

ÉTUDE CYTOGÉNÉTIQUE D'UN HAPLOÏDE DE *COFFEA ARABICA* L.

J. BERTHAUD *

Chargé de recherches ORSTOM

Opération conjointe ORSTOM-IFCC

Le genre *Coffea* est un complexe multispécifique constitué d'un ensemble d'espèces à $2n = 22$ chromosomes et d'une espèce occupant une situation originale : *C. arabica* L. à $2n = 44$ chromosomes. Cette espèce est donc isolée des autres par une barrière due au niveau de ploïdie. La réalisation d'hybrides interspécifiques fertiles entre *C. arabica* et les *Coffea* diploïdes n'est possible que par la manipulation des nombres chromosomiques : obtention de *C. canephora* Pierre autotétraploïdes $2n = 4x = 44$ chromosomes, puis croisement par *C. arabica* ou croisement de *C. canephora* par *C. arabica* suivi du doublement chromosomique des hybrides triploïdes obtenus. Une troisième voie qui pourrait être envisagée serait l'obtention d'haploïdes de *C. arabica* ($n = 22$) permettant la réalisation d'hybrides à $2n = 22$ chromosomes avec les autres espèces. L'étude présentée ici rend compte du comportement méiotique et de la fertilité d'un haploïde de *C. arabica* pour connaître les chances de réussite des croisements utilisant ce type de matériel et donc les possibilités d'échanges génétiques entre *C. arabica* et les espèces diploïdes dans une telle combinaison.

Les haploïdes de *C. arabica* sont connus depuis longtemps, mais rares sont ceux qui ont été analysés du point de vue de la méiose et de la fertilité (Mendes et Bacchi 1940, Vishveshwara 1960). Les appariements observés (jusqu'à six bivalents par cellule) montrent qu'il existe une certaine homologie entre les chromosomes ; les auteurs ont donc proposé une structure de type allopolyploïde pour l'espèce *C. arabica*. Alors que les haploïdes précé-

demment analysés proviennent de variétés cultivées, l'haploïde étudié ici a été obtenu dans la descendance de deuxième génération de plantes prospectées dans l'aire d'origine de l'espèce, en Éthiopie.



Photo 1. — *C. arabica* ($n = 22$)
au Tonkouï, deux ans après la plantation

* Adresse actuelle : Station ORSTOM, B.P. 434, Man, Côte d'Ivoire.

19 AOÛT 1976

O. R. S. T. O. M.

Collection de Référence

M n° 8279 Biochimie

Le matériel végétal

A partir d'un semis de 2.850 graines provenant de la fécondation libre d'un arbre de l'origine éthiopienne n° 39 (prospection Guillaumet et Hallé, 1966), on a obtenu une plante à phénotype particulier correspondant aux descriptions d'haploïdes de *C. arabica* faites par Carvalho (1952) et Vishveshwara (1960). Cette plante était issue d'une graine bi-embryonnée. Après vérification du nombre chromosomique ($n = 22$ chromosomes), cet arbre a été planté au Mont Tonkoui à Man (Côte d'Ivoire), à 1.100 m d'altitude (photo 1). La deuxième plante provenant de la même graine possède un nombre chromosomique de $2n = 44$ et a été installée dans les mêmes conditions (photo 2).

Cet haploïde a été obtenu en septembre 1971 et les premières floraisons ont commencé en janvier 1975.

Il se caractérise par des rameaux plus fins, des feuilles plus étroites et une densité stomatique plus élevée que chez son frère jumeau à $2n = 44$ chromosomes (tableau I ; photo 3).

TABLEAU I

Caractéristiques foliaires comparées chez le couple *C. arabica* n° 39 à $n = 22$ et $2n = 44$ chromosomes

Caractères	$n = 22$	$2n = 44$
Longueur moyenne (mm)	124 \pm 2 (*)	147 \pm 4
Largeur moyenne (mm)	35 \pm 1	59 \pm 2
Rapport diamétral L/l.	3,6 \pm 0,1	2,5 \pm 0,1
Nombre de stomates par mm ² .	340 \pm 10	207 \pm 6

(*) Ecart-type de la distribution des moyennes.

Techniques

La méiose se déroulant entre 52 et 64 h après l'induction florale, les prélèvements de boutons floraux ont été échelonnés entre ces deux limites.

Les techniques de fixation des boutons floraux et de coloration des cellules-mères du pollen (CMP) sont identiques à celles utilisées par Kammacher et Capot (1972).

La viabilité pollinique a été estimée par comptage des grains de pollen colorés au carmin acétique.



Photo 2. — *C. arabica* ($2n = 44$) n° 39 au Tonkoui, deux ans après la plantation

Résultats

Après une simple dispersion des CMP, on peut observer dès les premiers stades de la prophase I des ponts cytoplasmiques entre ces cellules. Dans certains cas les échanges de matériel chromosomique sont visibles ; par exemple dans un groupe de dix-neuf cellules, onze étaient liées par sept ponts cytoplasmiques ; un transfert de chromosomes a pu être noté en association avec trois de ces sept ponts. Cette cytomixie a déjà été signalée chez plusieurs espèces et hybrides interspécifiques de *Coffea* (Louarn, communication personnelle), mais aussi chez d'autres arbres fruitiers comme les *Prunus* (Salesses, 1970).

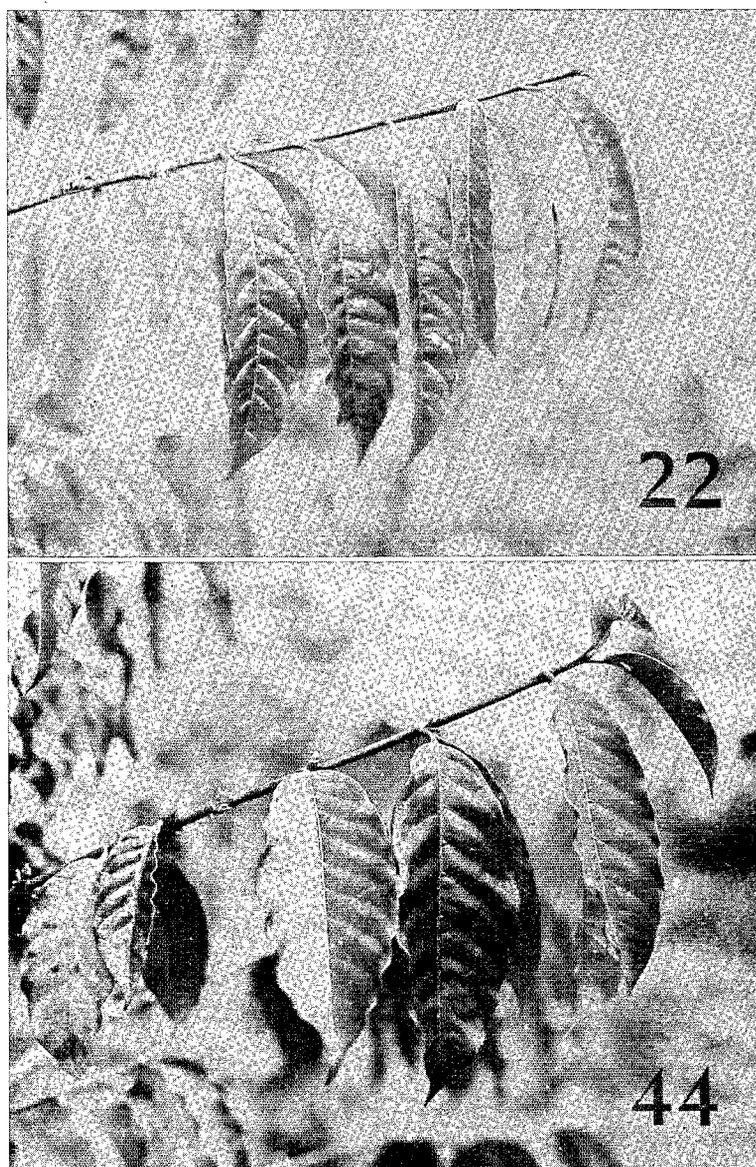


Photo 3. — Rameaux plagiotropes de *C. arabica*
 $n = 22$ et $2n = 44$

Etude de la méiose

En métaphase I, on observe un nombre élevé de cellules-mères aneuploïdes. Sur un ensemble de cinquante-neuf cellules, nous en avons relevé onze de ce type, soit environ 19 % (tableau II). Cette anomalie peut certainement s'expliquer par les phénomènes de cytomixie décrits précédemment.

TABLEAU II

Nombres chromosomiques observés en métaphase I					
Nombres chromosomiques	20	21	22	23	24
Nombre de cellules observées..	3	2	48	5	1

TABLEAU III

Appariements observés en métaphase I

Nombre de bivalents par CMP		2	3	4	5	6	7	8
Nombre de cellules	63	3	10	19	15	11	4	1
Fréquence	1,00	0,05	0,16	0,30	0,24	0,18	0,06	0,01

L'analyse des appariements porte sur soixante-trois cellules à 22 chromosomes. Dans ces cellules, le nombre de bivalents varie de deux à huit, les cellules à quatre bivalents étant les plus nombreuses (tableau III).

On a donc la formule méiotique suivante :

$$13,0 I + 4,5 II.$$

La répartition des chromosomes entre les deux pôles à l'anaphase I est généralement inégale. A ce stade, de nombreux univalents restent au niveau de la plaque équatoriale ; certains se clivent précocement.

De nombreux trainards apparaissent en anaphase 2 et perturbent la répartition chromosomique. En télophase 2, on observe dans certaines cellules jusqu'à sept et même dix amas chromosomiques.

Fertilité

Les tests de viabilité pollinique montrent que la proportion des grains viables est comprise entre 1‰ et 2 % selon les fleurs observées. Les grains viables ont un diamètre moyen de 35 µm, dimension identique à celles des grains de pollen de *C. arabica*, tandis que les autres grains ont une dimension de 25 µm. Les gamétophytes mâles fonctionnels renferment donc vraisemblablement des gamètes non réduits.

En 1975, l'arbre a produit trois fruits en fécondation libre dans un environnement pollinique de *C. arabica*. Les graines étaient de type « caracoli ». Une des graines n'avait pas d'embryon. La deuxième a germé très lentement et la troisième a donné une plantule dont le nombre chromosomique était $2n = 44$.

Discussion-Conclusion

La méiose de cet haploïde est très irrégulière. Pratiquement toutes les causes de dysfonctionnement sont réunies : cytomixie entraînant l'aneuploidie, non-appariement chromosomique entraînant une répartition irrégulière et un clivage précoce des chromosomes en anaphase I.

Une certaine homologie entre les chromosomes est à noter, puisqu'il a été possible d'observer jusqu'à huit bivalents par cellule. Les résultats obtenus confirment les études précédentes et sont compatibles avec une structure de type allopolyploïde de l'espèce *C. arabica*. La fréquence des appariements semble tout de même plus élevée chez l'haploïde étudié qui, rappelons le, provient d'une plante issue de l'aire d'origine. En métaphase I, 25 % des cellules présentent six bivalents ou plus, alors que chez l'haploïde de la variété « Kent », seulement 4 % des cellules avaient six bivalents (Vishvesh-wara). S'agit-il d'un effet dû à l'échantillonnage ou au contraire d'une différenciation moindre des chromosomes chez les plantes de l'aire d'origine que chez les plantes des variétés cultivées et sélectionnées ?

Les réductions d'association observées en métaphase I et les répartitions irrégulières des chromosomes aux stades suivants de la méiose entraînent une stérilité quasi totale de ce type de plantes. Seuls doivent donc être viables les gamètes non réduits, à nombre chromosomique égal ou peu différent de 22, ce qui concorde avec l'obtention d'une plantule à $2n = 44$ chromosomes.

Ainsi le faible taux d'haploïdisation chez *C. arabica* et la stérilité des haploïdes obtenus paraissent des arguments suffisants pour admettre que les échanges génétiques entre espèces à 22 chromosomes et *C. arabica* à $2n = 44$ chromosomes ne se produisent probablement pas au niveau $2n = 22$ chromosomes.

BIBLIOGRAPHIE

CARVALHO (A.), 1952. — Taxonomia de *Coffea arabica* L. : VI. Caracteres morfológicos dos haploides. *Bragantia* (São Paulo), XII, 4-6, p. 201-212.

KAMMACHER (P.), CAPOT (J.), 1972. — Sur les relations Caryologiques entre *Coffea arabica* et *C. canephora*. *Café Cacao Thé* (Paris), XVI, 4, p. 289-294.

MENDES (A. J. T.), BACCHI (O.), 1940. — Observações citológicas em *Coffea*. V. Uma variedade haploide (diha-

ploide) de *C. arabica* L. *Inst. Agron. Campinas, Bol. tec.* 77, 26 p.

SALESSES (G.), 1970. — Sur le phénomène de cytotoxicité chez des hybrides triploïdes de prunier. Conséquences génétiques possibles. *Ann. Amélior. Plantes* (Paris), 20 (4), p. 383-388.

VISHVESHWARA (S.), 1960. — Occurrence of a haploid in *Coffea arabica* L. cultivar « Kents ». *Indian Coffee* (Bangalore), 24, p. 123-124.

BERTHAUD (J.). — Etude cytogénétique d'un haploïde de *Coffea arabica* L. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XX, n° 2, avr.-juin 1976, p. 91-96, tabl., photos, réf.

Afin de connaître les possibilités d'échanges génétiques entre *Coffea arabica* et les espèces de caféiers diploïdes, l'auteur étudie le comportement méiotique et la fertilité d'un haploïde de *C. arabica* obtenu dans la descendance de deuxième génération de plantes prospectées en Ethiopie, aire d'origine de l'espèce.

Ce caféier Arabica haploïde a été planté à Man, en Côte d'Ivoire, à 1.100 m d'altitude et présente des rameaux plus fins, des feuilles plus étroites et une densité stomatique plus élevée que son frère jumeau à $2n = 44$ chromosomes provenant de la même graine.

La méiose chez les boutons floraux, étudiée entre 52 et 64 h après l'induction florale, révèle : en métaphase I, la présence de 19 % de cellules mères aneuploïdes dues à des phénomènes de cytotoxicité et un nombre de bivalents dans les cellules à 22 chromosomes variant de deux à huit (les cellules à quatre bivalents sont les plus nombreuses) ; en anaphase I, d'une part un non-appariement chromosomique entraînant une répartition irrégulière entre les deux pôles et d'autre part un clivage précoce des chromosomes ; en télophase 2, la présence de sept et même de dix amas chromosomiques.

La proportion de grains de pollen viables est comprise entre 1 ‰ et 2 %, ce qui correspond à une stérilité presque totale.

BERTHAUD (J.). — Cytogenetic study of a *Coffea arabica* L. haploid. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XX, n° 2, avr.-juin 1976, p. 91-96, tabl., photos, réf.

In order to gain knowledge of the possibilities of genetic exchange between *Coffea arabica* and species of diploid coffee trees, the author studied the meiotic behaviour and fertility of a *C. arabica* haploid obtained in the second generation progeny of plants prospected in Ethiopia, the area of origin of the species.

This haploid Arabica coffee tree was planted in Man, in the Ivory Coast, at an altitude of 1,100 m and has thinner twigs, narrower leaves and a higher stomatic density than its twin brother with $2n = 44$ chromosomes originating from the same seed.

The meiosis in flower buds, studied from 52 to 64 h after floral induction, shows : in metaphase I, the presence of 19 % of aneuploid mother cells due to cytotoxicity phenomena and a number of bivalents in the cells with 22 chromosomes ranging from two to eight (the cells with four bivalents were the most numerous) ; in anaphase I, on the one hand, a chromosomal non-pairing leading to an irregular distribution between the two poles and, on the other hand, a precocious cleavage of the chromosomes ; in telophase 2, the presence of seven and even ten chromosomal accumulations.

The proportion of viable pollen seeds ranged from 1 ‰ to 2 % which corresponds to almost total sterility.

BERTHAUD (J.). — Cytogenetische Untersuchung eines *Coffea arabica* L. Haploids. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XX, n° 2, avr.-juin 1976, p. 91-96, tabl., photos, réf.

Zur Kenntnis der Möglichkeiten genetischer Austausch zwischen *Coffea arabica* und diploide Kaffeebaumarten untersucht der Autor das Verhalten der Meiose und die Fruchtbarkeit eines *Coffea arabica* Haploids, der aus der Enkelgeneration von Pflanzen hervorging, die in Äthiopien, der Heimat dieser Art, genau untersucht wurden.

Dieser Haploide des Kaffeebaums Arabica wurde in Man, in der Elfenbeinküste in 1.100 m Höhe gepflanzt und weist feinere Zweige, schmälere Blätter und eine grössere Dichte der Stomaten auf als sein Zwillingsbruder von $2n = 44$ Chromosomen der aus dem selben Samenkorn stammt.

BERTHAUD (J.). — Estudio citogenético de un haploïde de *Coffea arabica* L. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XX, n° 2, avr.-juin 1976, p. 91-96, tabl., photos, réf.

Con objeto de conocer las posibilidades de intercambios genéticos entre *Coffea arabica* y las especies de cafetos diploides, el autor ha procedido al estudio del comportamiento meiótico y de la fertilidad de un haploïde de *C. arabica* obtenido en la descendencia de segunda generación de plantas prospectadas en Etiopía, área de origen de tal especie.

Este cafeto Arabica haploïde ha sido plantado en Man, en Costa de Marfil, a 1.100 m de altitud y presenta ramas más finas, hojas más estrechas y una densidad estomática más elevada que su hermano gemelo de $2n = 44$ cromosomas procedente de la misma semilla.

Die bei den Blütenknospen zwischen 52 und 64 Stunden nach der Blütenauslösung geprüfte Meiose zeigt : in der Metaphase I die Anwesenheit von 19 % aneuploiden Mutterzellen die durch Cytomixie-Erscheinungen hervorgerufen sind und eine Zahl von Bivalenten in den Zellen mit 22 Chromosomen die zwischen zwei und acht schwankt (die Zellen mit vier Bivalenten sind am zahlreichsten) ; in Anaphase 1 einerseits eine chromosomische Nicht-Paarung die eine unregelmässige Paarung zwischen den beiden Polen zur Folge hat und andererseits eine frühzeitige Spaltung der Chromosome ; in Telophase 2, die Anwesenheit von sieben und sogar zehn Chromosomenansammlungen.

Das Verhältnis der lebensfähigen Pollenkörner liegt zwischen 1 ‰ und 2 ‰, was einer fast totalen Sterilität gleichkommt.

La meiosis de los botones florales, estudiada entre 52 y 64 h después de la inducción floral, revela : en metafase I, la presencia de un 19 % de células madres aneuploides debidas a fenómenos de citomixia y un número de bivalentes en las células de 22 cromosomas que varía de dos a ocho (las células de cuatro bivalentes son las más numerosas) ; en anafase 1, en primer lugar, una falta de apareamiento cromosómico que acarrea una distribución irregular entre los dos polos y, en segundo lugar, una fisión precoz de los cromosomas ; en telofase 2, la presencia de siete e incluso diez conglomeraciones cromosómicas.

La proporción de los granos de polen viables queda comprendida entre un 1 ‰ y un 2 ‰, lo cual corresponde a una esterilidad casi total.