graine à pouvoir germinatif diminué n'a pas poussé : il semble donc que l'embryon vieillissant a subi lui-même des modifications irréversibles, empêchant son développement avant que celui-ci soit freiné ou arrêté par les substances issues, au moment de la germination, d'un albumen périmé.

Croissance comparée en milieux gélosé et liquide

Les meilleurs développements furent obtenus en milieu liquide, certains embryons dépassant 15 cm de long, dont 12 cm pour les racines, avec trois paires de feuilles bien formées au-dessus des cotylédons (Planche, A). La croissance, bien qu'inférieure (Planche, B), fut toutefois plus régulière en milieu gélosé, aussi avons-nous retenu ce dernier milieu pour étudier l'action de la caféine sur la germination de l'embryon.

Précision de la méthode de dosage ; teneur en caféine des graines

En ce qui concerne le dosage, nous avons tout d'abord vérifié la reproductibilité du paramètre AT,

par lequel intervient dans la formule de calcul la solution témoin de caféine, sur divers spectrophotomètres. Ceci a été réalisé sur quatre séries de dix répétitions, correspondant à quarante solutions témoins de caféine, préparées séparément. Les variances des diverses séries sont hétérogènes pour le spectrophotomètre n° 1 qui a été éliminé. Les résultats sont homogènes, avec un coefficient de variation (CV) de 1,5 %, pour le spectrophotomètre n° 2 (UNICAM SP 500) que nous avons utilisé par la suite. Les résultats sont toujours homogènes et la précision meilleure (CV = 0,6 %) avec le spectrophotomètre n° 3 de marque Zeiss.

TABLEAU IV

Comparaison des résultats de dosages de caféine obtenus sur les mêmes échantillons

N° de l'échantillon	Résultats	
	Laboratoire n° 1	Laboratoire n° 2 (moyenne de dix dosages, précision ± 2 %) (*)
2	1,67	1,70 \pm 0,03
3	1,60	1,56 \pm 0,03
4	1,61	1,68 \pm 0,03
5	1,72	1,78 \pm 0,04
6	1,55	1,55 \pm 0,03
7	1,64	1,69 \pm 0,03
8	1,60	1,59 \pm 0,03
9	1,58	1,60 \pm 0,03
10	1,59	1,64 \pm 0,03
11	1,70	1,62 \pm 0,03
12	1,59	1,54 \pm 0,03

(*) Nous donnons deux chiffres après la virgule, car il s'agit ici d'une moyenne de dix résultats. Si le résultat provient d'un seul dosage, le second chiffre après la virgule ne peut être pris en considération.

Une série de soixante déterminations sur l'échantillon végétal n° 1 a permis de préciser certaines modalités pratiques du dosage : le CV entre dosages réalisés sur diverses aliquotes de la même extraction est de l'ordre de 2. Entre extractions différentes du même échantillon, il se situe aux environs de 3.

Sur chaque échantillon végétal d'un lot de onze, nous avons pratiqué dix extractions. Les coefficients de variation de ces séries ne dépassent pas 3. Pour $P = 0,95$, le **1/2 intervalle de tolérance** (15), qui donne les limites de la population, vaut environ 10 % de la moyenne des dix mesures. Le **1/2 intervalle de confiance d'une mesure** est de 7 % (précision pour un dosage) et le **1/2 intervalle de confiance de la moyenne** atteint 2 % (précision de la moyenne). Ceci pour des teneurs d'environ 1,5 % de caféine dans la masse de matière sèche.

De même, nous avons pu comparer les résultats obtenus par deux laboratoires sur une série de onze échantillons de poudre de grains de café. La correspondance des résultats nous paraît satisfaisante et semble bien en rapport avec le degré de précision déterminé ci-avant (tableau IV).

Les graines des variétés de Madagascar sur lesquelles l'action de la caféine a été éprouvée présentent des teneurs différentes en caféine (tableau V).

TABLEAU V

Teneurs en caféine des graines de caféier utilisées, exprimées en % du poids de la masse de matière sèche

Etat des graines	Variétés		
	<i>C. robusta</i> (K 44)	<i>C. neo-arnoldiana</i> (A 14)	<i>C. excelsa</i> (859)
Graines immatures.	2,8	1,3	1,0
Graines mûres.....	(*)	1,3	0,7

(*) Les graines mûres du n° K 43, très proche de celui-ci, contiennent 2,7 % de caféine.

Action de la caféine

Expérience 1

Conduite sur graines mûres de caféier Excelsa ayant subi le traitement désinfectant n° 1, la première expérience comportait dix répétitions de cinq traitements ; les mensurations correspondent aux jours 3, 10, 21, 32, 48, 61 et 75. On constate (fig. 1, p. 201) que, la longueur des embryons étant absolument identique au départ, des différences semblent apparaître en fonction du temps et des teneurs en caféine du milieu. Toutefois, si l'analyse statistique fait ressortir un effet « jours » très

marqué, elle ne confirme pas d'effet « traitements ». Cette non détection de l'effet « traitements » tient à la variabilité résiduelle élevée et à l'homogénéité imparfaite des variances résiduelles. Ceci traduit l'hétérogénéité importante constatée dans le développement des embryons et montre que l'inhibition n'est pas nette pour des teneurs en caféine du milieu de l'ordre 5.10^{-5} .

Expérience 2

Pour remédier à cette hétérogénéité, après divers essais, nous avons modifié la méthode de désinfection et employé le traitement désinfectant n° 4. Estimant que les embryons pouvaient être dans un état physiologique moins « fixé » et répondre plus nettement aux sollicitations reçues, nous avons utilisé des graines immatures. Enfin, la gamme des concentrations en caféine du milieu de culture a été étendue. La seconde expérience, comportant neuf répétitions de quatre traitements a duré quatre-vingt-dix jours (tableau VI, p. 200).

Sur l'ensemble de l'expérience, des différences, significatives à très largement significatives, existent, pour les cinq paramètres considérés, en fonction des teneurs en caféine du milieu. Les chiffres se rapportant à la longueur des racines, et par suite à la longueur totale, montrent une hétérogénéité plus élevée. La croissance et le développement sont **entièrement inhibés** pour des concentrations en caféine de 1.10^{-2} .

Par suite de sa croissance plus faible, les différences sont moins significatives pour le caféier Robusta. Cette expérience ne permet pas de fixer sûrement le seuil d'inhibition pour cette variété, bien que les chiffres de mesures décroissent lorsque la dose de caféine croît de 0 à 1.10^{-2} . Toutefois, un épaissement de l'embryon développé intervient pour 1.10^{-4} , puisque la longueur diminue alors que le poids reste constant. Si l'on se base sur le poids frais, l'inhibition débiterait vers 1.10^{-4} .

Par contre, une diminution significative de la longueur des racines, de la longueur totale et du poids frais intervient entre 1.10^{-6} et 1.10^{-4} pour le caféier Excelsa utilisé (Planche, C-D-E-F). Si l'on tient compte de la première expérience, l'action inhibitrice de la caféine débiterait entre 5.10^{-5} et 1.10^{-4} .

Cette inhibition, significative pour les cinq paramètres retenus, se situe **au-dessus de 1.10^{-4}** pour le *C. neo-arnoldiana* dont nous disposons (Planche, G).

Ces constatations doivent être rapprochées des teneurs en caféine (tableau V) des graines de ces deux races de la même espèce. Même pour des graines à forte teneur en caféine, comme celles du *C. robusta* de cette expérience, la limite supérieure de résistance aux effets toxiques de la base purique se place avant 1.10^{-2} ; le seuil de sensibilité, au

TABLEAU VI

Action de la caféine sur la croissance et le développement des embryons de trois variétés de caféiers
 (* = significatif à P = 0,95 ; ** = significatif à P = 0,99 ; *** = significatif à P = 0,999)

Variétés	Caféine dans le milieu	Longueur racines (mm)	Longueur hypocotyle (mm)	Longueur totale (mm)	Diamètre moyen d'un cotylédon (mm)	Poids frais (mg)
Robusta.....	0	9,0	3,2	14,3	4,7	14,6
	10 ⁻⁶	7,0	2,7	11,6	4,4	14,6
	10 ⁻⁴	2,8	2,7	8,8	3,8	14,2
	10 ⁻²	1,8	1,7	5,1	1,8	3,8
Néo-arnoldiana.	0	5,2	2,4	9,4	4,2	23,1
	10 ⁻⁶	11,0	5,9	18,1	5,1	34,0
	10 ⁻⁴	14,8	6,1	22,9	5,4	34,8
	10 ⁻²	2,3	2,2	6,3	2,0	4,1
Excelsa.....	0	15,3	6,1	23,7	5,2	37,1
	10 ⁻⁶	22,7	6,3	31,6	5,0	47,7
	10 ⁻⁴	5,1	4,9	13,6	4,4	31,0
	10 ⁻²	2,0	2,0	5,7	1,8	4,0
F calculé (8) pour la variation due à la caféine		3,9*	15,2***	4,6**	16,8***	21,8***
F calculé (8) pour la variation due aux variétés		2,1	16,0***	3,0	0,9	16,4***

contraire, peut être abaissé pour les embryons issus de graines à faible teneur en caféine.

Pour trois des quatre cas examinés dans ces deux expériences, une stimulation de la croissance semble se produire pour les faibles concentrations en caféine. Cette stimulation n'est toutefois pas statistiquement significative et la question de son existence réelle reste posée. Elle ne constituerait pas un phénomène biologique inhabituel.

Survie des embryons

Un petit nombre d'embryons poursuivent encore leur croissance tant en milieu liquide (Planche, A :

photographié à 5 mois) qu'en milieu gélosé (Planche, B : photographié à 5 mois) au bout de six mois de culture *in vitro*. Les racines en milieu liquide atteignent près de 20 cm de long et emplissent le tube en s'enroulant sur elles-mêmes ; de même, la masse foliaire butte sur les parois du tube : il conviendrait de transplanter ces embryons dans un autre milieu, la transplantation paraît délicate sur terreau, mais possible en aquiculture *sensu stricto*.

Par contre, un embryon à deux paires de feuilles, extrait de la gélose à cinq mois, planté sur terreau stérilisé, arrosé à l'eau distillée, a fourni en trois semaines une nouvelle paire de feuilles et nous continuons d'observer sa croissance.

CONCLUSIONS

La culture *in vitro* d'embryons de caféier à partir de semences à maturité est possible, à condition de procéder à un trempage des graines dans l'eau stérile, après désinfection sous vide partiel et avant extraction aseptique de l'embryon.

Elle peut aussi être réussie à partir de graines immatures, l'extraction de l'embryon étant alors facilitée.

Les graines se rapportant aux espèces et variétés étudiées ici ont présenté des comportements différents en ce qui concerne le développement des

embryons : à deux reprises, des embryons de *C. excelsa* d'origines différentes ont mieux poussé que ceux de *C. robusta*, le *C. neo-arnoldiana* étant intermédiaire.

La croissance obtenue en milieu liquide a été meilleure, mais plus irrégulière qu'en milieu gélosé.

Pour une teneur en caféine du milieu de culture de 1.10⁻² la croissance et le développement des embryons sont totalement inhibés. Une diminution significative de la croissance intervient entre

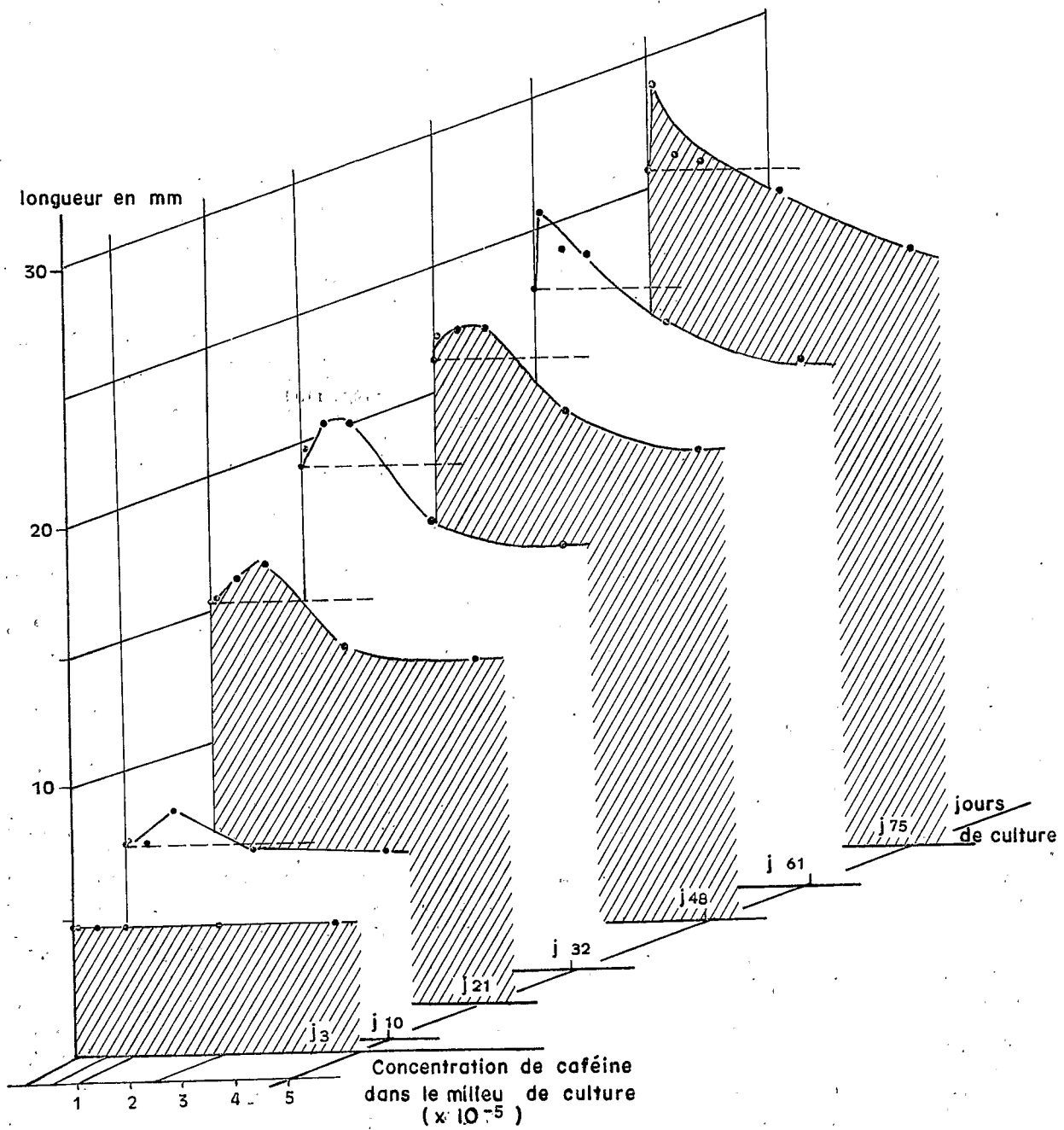


Fig. 1. — Croissance d'embryons de *C. excelsa* dans des milieux contenant de faibles concentrations en caféine (expérience n° 1 : effet « jours » significatif ; effet « traitements » non significatif ; l'effet de la caféine n'apparaît pas de façon significative pour des concentrations inférieures à $5 \cdot 10^{-6}$).

1.10⁻⁶ et 1.10⁻⁴ pour le *C. excelsa* ; elle se situe au-delà de 1.10⁻⁴ pour le *C. neo-arnoldiana* dont nous disposons. Cette différence concernant deux races d'une même espèce doit vraisemblablement être rapprochée du fait que les graines du *C. neo-arnoldiana* (A 14) contiennent plus de caféine que celles du *C. excelsa* (n° 859).

Ces expériences posent le problème de savoir si aux faibles concentrations la caféine ne pourrait avoir un effet de stimulation sur la croissance des embryons.

Les conditions de la survie des embryons et de leur transplantation sur terreau puis en pleine terre sont à l'étude.

BIBLIOGRAPHIE

1. COSTE (R.). — « Les caféiers et les cafés dans le monde », Larose éd., Paris, 1955, 1959, 1961.
2. BOREL (E.). — Rapport de la Station de Tuyên Quanz, Saïgon, 1947.
3. DUFOURNET (R.). — *Bull. Agr. Madagascar*, n° 9, 1949, p. 7.
4. THOMAS (A. E.). — *East Afr. Agric. J.*, 1937, p. 147.
5. BACCHI (O.). — *Bragantia* (Campinas), vol. 14, n° 22, 1955, p. 225.
6. GENKEL (P. A.), CHZHOO SHI-SJUI. — *Fiziol. Rasten.*, SSR, n° 4, 1958, p. 305.
7. RABÉCHAULT (H.), CAMBRONY (H.). — *Cahiers ORSTOM, Physiologie des Plantes Tropicales Cultivées*, I, 1, 1964, p. 7.
8. COLONNA (J. P.). — *Acad. Sci.*, Paris, 269, Série D, 1969, p. 1770.
9. COLONNA (J. P.), CAS (G.), RABÉCHAULT (H.). — *Acad. Sci.*, Paris, 272, Série D, 1971, p. 60.
10. CHEVALIER (A.). — *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 210, 1940, p. 440.
11. CHEVALIER (A.). — *R. B. A.*, Paris, XX, n° 224, 1940, p. 229.
12. CHEVALIER (A.). — « Les caféiers du globe », P. Lechevalier éd., Paris, 1942.
13. HELLER (R.). — *Ann. Sc. Nat.* 11^e série, Bot. et Biol. Vég., 14, 1953, p. 1.
14. KUM TATT (L.). — *Analyst*, 86, 1961, p. 825.
15. DIXON (W. J.), MASSEY (F. J. Jr.). — « Introduction to statistical analysis », Mc Graw-Hill Book Company, Inc., New York (Table A 16, p. 436)

COLONNA (J. P.). — **Contribution à l'étude de la culture *in vitro* d'embryons de caféiers. Action de la caféine.** *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XVI, n° 3, juil.-sept. 1972, p. 193-203, fig., tabl., réf.

COLONNA (J. P.). — **Contribution to the study of the *in vitro* cultivation of coffee tree embryos. Action of caffeine.** *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XVI, n° 3, juil.-sept. 1972, p. 193-203, fig., tabl., réf.

La perte rapide du pouvoir germinatif des semences est fréquente chez diverses espèces et variétés du genre *Coffea* ; l'auteur présente ici des méthodes de culture *in vitro* d'embryons qui permettraient de mieux connaître l'ensemble du phénomène.

The rapid loss of germinating power of seeds is frequent in various species and varieties of the genus *Coffea* ; the author presents methods, in this paper, for the *in vitro* cultivation of embryos which might lead to a better knowledge of the phenomenon.

Le matériel utilisé (provenant de RCA ou de Madagascar) est *C. canephora* s. var. *robusta*, *C. dewevrei* race *C. excelsa* et *C. d.* race *neo-arnoldiana*.

The material used (originating from RCA or Madagascar) was *C. canephora* s. var. *robusta*, *C. dewevrei* race *C. excelsa* and *C. d.* race *neo-arnoldiana*.

La culture *in vitro* d'embryons de caféiers à partir de semences à maturité nécessite un trempage des graines dans l'eau stérile, après désinfection sous vide partiel et avant extraction aseptique de l'embryon. Le trempage est inutile lorsqu'on utilise des graines immatures qui donnent aussi de bons résultats.

The *in vitro* cultivation of coffee tree embryos from matured seeds required the soaking of the seed in sterile water, after disinfection under partial vacuum and after aseptic extraction of the embryo. It is not worth while soaking when using immature seeds which give also good results.

Sur milieu gélosé, l'embryon de *C. e.* croît plus vite que celui de *C. r.* ; *C. n.-a.* occupe une position intermédiaire. *C. e.* garde son pouvoir germinatif plus longtemps que *C. r.*

The embryo of *C. e.* in agar medium grew more rapidly than that of *C. r.* ; *C. n.-a.* occupied an intermediate position. *C. e.* maintained its germinating power for a longer period of time than *C. r.*

La croissance obtenue en milieu liquide est meilleure mais plus irrégulière qu'en milieu gélosé, ce dernier milieu est donc utilisé pour étudier l'action de la caféine sur la germination de l'embryon.

The growth obtained in liquid medium was better but more irregular than in agar medium, and therefore, this latter medium was used to study the action of caffeine on the germination of the embryo.

La germination de l'embryon est totalement inhibée pour des teneurs en caféine du milieu de l'ordre de 1.10⁻². Les seuils d'inhibition de la germination par la caféine varient en fonction de la variété et semblent dépendre de la teneur en caféine des graines. Le seuil de sensibilité est abaissé pour des embryons issus de graines à faible teneur en caféine.

The germination of the embryo is fully inhibited when the caffeine content of the growth medium is about 1.10⁻².

The germination inhibition thresholds of caffeine vary as a function of the variety and seem to depend on the caffeine content of the seeds. The sensitivity threshold was lowered for embryos originating from seeds with a low caffeine content.

COLONNA (J. P.). — **Beitrag zum Studium der Kultur in vitro der Embryonen von Kaffeepflanzlingen. Wirkung des Koffeins.** *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XVI, n° 3, juil.-sept. 1972, p. 193-203, fig., tabl., réf.

Der schnelle Schwund der Keimfähigkeit des Samens kommt bei verschiedenen Arten und Sorten der Gattung *Coffea* häufig vor ; der Autor legt im vorliegenden Artikel Methoden der Kultur *in vitro* von Embryonen dar, welche dazu führen sollen die gesamte Erscheinung besser zu verstehen.

Das aus der RCA und Madagaskar herkommende verwendete Material besteht aus *C. canephora* s. var. *robusta*, *C. deweyrei* Rasse *C. excelsa* und *C. d.* Rasse *neo-arnoldiana*.

Die Kultur *in vitro* der Embryonen von Kaffeepflanzlingen auf der Grundlage von reifen Samen macht ein Einweichen der Samen in sterilem Wasser nach Beizung unter Teilvakuum und vor aseptischer Extraktion notwendig. Ein Einweichen ist unnötig wenn unreife Samen die auch gute Ergebnisse geben verwendet werden.

Auf Agarnährboden wächst der Embryo von *C. e.* schneller als der von *C. r.* ; *C. n.-a.* hält eine Zwischenstellung inne. *C. e.* bewahrt seine Keimfähigkeit länger als *C. r.*

Das Wachstum auf flüssigem Nährboden ist besser jedoch unregelmässiger als auf Agarnährboden ; dieser wird daher zur Prüfung der Wirkung des Koffeins auf die Keimung des Embryos benutzt.

Die Keimung des Embryos ist gänzlich inhibiert wenn die Koffeingehalte des Nährbodens ungefähr $1 \cdot 10^{-2}$ sind.

Die Inhibierungsschwellen der Keimung durch Koffein variieren in Abhängigkeit von der Sorte und scheinen vom Koffeingehalt abzuhängen. Für Embryonen aus Samen mit geringem Koffeingehalt wird die Empfindlichkeitsschwelle gesenkt.

COLONNA (J. P.). — **Contribución al estudio del cultivo in vitro de embriones de cafés. Acción de la cafeína.** *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XVI, n° 3, juil.-sept. 1972, p. 193-203, fig., tabl., réf.

La pérdida rápida del poder germinativo de las simientes es frecuente en varias especies y variedades del género *Coffea* ; el autor presenta unos métodos de cultivo *in vitro* de embriones que darían un mejor conocimiento del entero fenómeno.

El material usado (procedente de la República Centroafricana o de Madagascar) está *C. canephora* s. var. *robusta*, *C. deweyrei* raza *C. excelsa* y *C. d.* raza *neo-arnoldiana*.

Para el cultivo *in vitro* de embriones de cafés procedentes de simientes maduras es preciso remojar los granos en agua estéril, después de desinfectarlos en vacío parcial y antes de extracción aséptica del embrión. Cuando se utiliza granos que no son maduros, no es necesario remojarlos ; dan también buenos resultados.

En medio gelosado, el embrión de *C. e.* crece más rápidamente que el de *C. r.* ; *C. n.-a.* está entre los dos y *C. e.* conserva su poder germinativo más tiempo que *C. r.*

En medio líquido se obtiene un crecimiento mejor pero más irregular que en medio gelosado ; por eso úsase el último para estudiar la acción de la cafeína sobre la germinación del embrión.

La germinación del embrión está completamente inhibida cuando el medio de cultivo contiene $1 \cdot 10^{-2}$ de cafeína.

Los puntos incipientes de inhibición de la germinación por la cafeína varían en función de la variedad y parecen depender del contenido de cafeína de los granos. El punto incipiente de susceptibilidad es más bajo para los embriones procedentes de granos con reducido contenido de cafeína.