

ASIC

**Association Scientifique
Internationale du Café**

Volume I

**QUINZIÈME COLLOQUE SCIENTIFIQUE
INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ
Montpellier, 6-11 juin 1993**

1993-1994

1993-1994

1993-1994

1993-1994

QUINZIÈME COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ Montpellier, 6-11 juin 1993

Volume I

Liste des participants 11

Allocution d'ouverture 19

Communications

Biotechnologie

Polymorphisme biochimique et moléculaire

- Variations in the total nuclear DNA content in African *Coffea* species (*Rubiaceae*), J. Cros, M. C. Gavalda, N. Chabrilange, C. Récalt, C. Duperray, S. Hamon 23
- Diversité génétique de quelques groupes de caféiers : utilisation des outils moléculaires, RFLP et RAPD, M. Paillard, N. Duchateau, V. Pétiard 33
- Molecular analysis of genetic diversity and phylogenetic relationships in *Coffea*, J. Cros, Ph. Lasherme, Ph. Marmey, F. Anthony, S. Hamon, A. Charrier 41
- Marqueurs biochimiques de la diversité des caféiers, J.-J. R. Rakotomalala, E. Cros, A. Charrier, F. Anthony, M. Noirot 47

Multiplication in vitro

- Biotechnologies appliquées au caféier, V. Pétiard, H. Bollon, J. P. Ducos, B. Florin, M. Paillard, J. Spiral, A. Zamarripa 56
- Cold sensitivity of *in vitro* microcuttings of *Coffea arabica* and *C. canephora* during storage at various temperatures. Evolution of sugar, proline, MDA and ethylene production, F. Engelmann, L. Jouve, N. Chabrilange, S. Dussert, F. Anthony, A. Charrier 67
- Arabica coffee micropropagation through somatic embryogenesis via bioreactors, C. Noriega, M. R. Söndahl 73
- Somatic embryogenesis induced by culture on single media in coffee plants from crosses of *Coffea arabica* by Timor Hybrid, M. E. Aponte Acuña 82
- Production of somatic embryos of coffee in a bioreactor, J. P. Ducos, A. Zamarripa, A. B. Eskes, V. Pétiard 89

- Effets des modifications de la lumière et de la teneur en CO₂ sur la croissance de vitroplants de caféiers Arabica, D. Bieysse, L. Courmac 97
- Conservation à long terme des ressources génétiques de caféier par cryoconservation d'embryons zygotiques et somatiques et de cultures embryogènes, B. Florin, H. Tessereau, V. Pétiard 106

Autres biotechnologies

- Développement d'une méthode de transformation appliquée à différentes espèces de caféier et régénération de plantules transgéniques, J. Spiral, V. Pétiard 115
- *In vitro* selection of *Coffea arabica* callus and cell suspensions for resistance to phytotoxic culture filtrates from *Colletotrichum coffeanum*, N. E. Nyange, R. J. McNicol, B. Williamson, G. D. Lyon 123
- Induction of double haploids on *Coffea arabica* cultivars via anther or isolated microspores culture, M. F. Carneiro (abstract) 133

Biosynthèse des composés par les caféiers

- Interdependence of caffeine and chlorogenic acid (5-CQA) metabolism in coffee, T. W. Baumann, S.-S. Möslé, B. H. Schulthess, R. J. Aerts 134
- Updated review of purine and purine alkaloid metabolism in *Coffea* and *Camellia* plants, G. R. Waller, H. Ashihara, T. Suzuki 141
- Purine metabolism and alkaloid biosynthesis in leaves of *Coffea arabica* L., G. M. Nazario, C. J. Lovatt 155

Agronomie

- Quelles caféicultures pour demain ? R. A. Muller 163
- Hybrid seed productive in Arabica coffee : consequences of isolation techniques in preventing alien pollen contamination, C. O. Agwanda 180
- L'obtention d'une core collection de caféiers. Définition des groupes d'échantillonnage et méthodologie, M. Noirot, S. Hamon, F. Anthony 183
- Estimation de paramètres génétiques chez *Coffea canephora* Pierre, Th. Leroy, C. Montagnon, C. Cilas 191

— Système de reproduction des Arabusta <i>lato sensu</i> et exploitation de leurs descendances pour l'amélioration des caféiers de basse altitude, D. Le Pierrès, A. Yapo	199	naires du Guatemala et du Brésil, F. Anzueto, A. B. Eskes, J. L. Sarah, B. Decazy	338
— Mise en évidence de différents niveaux d'affinité des greffes interspécifiques chez les caféiers, E. Couturon	209	— Observations préliminaires sur la sensibilité d'espèces de <i>Coffea</i> aux attaques de <i>Dysmiococcus cryptus</i> (Hempel, 1918), A. Garcia, B. Decazy, C. Alauzet	350
— On the use of doubled haploids in genetics and breeding of <i>Coffea canephora</i> P., P. Lashermes, A. Charrier, E. Couturon	218	— Le goût de pomme de terre du café Arabica au Burundi, B. Bouyjou, G. Fourny, D. Perreux	357
— Tetraploid interspecific hybrids in coffee breeding in India, M. S. Sreenivasan, A. S. Ram, N. S. Prakash	226	— Traitement des eaux résiduaires d'usines de transformation du café par voie humide. Analyse d'un projet pilote dans la région Xalapa-Coatepec (Mexique), M. Castillo, H. Bailly, P. Violle, P. Pommères, B. Sallée ...	370
— Heterosis and combining ability in coffee (<i>Coffea arabica</i> L.), Bayetta Bellachew, Mesfin Ameha, Dejene Mekonnen	234	— An approach to reduce the time required for bean yield evaluation in coffee breeding, M.d.P. Moncada Botero	380
— Structure génétique des caféiers africains diploïdes basée sur la fertilité des hybrides interspécifiques, J. Louarn	243	— La cooperación técnica francesa en América Central : la experiencia de IICA/PROMECAFÉ, J. J. Osorto	389
— Breeding efforts to improve coffee production in Ghana, Y. Adu-Ampomah, V. A. Martinson, E. Dasi, R. S. Amonoo	253	— Review : development of mechanised coffee production systems in Australia, E. C. Winston, C. P. Norris	397
— Amélioration génétique des caféiers en Papouasie-Nouvelle-Guinée. Historique, stratégie, P. Charmetant, J. M. Kiara, T. Kukhang D.	262		
— Influence des traitements contre la carence en zinc du caféier Arabica sur l'antracnose des fruits (<i>Colletotrichum coffeanum</i> Noack), C. Lambot, L. Gahiro	271		
— Etude de la virulence et de l'agressivité d'isolats d' <i>Hemileia vastatrix</i> Berk. et Br. collectés sur <i>Coffea canephora</i> et Catimor, F. Holguin, D. Bieysse, A. Eskes, R. Muller	281		
— Développement de la rouille orangée (<i>Hemileia vastatrix</i>) dans une plantation du sud-ouest du Guatemala et évaluation des dégâts qu'elle provoque, J. Avelino, J. C. Toledo, B. Medina	293		
— Different pathogenicity of CBD isolates on coffee genotypes, V. M. Varzea, C. J. Rodrigues Jr., E. Medeiros	303		
— Résultats récents sur la résistance de <i>Coffea canephora</i> à la sécheresse, à la rouille orangée et au scolyte des branchettes en Côte-d'Ivoire, C. Montagnon, Th. Leroy	309		
— New physiologic races of <i>Hemileia vastatrix</i> , C. J. Rodrigues Jr., V. M. P. Varzea, I. L. Godinho, S. Palma, R. C. Rato	318		
— Effect of canopies and bearing heads on density and yield of CBD resistant Arabica (<i>Coffea arabica</i> L.), Y. Edjamo, T. Shimber, G. Temesgen, A. Yilma	322		
— L'identification des toxines de <i>Bacillus thuringiensis</i> actives contre <i>Perileucoptera coffeella</i> , O. Guerreiro Filho, P. Denolf, R. Frutos, M. Peferoen, A. B. Eskes	329		
— Résistance de quelques descendances de <i>Coffea arabica</i> et <i>C. canephora</i> vis-à-vis de deux populations de <i>Meloidogyne</i> spp. origi-			



PARTICIPANTS

Allemagne

- BADE-WEGNER H. — Jacobs-Suchard, Abt CRB, Weser-Ems-Strasse 3-5, D-2800 Bremen 44
BOOSFELD J. — Jacobs-Suchard, Abt CRB, Weser-Ems-Strasse 3-5, D-2800 Bremen 44
BRÜNJES M. — C. Melchers & Co., Flughafendamm 9, D-2800 Bremen
CAMMENGA H.K. — Tech. Univ. Braunschweig, Schleinitzstrasse 20, D-3300 Braunschweig
GUENTHER H. — Jacobs-Suchard, Abt CRB, Weser-Ems-Strasse 3-5, D-2800 Bremen 44
HASSELBARTH A. — Jacobs-Suchard, Abt CRB, Weser-Ems-Strasse 3-5, D-2800 Bremen 44
HOLSCHER W. — Jacobs-Suchard, Abt CRB, Weser-Ems-Strasse 3-5, D-2800 Bremen 44
HÜHNE M. — Tchibo, Süderstrasse 293, D-2000 Hamburg 26
KIESSLING R. — GTZ-GATE, Dag-Hammarskjöld Weg 1, 6236 Eschborn
KÖHLER H. — Jacobs-Suchard, Abt CRB, Weser-Ems-Strasse 3-5, D-2800 Bremen 44
KUNKE D. — Dr. Otto Suwelack Nachf., Postfach 1362, D-4425 Billerbeck
LOEHMAR K. — Dereco, Franckstrasse 8, D-7140 Ludwigsburg
LUDWIG E. — Inst. Food Chemistry, Tech. University Dresden, Mommsenstrasse 13, D-8027 Dresden
MAIER H.G. — Inst. F. Lebensmittelchemie, Schleinitzstrasse 20, D-3300 Braunschweig
MEYER H.W. — Handels und Umweltschutz, Lab. Dr. Fintelmann/Meyer, Mendelssohn Str. 15, D-2000 Hamburg 50
MORITZ K. — H. Siedentopf/Eduscho, Lloyd Strasse 4-6, D-2800 Bremen 1
OESTREICH-JANZEN S. — Kord KG, Am Sandtorkai 2, D-2000 Hamburg 11
ROTZOLL F. — Deutscher Kaffee Verband, Pickhuben 3, D-2000 Hamburg
SCHAEFER M.C. — 19 Neltenweg, 6382 Friedrichdorf
SEHAT N. — Havighorster Redder 35, D-22115 Hamburg
SILWAR R. — Georg-Gröning str. 116, D-28209 Bremen
SIPOS S. — Jacobs-Suchard, Weser-Ems-Strasse 3-5, D-2800 Bremen 44
SPEER K. — TU Dresden, Hagendeel 33, D-2000 Hamburg 33
STEINHART H. — Institut Für Lebensmittel Chemie Universität Hamburg, Grindelallee 117, D-2000 Hamburg 13
SUWELACK W. — Dr. Otto Suwelack Nachf., Postfach 1362, D-4425 Billerbeck
VITZTHUM O. — Jacobs-Suchard, Abt CRB, Weser-Ems-Strasse 3-5, D-2800 Bremen 44
WILKENS J. — Tchibo, Süderstrasse 293, D-2000 Hamburg 26
WRAGG A. — Jacobs-Suchard, Abt CRB, Weser-Ems-Strasse 3-5, D-2800 Bremen 44
ZAPP J. — Jacobs-Suchard, Abt CRB, Weser-Ems-Strasse 3-5, D-2800 Bremen 44

Angola

- ALMEIDA M. — Instituto do Café de Angola, CP 6936, Luanda
DÍAS M. — Instituto do Café de Angola, CP 6936, Luanda
FRANCO-AFONSO R. — Instituto do Café de Angola, CP 6936, Luanda

Australie

WHAN J. — Coffee Research Institute, PO Box 150, 3250 Colac

Belgique

DARTHENUQ M. — CCE, 200 rue de la loi, B-1049 Bruxelles
POCHET P. — Université Catholique de Louvain, 4 La Serpentine, B-1348 Louvain La Neuve
VIROUX R. — 5 avenue de la Sauvagine, boîte 71, 1170 Bruxelles

Brésil

BASSOLI D. — Iguazu Café Soluvel, Br 369, KM 88, Rod M. Peixoto, POB 199, 86300 C. Procopio
BRANDO C. — Pinhalense S.A., R. Honorio Soares 80, ES Pinhal SP
DE CASTRO A. — Iguazu Café Soluvel, Br 369, KM 88, Rod M. Peixoto, POB 199, 86300 C. Procopio
OLIVEIRA P.L. — Cacique de Café Soluvel, Av. Tiradentes 5000, 86075 Londrina
RAMOS L. — Institute of Agronomy, Av. Br. Itapura 1481, 13100 Campinas SP
SAMPAIO E. — Kraft General Foods, Rua Santo Arcadio 290, 04707 901 São Paulo
SPAGOLLA F. — MACSOL SA, Via Anhanguera, km 89, 8 CX Postal 733, 13001970 Campinas, SP

Burundi

BITOGA J.P. — ISABU, BP 795, Bujumbura
BOUYJOU B. — ISABU, BP 795, Bujumbura
GAHIRO L. — ISABU, BP 795, Bujumbura
LAMBOT C. — ISABU, BP 795, Bujumbura
SNOECK D. — ISABU, BP 795, Bujumbura

Cameroun

AWEMO N.J. — IRA, BP 2123, Yaoundé
BOCCARA M. — CIRAD-CP, BP 2577, Yaoundé
GATCHOU N. — Ministère de la Recherche, Yaoundé
RIGOUZZO M. — IRA, Nkolbisson, BP 2067, Yaoundé

Centrafrique

MONGOUMA M. — Office réglementation de la commercialisation, Contrôle conditionnement, BP 1039 Bangui

Colombie

CADENA-GOMEZ G. — Cénicafé, Chinchiná, Caldas

Costa-Rica

DUFOUR M. — CATIE, Ap. 11, 7170 Turrialba
NEUENSCHWANDER B. — CATIE, Ap. 143, 7170 Turrialba

Côte d'Ivoire

ASSANVO N. — Samatci, 01 BP 1565, 01 Abidjan
BRA KANON D. — SICPRO, BP 1841, Abidjan
COULIBALY N. — IDEFOR-DCC, 01 BP 1827, Abidjan 01

KOUASSI A. — Caisse de Stabilisation, BP V 132, Abidjan
MPUNGI B. — Organisation Interafricaine Café, BP V 210, Abidjan
YAPO A. — IDEFOR-DCC, BP 808, Divo

Equateur

ALVAREZ M. — Latinreco SA, via Interoceanica 12.5 Km, Casilla Postal 17 11 60 53, Quito

Espagne

GOYENECHEA J.M. — Cafés Gosoa, c/Zorrozgoiti n° 17, 3° Plta, 48013 Bilbao
GUTIERREZ C. — Universidad Politécnica de Valencia Tec. Alimentos, 46021 Valencia
ORTOLA M. — Universidad Politécnica de Valencia Tec. Alimentos, 46021 Valencia

Etats-Unis

BALDWIN G. — Peet's Coffee, 1070 65th st., CA 94608 Emeryville
BARFUSS D. — Westreco Inc., 809 Collins av., Marysville, Ohio 43040
BRUNO D. — Procter & Gamble, 6210 Center Hill Road, Cincinnati, Ohio 45224
CHERVENY L. — Procter & Gamble, 6210 Center Hill Road, Cincinnati, Ohio 45224
COHEN G. — Kraft General Foods, 555 S Broadway, Tarrytown, New York 10591
HEYDEN S. — Duke University Med. Center, PO Box 2914, Durham, NC 27710
HO C.T. — Rutgers University, Dpt of Food Science, PO Box 231, New Brunswick, NJ 08816
HORRELL R. — Procter & Gamble, 6210 Center Hill Road, Cincinnati, Ohio 45224
KRAMER F. — Zuckerman, Kramer Assoc., 111 Great Neck Road, Great Neck, NY 11021
MILLER E. — Baylor College Dentistry, 3302 Gaston avenue, Dallas, Texas 75246
NOS S. — Westreco Inc., 809 Collins avenue, Marysville, Ohio 43040
NOYES M. — Procter & Gamble, 6210 Center Hill Road, Cincinnati, Ohio 45224
SIVAK A. — Harvard School Pub. Health, PO Box 1038, Cambridge, MA 02142
SMALL L. — Procter & Gamble, 6210 Center Hill Road, Cincinnati, Ohio 45224
SONDAHL M. — DNA Plant tech. corp., 2611 Branch Pike, Cinnaminson, New Jersey 08077
WALLER G. — Oklahoma State University, 246 Noble Research Center, Stillwater, 47078 Oklahoma

Ethiopie

BAYETTA BELLACHEW — Institute of Agricultural Research, Jimma Research Centre, PO Box 192, Jimma
EDJAMO Y. — Institute of Agricultural Research, Jimma Research Centre, PO Box 192, Jimma
SHIFERAW A. — Ministry of State Farms, Coffee and Tea Dev., P.O. Box 2594, Addis Ababa
WOELORE W. — Institute of Agricultural Research, Jimma Research Centre, PO Box 192, Jimma

France

ANTHONY F. — ORSTOM, B.P. 5045, 34032 Montpellier Cedex 1
ARNAUD M. — Nestlé France, 17-19 quai Paul Doumer, 92414 Courbevoie
BARRAL M. — CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1
BERTHOULY M. — CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1
BIEYSSE D. — CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1
BLAISET A. — Cafés LA TI-TANE, 17, rue du Gros Horloge, 76000 Rouen
BLAISET J.M. — Cafés LA TI-TANE, 17, rue du Gros Horloge, 76000 Rouen
BLANC J.P. — Comp. Médit. des Cafés Malongo, Z.I. 9e rue, BP 121, 06516 Carros
CALE K. — Kraft General Foods, 13 av. Morane Saulnier, BP 113, 78148 Vélizy-Villacoublay Cedex

CAMBRONY H. — 603, av. du Pont Trinquat, 34000 Montpellier
 CATRISSE B. — CIRAD, 42, rue Scheffer, 75116 Paris
 CAZENAVE P. — SOPAD Nestlé, 17/19, quai Paul Doumer, 92414 Courbevoie
 CHALLOT F. — CIRAD-CP, 12, square Pétrarque, 75116 Paris
 CHARRIER A. — ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1
 CHASSEVENT F. — Alliance 7, 194, rue de Rivoli, 75001 Paris
 CILAS C. — CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1
 COLLOT J. — ASIC, 42 rue Scheffer, 75116 Paris
 COSTE R. — ASIC, 42 rue Scheffer, 75116 Paris
 COUTURON E. — ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1
 CROS E. — CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1
 CROS J. — ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1
 DANON J.L. — Syndicat National du Café, 17, rue de Constantinople, 75008 Paris
 DE LA ROCHE M.-C. — 53, rue de Turenne, 75003 Paris
 DEBRY G. — Centre de Nutrition Humaine, 40 rue Lionnois, 54000 Nancy
 DECAZY B. — CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1
 DELOFFRE J. — Chambre Syndicale des Torréfacteurs de Café de France, 35, rue des Belles Feuilles, 75016 Paris
 DENIS S. — ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1
 DESPIERRES E. — Comité Français du Café, 3 rue de Copenhague, 75008 Paris
 DIEPPE J.P. — Cafés Excella, av. de Thiers, BP 24, 63370 Lempdes
 DOTHEE J.J. — Cafés Excella, av. de Thiers, BP 24, 63370 Lempdes
 DUBLIN P. — 15, rue des Fauvettes, 21121 Fontaine les Dijon
 DUCHOSSOY E. — Comité Français du Café, 23 place des Halles, 76600 Le Havre
 DUCIMETIERE P. — INSERM, Unité 258, Hôpital Broussais, 96, rue Didot, 75674 Paris Cedex 14
 DUCOS J.P. — Francereco S.A., 101 av. Gustave Eiffel, 37390 Notre-Dame-d'Oé
 DURIS D. — CIRAD-CP, 12 square Pétrarque, 75116 Paris
 ENGELMANN F. — ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1
 ESKES A. — CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1
 EVRARD N. — 53, rue de Turenne, 75003 Paris
 FLORIN B. — Francereco S.A., 101 av. Gustave Eiffel, 37390 Notre-Dame-d'Oé
 FRANKEL J.C. — Syndicat National du Café, 17 rue de Constantinople, 75008 Paris
 FRECHET H. — Douwe Egberts France, Z.I. Nord, BP 89, 42162 Andrezieu
 GAIMÉ-PERRAUD I. — ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1
 GENER P. — CIRAD-CP, 12 Square Pétrarque, 75116 Paris
 GONZALES P. — Segafredo Zanetti France, BP 47, 76301 Sotteville
 GOUE P. — Corolle Grayling, 53, rue de Turenne, 75003 Paris
 GOUVERNEUR G. — Syndicat du Commerce des Cafés, 24 route d'Amiens, 80320 Villers-Bretonneux
 GRAVES B. — Kraft General Foods, 13 av. Morane Saulnier, BP 113, 78148 Vélizy-Villacoublay Cedex
 GREZES J. — URA 1442, LTE Univ. Techno. de Compiègne, BP 649, 60200 Compiègne
 GUERREIRO O.F. — CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1
 GUYOT B. — CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1
 HAMON S. — ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1
 HINMAN D. — Kraft General Foods, 13 av. Morane Saulnier, BP 113, 78148 Vélizy-Villacoublay Cedex
 HOLGUIN F. — CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1
 JACQUET L. — Marchés Tropicaux, 190 bld Haussmann, 75008 Paris
 JACQUET M. — CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1
 LASHERMES P. — ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1
 LAVABRE E. — 26, rue de l'Aiguillerie, 34000 Montpellier
 LE PIERRES D. — ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1
 LEROY T. — CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1

LIEGEOIS V. — 53, rue de Turenne, 75003 Paris
 LOPEZ-SARRIA A. — INRA, Lab. Médiateurs Chimiques, Station de Phytopharmacie, route de St Cyr, 78026 Versailles

LOUARN J. — ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1
 MARCADET R. — ASIC, 42, rue Scheffer, 75116 Paris
 MARCHAND P. — Syndicat Cafés Ouest France, 8/10, rue du Massacre, 76000 Rouen
 MARI S. — ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1
 MASSIA P. — Comp. Medit. des Cafés Malongo, Z.I. 9e rue, BP 121, 06516 Carros
 MONTAGNON C. — CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1
 MULLER R.A. — 542, chemin de Bellevue, 34820 Assas
 NEHLIG A. — INSERM, Unité 272, BP 3069, 24/30 rue du Lionnois, 54013 Nancy Cedex
 NOIROT M. — ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1
 NZIE M.-M. — O.A.M. CAF, 27 quai Anatole France, 75007 Paris
 PAILLARD M. — Francereco S.A., 101 avenue Gustave Eiffel, 37390 Notre-Dame-D'Oé
 PERRIOT J.-J. — CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1
 PETIARD V. — Francereco S.A., 101 avenue Gustave Eiffel, 37390 Notre-Dame-D'Oé
 PONS N. — CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1
 RAOUX F. — 53, rue de Turenne, 75003 Paris
 REYMOND D. — Oreal Centre Schueller, 41, rue Martre, 92117 Clichy
 ROULY M. — CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1
 RUYANT B. — Fichaux Industries, 68, rue Scrive, BP 217, 59562 La Madeleine
 SALVAGNAC C. — SOPAD Nestlé, 17/19 Quai Président P. Doumer, 92414 Courbevoie
 SARNIENTO M. — INRA, Lab. Médiateurs Chimiques, Station de Phytopharmacie, route de St Cyr, 78026 Versailles

SPIRAL J. — Francereco S.A., 101 avenue Gustave Eiffel, 37390 Notre-Dame-D'Oé
 STAHL H. — Kraft General Foods, 13 av. Morane Saulnier, BP 113, 78148 Vélizy-Villacoublay Cedex
 TISSIER C. — Chambre Syndicale des Torréfacteurs de Café de France, 35, rue des Belles Feuilles, 75016 Paris

TOUZEAU D. — Douwe Egberts France, Z.I. Nord, BP 89, 42162 Andrezieu
 TRAUMANN S. — Comptoir Cafétier Français, 46, av. du Maréchal Galliéni, 76600 Le Havre
 VAN BOXTEL J. — CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1
 VIGEZZI F. — Corolle Grayling, 53, rue de Turenne 75003 Paris
 VIGY M. — 53, rue de Turenne, 75003 Paris
 WASSERMAN G. — Kraft General Foods, 13 av. Morane Saulnier, BP 113, 78148 Vélizy-Villacoublay Cedex
 WHITMAN P. — Kraft General Foods, 13 av. Morane Saulnier, BP 113, 78148 Vélizy-Villacoublay Cedex
 ZOLTI A. — Afrique Agriculture, 6 rue du Dr. Solomon, 60119 Henonville

Ghana

AMONOO R. — Cocoa Research Institute, PO Box 8, Tafo
 OSEI-BONSU K. — Cocoa Research Institute, PO Box 8, Tafo
 PADI B. — Cocoa Research Institute, PO Box 8, Tafo

Grande-Bretagne

BALYAYA K. — Food Safety Research Group, School of Biological Sciences, Surrey University, GU 25 XH Guildford
 BARTLETT P. — University of Southampton, Dpt of chemistry, SO9 5NH Southampton
 BELTRAO A. — International Coffee Org., 22 Berners street, WIP 4DD Londres
 CHALMERS K. — SCRI, Invergowrie Scotland, DD2 5DA Dundee
 CLARKE R. — Ashby Cottage, Donnington, West Sussex, PO20 7PW Chichester
 CLIFFORD M. — Food Safety Research Group, School of Biological Sciences, Surrey University, GU 25 XH Guildford

- GOODMAN B. — SCRI, Invergowrie Scotland, DD2 5DA Dundee
 HARDING P. — ODA University of Reading, Dpt of Soil Science, London Road, RG1 5AQ Reading
 MACRAE R. — Hull University, Eastwood Beverley Road, Walkington HU178RP Beverley
 NYANGE N. — SCRI, Invergowrie Scotland, DD2 5DA Dundee
 OROZCO CASTILLO C. — SCRI, Invergowrie Scotland, DD2 5DA Dundee
 SMITH A. — University of Wales, School of Psychology, PO Box 901, CF1 3YG Cardiff
 VERBOOM F. — Four Square, Armstrong Road, Basingstoke, Hants RG 24 ONU

Guatemala

- AVELINO J. — IICA/PROMECAFE, 1 ave 8-00 Z9, Ap. 1815, Guatemala City
 CASTRO-MAGANA M. — ANACAFE, Edificio Etisa, Plazuela España, Zona 9, Guatemala City
 GARCIA A. — ANACAFE, Edificio Etisa, Plazuela España, Zona 9, Guatemala City
 OSORTO J.J. — IICA/PROMECAFE, 1 ave 8-00 Z9, Ap. 1815, Guatemala City
 VILLAIN L. — IICA/PROMECAFE, 1 ave 8-00 Z9, Ap. 1815, Guatemala City

Inde

- SREENIVASAN M.S. — Central Coffee Research Inst., Coffee Research Station 577117, Chikmagalur, Karnataka

Indonésie

- HULUPI R. — IRICC, J1 Pb Sudirman 90, Jember 68118
 MAWARDI S. — IRICC, J1 Pb Sudirman 90, Jember 68118
 SUBEKTI S. — Kali Bendo Estate, Hos Cockroaminoto 93, 68432 Banyuwangi

Italie

- ILLY E. — ILLYCAFE SPA, Via Flavia 110, 34147 Trieste
 LERICI C. — Università di Udine, Dpt of Food Science, Via Marangoni 97, 33100 Udine
 MAZZUOCCOLO R. — LAVAZZA SPA, Strada Settimo 410, 10156 Torino
 NICOLI M.C. — Università di Udine, Dpt of Food Science, Via Marangoni 97, 33100 Udine
 PELLEGRINO G. — LAVAZZA SPA, Strada Settimo 410, 10156 Torino
 PETRACCO M. — ILLYCAFE SPA, Via Flavia 110, 34147 Trieste
 PINNAVAIA G. — Università di Bologna, Via San Giacomo 7, 40126 Bologna
 SCACCINI C. — Inst. Nazionale Della Nutrizione, Via Ardeatina 546, 00178 Roma
 SEVERINI C. — Università di Bologna, Via San Giacomo 7, 40126 Bologna
 SUGGI LIVERANI F. — ILLYCAFE SPA, Via Flavia 110, 34147 Trieste
 VANNI A. — LAVAZZA SPA, Strada Settimo 410, 10156 Torino

Japon

- ASHIHARA H. — Ochanomizu University, 2-1-1 Otsuka Bunkyo Ku, Tokyo 112
 HAYASHIDA M. — Kyodosenden Advertising, 333 Akasaka Minato Ku, 107 Tokyo
 HOMMA S. — Dpt Nutrition & Food Science, Ochanomizu University, Otsuka Bunkyo Ku, 112 Tokyo
 HONDA Y. — UCC UESHIMA Coffee, 52-2 Jingumae 5-chome, Shibuya-Ku, Tokyo 150
 ICHIYANAGI S. — Ajinomoto General Foods, 6410 Minamitamagaki Suzuka Mie, 513 Suzuka
 KIMURA T. — Kyodosenden Advertising, 333 Akasaka Minato Ku, 107 Tokyo
 MORITA J. — Kyodosenden Advertising, 333 Akasaka Minato Ku, 107 Tokyo
 OHTANI N. — Morinaga Milk Industry, 1 83 5 Chome Higashihara Zama Shi, 228 Kanagawa
 TAKAHASHI M. — Morinaga Engineering, 13 2 4 Chome Shiba Minato Ku, 108 Tokyo
 TAMURA Y. — Morinaga Milk Industry, 1 83 5 Chome Higashihara Zama Shi, 228 Kanagawa
 UESHIMA T. — All Japan Coffee Association, 17-15 Nishi Shimbashi 1 Chome Minato Ku, 105 Tokyo

Kenya

AGWANDA C. — Coffee Research Foundation, P.O. Box 4, Ruiru
GUARINO L. — IBPGR c/o ILRAD, PO Box 30709, Nairobi
NJOROGI J. — Coffee Research Foundation, P.O. Box 4, Ruiru

Laos

CHOULAMOUNTRI K. — Ministère de l'Agriculture, Vientiane

Madagascar

RAKOTOMALALA J.J.R. — DRAE-FOFIFA, BP 1444, (101) Antananarivo

Mexique

ZAMARRIPA A. — INIFAP, Rozario Izapa, Tapachula

Nicaragua

DUFOUR B. — IICA, Ap. 4830, Managua
VALDEZ-RODRIGUEZ J. — CONCAFE, Contiguo a Konifoto Colon Ia, Managua

Nouvelle-Calédonie

LAMOUREUX N. — ORSTOM, BP A5, Nouméa
MATHIEU F. — ORSTOM, BP A5, Nouméa

Ouganda

BIRIKUNZIRA J. — F S S P, PO Box 452, Entebbe
HAKIZA G. — F S S P, PO Box 452, Entebbe
KARUGAHE K. — Coffee Marketing Board, PO Box 7154, Kampala
SEMAKULA R. — F S S P, PO Box 452, Entebbe

Papouasie-Nouvelle-Guinée

CHARMETANT P. — CRI, Coffee Research Institute, PO Box 105, Kainantu E.H.P.
FREYNE D. — CRI, Coffee Research Institute, PO Box 105, Kainantu E.H.P.
KUKHANG T. — CRI, Coffee Research Institute, PO Box 105, Kainantu E.H.P.

Pays-Bas

ABE A.Y. — c/o CTA, Post bus 380, 6700 Wageningen
KIPOKOLA T. — c/o CTA, Post bus 380, 6700 Wageningen
OPILE W. — c/o CTA, Post bus 380, 6700 Wageningen
VUGAYABAGABO A. — c/o CTA, Post bus 380, 6700 Wageningen

Porto-Rico

NAZARIO G. — University of Puerto-Rico, San Tomas 143 El Pilar, Rio Piedras, 00926

Portugal

- CARNEIRO M. — Centro Inv. Ferrugens Cafeeiro, Quinta Do Marquês, 2780 Oeiras
GUEDES M.E. — Centro Inv. Ferrugens Cafeeiro, Quinta Do Marquês, 2780 Oeiras
RODRIGUES C. — Centro Inv. Ferrugens Cafeeiro, Quinta Do Marquês, 2780 Oeiras

Salvador

- RAMENTOL
IMBERTON A. — Productos de Café SA DEC.V., 55, Av. Sur, Centro Roosevelt Edificio « C » n° 21, San Salvador

São Tomé et Príncipe

- AGUILAR P. — CIRAD-CP, Projet Poto, CP 375, São Tomé

Suisse

- BADOUD R. — Nestec, Centre de Recherche Nestlé, CH-1000 Lausanne
BAETTIG K. — Swiss Fed. Inst. Techno., Turner str., Eth - Zentrum, 8092 Zurich
BAUMANN T. — University of Zurich, Inst. of Plant Biology, Zollikerstr. 107, 8008 Zurich
BLANC M. — Nestec SA, Laboratoire Industriel LINOR, 1350 Orbe
CLARK B. — Nestec SA, avenue Nestlé 55, 1800 Vevey
GRETSCH C. — Nestec Linor SA, Centre Dév. Alimentaire, 1350 Orbe
HASENFRATZ M. — Swiss Fed. Inst. Techno., Turner str., Eth - Zentrum, 8092 Zurich
HUGGETT A. — Nestlé Research Center, P.O. Box 44, Vers-Chez-Les-Blanc, 1000 Lausanne
LIARDON P. — Nestec Linor SA, Centre Dév. Alimentaire, 1350 Orbe
MOSLI S. — Universität Zurich, Uetlibergstr. 48, 8045 Zurich
PICTET G. — Nestec Linor SA, Centre Dév. Alimentaire, 1350 Orbe
PRODOLLIET J. — Nestlé Research Center, P.O. Box 44, Vers-Chez-Les-Blanc, 1000 Lausanne
ROUGE F. — Nestec Linor SA, Centre Dév. Alimentaire, 1350 Orbe
SCHLATTER C. — Institut de Toxicologie, Schorenstrasse 16, 8603 Schwerzenbach
SCHULTHESS B. — University of Zurich, Inst. of Plant Biology, Zollikerstr. 107, 8008 Zurich
SCHUTZ Y. — Université de Lausanne, Institut de Physiologie, 7 rue du Bugnon, CH 1005 Lausanne
TURESKI R. — Nestlé Ltd, Vers-Chez-Les-Blanc, PO Box 44, 1000 Lausanne
VIANI R. — NESTEC S + B SBU, Avenue Nestlé 55, 1800 Vevey
WINTGENS J. — NESTLE, 55 avenue Nestlé, CH 1800 Vevey
WUERZNER H. — NESTLE L.T.D., Vers-Chez-Les-Blanc, P.O. Box 44, 1000 Lausanne

Tanzanie

- KOINANGE E. — Ministry of Agriculture, PO Box 3004, Moshi

Vietnam

- HOANG TRAN THIEN — Inst. Rech. Café, Buon Ma Thuot, Dak-Lak
PHAN QUOC SUNG — Inst. Rech. Café, Buon Ma Thuot, Dak-Lak

Venezuela

- ASCANIO C. — Universidad El Limon, Maracay, Edo Aragua, Maracay

ALLOCUTION D'OUVERTURE

RENÉ COSTE

Président de l'ASIC

Monsieur le Préfet,
Messieurs les Présidents,
Messieurs les Directeurs,
Mesdames, Mesdemoiselles, Messieurs, Chers Amis,

Quel aréopage est aujourd'hui réuni sur ce podium du CORUM ! Les plus hautes personnalités régionales, gouvernementales, politiques et scientifiques sont là pour vous témoigner tout l'intérêt qu'elles portent à notre Association et à son XV^e Colloque !

Leur présence nous exprime aussi, j'en suis sûr, combien elles apprécient le choix de Montpellier pour organiser cette manifestation scientifique internationale.

Soyez-en tous chaleureusement remerciés, M. DASSONVILLE, Secrétaire général pour les Affaires Régionales, représentant M. B. GERARD, Préfet de région, M. J. BLANC, Président du Conseil Régional, M. G. FRECHE, Maire de Montpellier, M. A. CONESA, Président d'Agropolis et vous-même M. H. CARSALADE, Directeur général du CIRAD.

Je saluerai aussi la présence de M. A. BELTRÃO, Directeur exécutif de l'OIC à Londres.

Nous voilà donc, chers amis, une fois de plus, mais avec quel plaisir, réunis dans cette ville, Montpellier, au passé historique si prestigieux, au cœur d'une des plus belles régions de France. Nous allons, ensemble, au cours de ces journées studieuses, faire le point des recherches sur les caféiers et les cafés, en discuter les techniques et en apprécier les résultats, afin d'ouvrir la voie à de nouvelles étapes dans la connaissance et ses applications.

Dois-je rappeler que l'origine de l'ASIC est fondée dans deux réunions informelles de spécialistes, à Paris, en 1963 et 1965, organisées à l'initiative de l'IFCC, l'une à Nogent-sur-Marne, l'autre au C.N.R.S., à Paris, la première avec une quinzaine de participants, l'autre une centaine. La création de l'ASIC, en 1966, répondait au souhait général formulé par ces personnalités du monde scientifique, d'officialiser et de renouveler périodiquement ces rencontres. C'est ainsi qu'est née légalement notre Association et que les Colloques se sont succédé. Le premier à Trieste, à l'initiative de notre vice-Président, le Dr Illy, les suivants à Amsterdam, Lisbonne, Bogotá, Hambourg, Abidjan, Londres, Salvador, Lomé, Montreux, Paipa (Colombie) et, enfin, le dernier à San Francisco en 1991.

Le prestige international considérable acquis par l'ASIC dans le monde des professionnels du café fait que ne se pose actuellement aucun problème pour les prochaines manifestations : le Japon (Kyoto) a déjà fait acte de candidature pour 1995 ; d'autres Etats ont également manifesté leurs intentions : Djakarta (Java), Nairobi (Kenya), l'Inde, etc.

Dois-je aussi rappeler que les ouvrages des comptes rendus, publiés à l'issue de chaque colloque, représentent au total plus de 8 000 pages de texte et constituent une source documentaire spécialisée sur les caféiers et les cafés, originale et inédite, de grande qualité, d'une exceptionnelle valeur pour les professionnels.

Notre bureau a pris l'initiative, cette année, de focaliser les exposés sur deux grands thèmes d'actualité : le génie génétique, dont la charge a été confiée au Professeur A. CHARRIER, et, sous l'autorité du Professeur G. DEBRY, « Café et Santé ». Le premier est motivé par le spectaculaire essor des recherches en génie génétique, dont le caféier n'est pas exclu ; le second se propose, avec l'aide de plusieurs spécialistes de haut niveau, de faire échec aux attaques incessantes dont il est l'objet, en démontrant d'une part le peu de crédibilité qu'on pouvait généralement accorder aux études et enquêtes sur lesquelles elles étaient fondées, d'autre part en mettant en évidence les actions bénéfiques sur l'homme, d'une consommation raisonnable de café. Une conférence de presse, à laquelle ont été

conviés de nombreux journalistes de la grande presse nationale et régionale, suivra cette journée. Nous espérons que cette initiative, en faveur de la promotion des cafés dans le monde, sera approuvée par tous.

Au programme de cette semaine sont également inscrites, comme il est de tradition à l'ASIC, des communications en agronomie, en chimie et en technologie. Le grand nombre de celles-ci nous a obligé à les répartir, au mieux, en exposés oraux et en affiches, indépendamment, bien sûr, de celles que leurs auteurs destinaient à l'affichage.

J'ajoute que la version affiche ne doit, en aucune façon, être considérée comme péjorative sur la valeur scientifique de l'exposé. Absolument pas, car la plupart des affiches sont d'un intérêt égal à celui des exposés.

Et demain ! Quelles perspectives pour l'ASIC ?

Au Colloque de San Francisco, j'avais déjà souligné la remarquable extension de la recherche dans tous les domaines. Cette opinion trouve confirmation aujourd'hui dans le nombre des communications qui traitent des avancées spectaculaires en génie génétique et laissent déjà entrevoir la possibilité d'applications surprenantes.

En chimie et en technologie, de nombreux chercheurs se sont mobilisés soit pour approfondir nos connaissances dans la composition de l'arôme des cafés ou encore dans la recherche de nouvelles technologies susceptibles d'améliorer la qualité du breuvage.

On notera cependant, avec regret, l'insuffisance notoire, dénoncée à maintes reprises, des connaissances fondamentales en physiologie des caféiers : biologie florale, nutrition minérale et hydrique, photosynthèse et éclairage, compétitivité racinaire et spatiale, carences en éléments mineurs, etc. Aucun progrès décisif ne pourra être enregistré en agrotechnie caféière aussi longtemps que la réponse aux questions posées sera recherchée par les traditionnels essais aux champs, comme il y a plus d'un siècle, dont le caractère routinier et désuet apparaît avec évidence à l'époque du décodage du génome cellulaire et des manipulations génétiques.

Il est cependant réconfortant de constater, dans ce domaine de l'agrotechnie, la pratique de techniques d'avant-garde, mises en œuvre récemment par les Australiens au Queensland. Celles-ci sont imposées par la nécessité impérieuse d'agir sur les frais culturaux et les rendements, afin de compenser un coût très élevé de la main-d'œuvre. Un exposé magistral traite de ce sujet.

L'exemple des caféiculteurs australiens est-il susceptible d'ouvrir des perspectives nouvelles à la caféiculture ?

Je ne saurais répondre, mais je constate, comme je l'ai déjà fait à la conférence de Lisbonne, l'année dernière, que ces pratiques novatrices ne font qu'accroître l'écart qui sépare la Robustaculture, dite traditionnelle, spécifiquement africaine, avec ses incidences regrettables, notamment sur la déforestation, de la culture intensive, classique, généralisée partout ailleurs.

Ces quelques traits n'ont d'autre objet que de souligner l'évolution de la recherche en caféiculture et les développements encore plus importants qu'elle est appelée à connaître. Il faut souhaiter que les producteurs en tirent profit, que les négociants et torréfacteurs exploitent au mieux les qualités des grains et enfin que les consommateurs soient de plus en plus nombreux à déguster et apprécier cette boisson, entre toutes, précieuse.

Avant de clore cette brève allocution, je veux exprimer ma profonde reconnaissance à tous ceux qui, à mes côtés, ont contribué à la *préparation de cette rencontre*.

En tout premier lieu à Mlle COLLOT, ma fidèle et dévouée collaboratrice, qui, depuis son engagement lorsque je présidais aux destinées de la section « Café, Cacao, Thé » à l'ORSTOM, en 1956, puis à la tête de l'IFCC, jusqu'à mon départ en retraite, s'est dépensée sans limites. Comme je le souhaitais, elle a rempli l'engagement auquel elle avait souscrit de donner à la documentation toute son importance et à la diffusion des connaissances la place qui lui revient dans tout programme de recherches, faisant d'ailleurs sien mon slogan « une recherche n'est terminée qu'avec la publication de ses résultats ». La préparation du Colloque de Montpellier est donc pour moi une nouvelle occasion de rendre hommage à ses mérites professionnels, à son inlassable activité au service d'un exemplaire dévouement.

Associé à Mlle COLLOT et pour la même entreprise, je citerai mon ancien collaborateur M. MULLER, ex-Directeur Scientifique de l'IRCC, qui a joué, à mon entière satisfaction, le rôle de Représentant du Président à Montpellier dans ses relations avec nombre de personnalités, le CORUM, etc. Je préciserai, que précédemment, le concours de M. VINCENT, actuellement en poste à Bangkok, m'avait été assuré par le CIRAD.

Je n'aurai garde aussi d'omettre les organisations professionnelles, représentées au Comité d'organisation, c'est-à-dire le Syndicat National de l'Industrie et du Commerce des Cafés, que préside M. DANON, secondé par M. FRANKEL, Délégué général, qui a commandité la Conférence de Presse de la journée Café-Santé, ainsi que M. DELOFFRE, Président de la Chambre Syndicale Nationale des Torréfacteurs de France. M. DESPIERRES, Président du Comité Français du Café, a bien voulu répondre à notre appel pressant d'adhésion. Je l'en remercie.

M. le Dr. BELTRAO, Directeur exécutif de l'Organisation Internationale du Café (OIC) m'a fait la surprise de sa présence aujourd'hui. Je lui en suis très reconnaissant.

Comment aussi oublier le Bureau de l'ASIC, avec mes amis, les Docteurs Ernesto ILLY, Otto VITZTHUM et Rinato VIANI, ainsi que notre trésorier M. R. MARCADET, dont, de tous, les conseils m'ont été précieux.

L'organisation de la Conférence de Presse à la fin de la journée « Café-Santé » me permet encore de citer l'agence parisienne « Corolle Grayling », qui n'a rien négligé pour en assurer le succès.

Cette adresse de remerciements serait encore incomplète si je n'y associais ceux qui, appartenant à l'innombrable famille du café dans le monde, n'ont pu se joindre à nous aujourd'hui. Ma pensée est, à ce propos surtout orientée sur l'Afrique, très éprouvée par le marasme des cours et assombrie récemment par l'échec des négociations londoniennes de l'Organisation Internationale du Café, en vue de la définition d'un nouvel accord international sur le café.

Nous devons, je dois le préciser, la présence au Colloque d'une délégation de spécialistes africains, à la décision du « Centre de coopération agricole et rurale » (CTA), émanation de la CEE, en la personne de son Président, M. ASSOUMOU M'BA et de son Directeur technique, M. R. DELLERE, de prendre en charge leur déplacement.

Je les en remercie très chaleureusement, en exprimant le souhait que cette initiative ouvre la voie à des relations suivies de collaboration entre l'ASIC et le CTA.

J'adresse également une pensée reconnaissante aux grandes entreprises et associations qui ont bien voulu apporter à l'ASIC une aide financière ou matérielle.

J'ai, comme on dit familièrement, gardé « pour la bonne bouche » M. CONESA, Président d'Agropolis, qui, avec M. BACHELIER, Président du CIRAD/Montpellier, a mis au point l'organisation, difficile par sa complexité, de la visite d'Agropolis, le mercredi 9 juin, après-midi.

Enfin, je voudrais que l'ouverture de cette manifestation scientifique internationale soit aussi marquée par mon profond sentiment de gratitude envers M. Henri CARSALADE, Directeur général du CIRAD, pour la participation importante au Colloque qu'y apporte le CIRAD/CP, sous l'autorité de M. Alain WEIL et de M. Paul GENER, et bien au-delà, pour les facilités matérielles qu'il a accordées, dans l'établissement qu'il dirige, au représentant de l'ASIC, sans lesquelles rien de ce qui relève de l'activité de cette Association et de l'organisation de ce XVe Colloque n'aurait été aisé, voire même possible. Encore merci, M. le Directeur général.

Communications

VARIATIONS IN THE TOTAL NUCLEAR DNA CONTENT IN AFRICAN *COFFEA* SPECIES (*RUBIACEAE*)

J. CROS, M. C. GAVALDA, N. CHABRILLANGE, C. RÉCALT, C. DUPERRAY *, S. HAMON

Laboratoire de Ressources Génétiques et Amélioration des Plantes Tropicales
ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier (France)

* Service commun de Cytométrie en flux
INSERM Unité 291, 99, rue P. Villa, 34090 Montpellier (France)

INTRODUCTION

Coffee beans are produced by many species, but current commercial green coffee production relies on two species only: *Coffea arabica* ($2n=44$, autogamous, cultivated at altitude) and *C. canephora* ($2n=22$, allogamous, cultivated in lowlands). Coffee trees belong to the botanical genus *Coffea*, sub-genus *Coffea* (*Rubiaceae*), for which many species have been described (Chevalier 1947, Charrier 1978, Leroy 1980, Bridson & Verdcourt 1988, Anthony 1992). *C. arabica*, native to Ethiopia, was introduced into south and central America only three centuries ago. Wild species are only found in inter-tropical Africa and Madagascar (Berthaud & Charrier 1988).

The main breeding objectives are high yielding varieties, improvement of quality, and screening for disease resistance. The hierarchy of breeding criteria changes with time and place, especially when the genetic improvements of *C. canephora* (variety Robusta) and *C. arabica* cultivars are compared. Despite a large number of breeding studies, the genetic structure of the genus remains largely unknown and a genetic map does not currently exist. Genome size varies among angiosperms from 0.15 to 233 pg of DNA per nucleus (Bennet and Smith, 1991; Marie and Spencer Brown, 1993). In addition, for a given genus, major variations are not only recorded between different ploidy levels, but also between species or populations (De Laat et al., 1987).

Until recently, most DNA contents reported in the literature were determined by Feulgen microspectrophotometry of root tip mitoses (Bennet and Smith, 1991). Since the introduction of automated fluorescence, DNA content can be determined more easily using fluorochromes after leaf chopping, protoplast lysis or nuclei isolation (Galbraith et al., 1983, Dolezel 1991, Ulrich and Ulrich 1991, Arumuganathan and Earle, 1991a, Dolezel et al., 1992).

In the present study, a laser flow cytometry was used to investigate the DNA content of a representative panel of *Coffea* species.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials

Coffee plants were grown from seeds in a greenhouse with a tropical climate (24 °C during the day, 18 °C at night, relative humidity 70%). Newly expanded leaves (0.5 g) were collected at the same time, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C before processing. Seventy-five genotypes belonging to 17 species were used. In the following list, the number of genotypes per species is given in parentheses. Seven species (46 genotypes) are native to Central and West Africa: *C. brevipes* (6), *C. canephora* (11), *C. Congensis* (9), *C. humilis* (3), *C. liberica* (8), *C. sp. Moloundou* (3), *C. stenophylla* (6). Seven species (25 genotypes) are native to East Africa: *C. eugenioides* (3), *C. salvatrix* (1), *C. pseudozanguebariae* (3), *C. sessiliflora* (6), *C. racemosa* (4), *C. sp F. Bridson* (3), *C. arabica* (5). Three species are native to Madagascar: *C. bertrandini* (1), *C. farafaganensis* (1), *C. milotti* (1).

Chopping leaves

To release plant nuclei, leaf tissue (approximately 500 mg) was chopped with a razor blade in a glass Petri dish in 1 ml of PBS buffer, and Triton X100 (10%) was added. The suspension of released nuclei was passed through a 50 mm nylon filter and then stained with 80 ml of propidium iodine (1%).

Preparation of nuclei pellets

Leaves were ground to a fine powder using liquid nitrogen, mixed with buffer A (0.4M sucrose, 0.05M Tris, 2mM CaCl₂, 0.4% b-mercaptoethanol) and filtered through 50 µm Blutex. The solution was centrifuged (3,000g, 15min., 4°C) and the pellets were resuspended in 0.25 M sucrose, 0.05M Tris, 2mM CaCl₂ and centrifuged again (3,000 g, 15min., 4°C). The second pellet was mixed with 5ml buffer of B and centrifuged (16,000 g, 45min., 4°C) onto 20ml of buffer C (2M sucrose, 0.05M Tris, 2mM CaCl₂). The last pellet - rich in nuclei - could be stored at -80°C or below for one week.

Staining and flow cytometry procedure

PBS buffer (500 ml) was added to isolated nuclei and warmed to room temperature. The isolation procedure was modified by the addition of sarkosyl (1.5% final) to the nuclei suspension, before addition of propidium iodine. The mean fluorescence intensity, frequency, and standard deviation of the propidium iodine-stained nuclei at 488nm were recorded with a FACSCAN - argon laser flow cytometer (Becton Dickinson 488 nm, 15 mW). The voltage of the photomultipliers was set at 550V so that the *C. arabica* peak occurred at channel 600. Rice nuclei (*Oryza sativa* 1.2 pg) and chicken erythrocyte red blood cells "CRBC" (2.33 pg) were used as calibration standards.

Estimation of total nuclear content

To estimate total nuclear content, we compared the mean position of the tested sample with the mean value of the calibration standards, according to Galbraith et al. (1983). Amount of nuclear DNA = (mean position of the tested sample / mean position of the CRBC) * 2.33 pg

RESULTS AND DISCUSSION

Comparison of the two nuclear isolation procedures

Figure 1 shows two DNA histograms obtained with the same genotype of *C. arabica*. one by simple chopping (figure 1a) and the other after nuclei isolation (figure 1b). It is clear that the use of nuclei pellets gave better results (lower CV). In addition, for some species like *C. racemosa* from a very dry region, it seems that the nuclei are less accessible to the dye and no signal is detected. In this case, the isolation of nuclei pellets is a real improvement.

Table 1: Total DNA content of *Coffea* species native in West and Central Africa

Species	Country of origin	Population/Bulk	Genotype	Nuclei DNA amount (pg)	
				Genotype	Mean
<i>C. brevipes</i>	Cameroon	Mont Cameroun	1	1,52	
<i>C. brevipes</i>	Cameroon	Mont Cameroun	4	1,60	
<i>C. brevipes</i>	Cameroon	Mont Cameroun	6	1,70	
<i>C. brevipes</i>	Cameroon	Mont Cameroun	8	1,45	
<i>C. brevipes</i>	Cameroon	Mont Cameroun	12	1,47	
<i>C. brevipes</i>	Cameroon	Mont Cameroun	18	1,36	1,52
<i>C. canephora</i>	Côte-d'Ivoire	Guinean diversity group	3	1,61	
<i>C. canephora</i>	Côte-d'Ivoire	Guinean diversity group	5	1,29	
<i>C. canephora</i>	Côte-d'Ivoire	Guinean diversity group	6	1,36	
<i>C. canephora</i>	Côte-d'Ivoire	Congolese diversity group	8	1,57	
<i>C. canephora</i>	Côte-d'Ivoire	Congolese diversity group	14	1,46	
<i>C. canephora</i>	Côte-d'Ivoire	Congolese diversity group	19	1,61	
<i>C. canephora</i>	Rep. Central Africa	Nana river	4	1,44	
<i>C. canephora</i>	Rep. Central Africa	Nana river	6	1,18	
<i>C. canephora</i>	Cameroon	Cameroonese diversity group	2	1,47	
<i>C. canephora</i>	Cameroon	Cameroonese diversity group	7	1,56	
<i>C. canephora</i>	Cameroon	Cameroonese diversity group	19	1,47	1,46
<i>C. congensis</i>	Rep. Central Africa		4	1,59	
<i>C. congensis</i>	Rep. Central Africa		7	1,57	
<i>C. congensis</i>	Rep. Central Africa		9	1,52	
<i>C. congensis</i>	Cameroon		10	1,54	
<i>C. congensis</i>	Cameroon		13	1,52	
<i>C. congensis</i>	Cameroon		22	1,45	
<i>C. congensis</i>	Congo		14	1,76	
<i>C. congensis</i>	Congo		22	1,46	
<i>C. congensis</i>	Congo		23	1,40	1,53
<i>C. humilis</i>	Côte d'Ivoire		2	1,81	
<i>C. humilis</i>	Côte d'Ivoire		13	1,42	
<i>C. humilis</i>	Côte d'Ivoire		16	1,60	1,61
<i>C. liberica</i>	Côte d'Ivoire	Guinean diversity group	3	1,54	
<i>C. liberica</i>	Côte d'Ivoire	Guinean diversity group	12	1,42	
<i>C. liberica</i>	Côte d'Ivoire	Guinean diversity group	19	1,86	
<i>C. liberica</i>	Rep. Central Africa	Congolese diversity group	3	1,51	
<i>C. liberica</i>	Rep. Central Africa	Congolese diversity group	9	1,43	
<i>C. liberica</i>	Rep. Central Africa	Congolese diversity group	17	1,33	
<i>C. liberica</i>	Cameroon	Koto	4	1,71	
<i>C. liberica</i>	Cameroon	Koto	14	1,88	1,59
<i>C. Sp Moloundou</i>	Cameroon	Moloundou	1	1,70	
<i>C. Sp Moloundou</i>	Cameroon	Moloundou	2	1,32	
<i>C. Sp Moloundou</i>	Cameroon	Moloundou	7	1,79	1,60
<i>C. stenophylla</i>	Côte d'Ivoire	Ira	4	1,32	
<i>C. stenophylla</i>	Côte d'Ivoire	Ira	6	1,22	
<i>C. stenophylla</i>	Côte d'Ivoire	Ira	11	1,46	
<i>C. stenophylla</i>	Côte d'Ivoire	Assabli	3	1,25	
<i>C. stenophylla</i>	Côte d'Ivoire	Assabli	8	1,22	
<i>C. stenophylla</i>	Côte d'Ivoire	Assabli	12	1,23	1,28

Table 2: Total DNA content of Coffea species native in East Africa and Madagascar

Species	Country of origin	Population	Genotype	Nuclei DNA amount (pg)	
				Genotype	Mean
<i>C. eugenoides</i>	Kenya		16.1	1,39	
<i>C. eugenoides</i>	Kenya		16.2	1,27	
<i>C. eugenoides</i>	Kenya			1,43	1,36
<i>C. pseudozanguebariae</i>	Kenya		4	1,25	
<i>C. pseudozanguebariae</i>	Kenya		5	1,01	
<i>C. pseudozanguebariae</i>	Kenya		7	1,09	1,12
<i>C. racemosa</i>	Mozambique		4	0,91	
<i>C. racemosa</i>	Mozambique		9	0,87	
<i>C. racemosa</i>	Mozambique		11	0,87	
<i>C. racemosa</i>	Mozambique		13	1,08	0,93
<i>C. salvatrix</i>			LB1	1,46	
<i>C. sessiliflora</i>	Kenya	Shimba	2	0,87	
<i>C. sessiliflora</i>	Kenya	Shimba	4	0,92	
<i>C. sessiliflora</i>	Kenya	Shimba	7	1,06	
<i>C. sessiliflora</i>	Tanzania	Kitulangalo	7	1,14	
<i>C. sessiliflora</i>	Tanzania	Kitulangalo	10	0,99	
<i>C. sessiliflora</i>	Tanzania	Kitulangalo	13	1,03	1,00
<i>C. Sp F Bridson</i>	Tanzania		10	1,25	
<i>C. Sp F Bridson</i>	Tanzania		17	1,29	
<i>C. Sp F Bridson</i>	Tanzania		20	1,25	1,26
<i>C. bertrandii</i>	Madagascar		HAK 1	1,65	
<i>C. farafaganensis</i>	Madagascar			1,34	
<i>C. millotii</i>	Madagascar		CM1	1,71	
<i>C. arabica</i>			Catimor	2,35	
<i>C. arabica</i>	Ethiopia		1,1	2,60	
<i>C. arabica</i>	Ethiopia		12.1a	2,39	
<i>C. arabica</i>	Ethiopia		12.1b	2,30	
<i>C. arabica</i>	Ethiopia		12,5	2,72	2,47
<i>P. ebracteolatus</i>	Côte d'Ivoire			1,14	

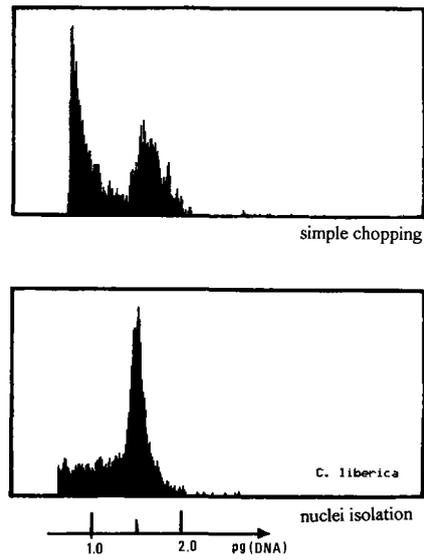


Figure 1 : Comparison of 2 histograms obtained by cytofluorometry for a genotype of *Coffea liberica*

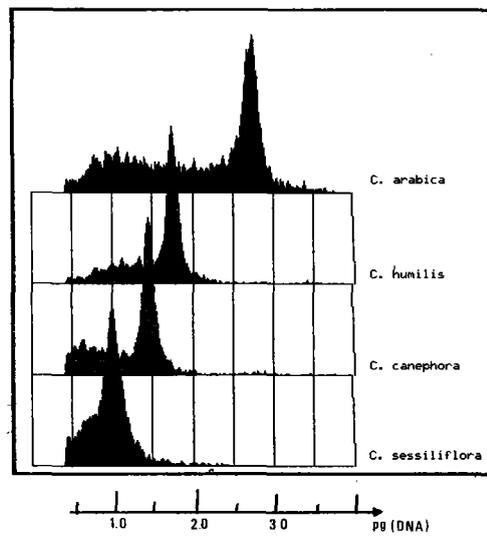


Figure 2 : Comparison of the total DNA amount of 4 *Coffea* species, obtained by cytofluorometry.

Although isolation of nuclei is more time-consuming, the results are more consistent and repeatable. For example, repetition of the complete procedure for 2 leaves of the genotype *C. arabica* 12.1a, harvested at the same time, gave very similar results (2.26 versus 2.39 pg per nucleus - Table 2). In addition, isolated nuclei can be stored in the cold (-80°C) for weeks without loss of resolution. The flow cytometry method could allow the analysis of nuclear DNA content in large populations.

Variation among diploid species

The DNA contents of diploid *Coffea* species and genotypes are reported in Table 1 for West and Central Africa, and in Table 2 for East Africa. Three species (*C. sessiliflora*, *C. pseudozanguebariae* and *C. racemosa*) native to East Africa have the lowest DNA content per nucleus (about 1pg). *C. humilis*, *C. liberica* and *C. sp.* Moloundou exhibit the highest contents (about 1.6 pg)(Table 2). Species from both west and east (*C. stenophylla*, *C. eugenioides* and *C. sp.* F Bridson) have an intermediate content (1.3 pg).

Differences in excess of 2- to 3-fold are common among congeneric diploid species (Price, 1988). For example, in the genera *Malus* and *Prunus*, the total DNA content of diploid species varies from 0.42 to 1.75 pg (Dickson et al., 1992). Walbot and Cullis (1985) described rapid genomic changes in plants. In the genus *Helianthus*, total DNA content varies more than 4-fold among diploid species (Sim and Price 1985, Cavallini et al. 1989). Some authors have tried, without any real possibility of generalisation, to correlate such variations with altitude, longitude or degree of selection (Price 1988). Price also suggests that total DNA content may be positively correlated with cell cycle duration. What is the situation for coffee? 1- If we analyze the results according to the climate of the native region we observe that species native to dry areas have a smaller genome than those from evergreen forest. 2- Let us assume that the process of seed maturation implies a constant number of cell divisions from flowering to ripening. Hamon et al. (1984) and Anthony (1992) report large differences between species. The three species of lower DNA content also have a shorter maturation phase (2 versus 11 months). 3- In the literature, no special attention is paid to the potential relation between genome size and genetic distance or possibility of inter-crossing. In extensive studies of crossing possibilities and hybrid fertility between diploid coffee species, Louarn (1993) clearly shows that *C. racemosa*, *C. sessiliflora* and *C. pseudozanguebariae* are interfertile but genetically isolated from the others by a strong fertility barrier. One constitutive element of this fertility barrier could be related to genome size differences.

Coffee genome size compared to other angiosperm species

Estimated values of total DNA content per nucleus are given in Tables 1 and 2. The 2-C value of *Coffea* species varies from 0.9 to 1.9 pg. Figure 2 shows histograms obtained for four species with different values of nuclear DNA content.

A range from 0.15 pg per nucleus for *Arabidopsis thaliana* to 223 pg for *Trillium rhombifolium* (Liliaceae) is given for angiosperm species by Bennett and Smith (1991). In this review paper, most estimates were made after Feulgen staining. When our results are compared with those obtained by cytofluorometry (Michaelson et al. 1991, Arumuganathan and Earle 1991b, Hamon et al. 1992, Lannaud et al. 1992, Marie and Spencer Brown 1993), the *Coffea* genome is small compared to those of *Allium cepa* (32.7 pg) or *Triticum aestivum* (30.9 pg), and similar to those of *Lycopersicon esculentum* (2.01 pg), *Beta vulgaris* (1.65 pg) and some types of *Dioscorea cayenensis-rotundata* or *Cucumis sativus* (1.77). Translated into mega base pairs (Mbp), with the equivalence: 1pg = 0.960 Mbp, the mean haploid genome size (0.75 pg) of *Coffea* species can be estimated as 0.7 Mpb. The mean chromosome size ($x = 11$) is therefore about 0.06 Mpb.

De Laat et al. (1987) show in auto-polyploid series, as in the genera *Malus* and *Prunus*, that the DNA content is exactly doubled. *C. arabica* ($2n = 4x$) is supposed to be a tetraploid plant of amphiploid origin. Two hypotheses could be suggested to explain the value of 2.5 pg for *C. arabica*: the addition of 2 genomes of about 1.3 pg or the sum a genome of 1pg and one of 1.5pg corresponding to the groups previously identified.

Intraspecific DNA polymorphism

Despite clear differences between genetically isolated species, within- and between-species overlap in C-DNA values is seen (Tables 1 and 2). The CV in DNA content was about 30%.

The concept of constancy of the unreplicated haploid nuclear genome (C-value) was introduced by Swift (1950) and was accepted until the beginning of the 1980s. Bennett (1985) reports that the extent of variation of the nuclear genome in some species may be considerable, reaching 54% for *Glycine max*, 59% for *Gibasis venetula*, 80% for *Poa annua* and 228% for *Collinsia verna*. Variations is also seen in some crop species: *Oryza sativa* (33%), *Zea mays* (30%), *Capsicum annuum* (35%). In contrast, *Hordeum vulgare*, *Vicia faba*, *Triticum aestivum*, *Sorghum bicolor*, and *Festuca pratensis* do not reveal such polymorphism (Laurie and Bennett 1985, Bennett and Smith 1991). Essad (1988) found that for *Medicago* diploids, intra- and interspecific variations were all near multiples of a DNA quantum called a "nucleon", which was estimated to be 0.37 pg at the 2 C level. Michaelson et al. (1991) found that the F1 offspring of two varieties of *Zea mays*, differing in nuclear DNA content, have an intermediate DNA content. Consequently, intraspecies polymorphism of *Coffea* species is consistent with other results.

Significance of variation in DNA C-values

We have observed intra- and interspecific differences in total DNA content in the genus *Coffea*. Furuta and Nishikawa (1991), Lapitan (1992) have reviewed variations in nuclear chromosomal DNA. A large number of explanations could be suggested. The first relates to differences in chromosome length and/or deletion/duplication of some chromosomal segments. No recent findings on this are available for coffee. Bouharmont (1959) published the only work on the subject and referred to interspecific variations in chromosomal length.

Another possible explanation is variation of the repeated sequences. The number of repeated DNA sequences often increases with genome size: 14% for *Arabidopsis*, 15-20% for *Lycopersicum* and 60 to 80% for *Zea* (Ganal et al. 1988). Among the different types of repeated sequences, satellite DNA is often found close to the telomeres and centromeres of plant chromosomes. While satellite DNA is highly homogenous within a species, it often highly divergent across species within a family, as in tomato and barley (Schweizer et al. 1988). Telomeric DNA possesses unique structural features that are important for its function of stabilizing chromosomes by allowing complete replication and preventing progressive loss of terminal nucleotides during replication. The ends of eukaryotic chromosomes consist of tandem copies of a highly conserved repeated DNA sequence with the general form (T/A)_nG(1-8) (Ganal et al. 1991). The particular hairpin structure is believed to be very important for recognition of the telomere-synthesizing enzyme, telomerase (Blackburn, 1990). Another repeated sequence family is the gene coding for ribosomal DNA. Corresponding genes are often clustered at one or more sites, most of which are associated with the nuclear region. In tomato, 27 hybridization sites are known. The total length in plants ranges from 7.8 to 18.5 Kb, with copies numbering from 600 to 8500 per haploid genome.

Conclusions and prospects

Analysis of the total DNA content in different species gives important information concerning the total DNA per nucleus for *Coffea* species. The genome size (1 - 1.6 pg), which is similar to that of *Beta vulgaris* (1.77 pg), is small if compared with other angiosperms. Within the genus 2 main groups are revealed. Their relative DNA content per nucleus was correlated both with their ecological origin (dry/humid) and the possibility of crossing them. In addition, species with smaller genomes, which exhibit a shorter flowering to ripening interval, may have a shorter cell duration. Our work gives the overall genetic background, and it is now necessary to identify the genetic basis of observed differences and perhaps use them in coffee breeding programmes. *In situ* hybridization has been used to identify differences in DNA repeated sequences in rye and barley (Jouve et al. 1991, Leith et al. 1991, 1992). Mukai and Gill (1992) have used such techniques with interspecific hybrids of barley and wheat to detect barley chromatids. Another objective could be flow karyotyping and chromosome sorting, as recently reported for *Vicia faba* (Lucretti et al. 1993).

Abstract

Laser flow cytometry has been used to estimate total nuclear DNA content for 75 *Coffea* accessions, corresponding to 16 diploid species ($2n=22$) and *C. arabica* (tetraploid, $2n=44$). Nuclei were isolated and stained by propidium iodide (DNA intercalating dye). 2C values ranging from 0.9 to 1.9 pg per nucleus have been estimated for *Coffea* species. Three species native to East Africa (*C. sessiliflora*, *C. racemosa* and *C. pseudozanguebariae*) had the smallest genome size (about 1 pg per nucleus). Species native to the African evergreen forest (*C. humilis*, *C. sp* Moloundou and *C. liberica*) had the highest diploid DNA content (1.6 pg). The genome size of the tetraploid *C. arabica*, native to Ethiopia, was 2.5 pg. In most species, variation in 2C values (up to 25%) was also recorded. Results are compared with data from other angiosperm species and are discussed in terms of their evolutionary significance.

Résumé

La quantité d'ADN par noyau a été estimée pour 75 génotypes de *Coffea* appartenant à 16 espèces diploïdes ($2n=22$) et *C. arabica* (tétraploïde $2n=44$) par cytofluorométrie en flux. L'agent fluorochrome utilisé est l'iodure de propidium (intercalant). La valeur 2-C du génome des caféiers oscille de 0,9 pg d'ADN par noyau à 1,9 pg. Trois espèces, originaires d'Afrique de l'Est (*C. sessiliflora*, *C. racemosa* et *C. pseudozanguebariae*) ont le plus petit génome (environ 1 pg par noyau). A l'opposé 3 espèces de forêt tropicale humide (*C. humilis*, *C. sp* Moloundou et *C. liberica*) correspondent aux valeurs les plus élevées (1.6). L'espèce tétraploïde *C. arabica*, originaire d'Ethiopie, a 2,5 pg par noyau. Au sein des espèces diploïdes on note une importante variation des valeurs 2-C pouvant atteindre 25% pour une espèce. Les résultats sont comparés aux résultats analogues chez d'autres angiospermes et une tentative d'interprétation des variations observées est donnée.

References

- Anthony, F. (1992). Les ressources génétiques des caféiers: collecte, gestion d'un conservatoire et évaluation de la diversité génétique. *Série TDM* 81, 320 p. Paris, France, Presses de l'ORSTOM.
- Arumuganathan, K. & D. Earle (1991a). Estimation of nuclear DNA content of plant by flow cytometry. *Plant Molecular Biology Reporter* 9: 229-241.
- Arumuganathan, K. & D. Earle (1991b). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* 9: 208-218.
- Bennet, M.D. (1985). Intraspecific variation in DNA amount and the nucleotypic dimension in plant genetics. In *Plant genetics (UCLA symposium on molecular and cellular biology)*. New series vol 35 (ed. M. Freeling) 283-302. New York: Alan Liss.
- Bennet, M.D. & J.B. Smith (1991). Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 334:309-345.
- Berthaud J., and Charrier A. (1988). Genetic resources of *Coffea*. In Clarke R.J. and Macrae, R. (eds.). *Coffee, 4 Agronomy* :1-42. London, G.B., Elsevier Applied Science.
- Blackburn, E.H. (1990). Telomeres and their synthesis. *Science*: 249: 489-490.
- Bouharmont, J. (1959). Recherches sur les affinités chromosomiques dans le genre *Coffea*. *Publ. de l' INEAC Série Scientifique*, 77, 94 p.
- Bridson, D., and Verdcourt, B. (1988). *Coffea*. In Polhill, R. M. and Balkema, A. A. (eds.). *Flora of Tropical East Africa: Rubiaceae*, Part 2: 703-723. Rotterdam, Netherlands.

- Cavallini, A., Zolfino, C., Natali, L. & G. Cionini (1989). Nuclear DNA changes within *Helianthus annuus* L.: origin and control mechanism. *Theor. Appl. Genet.* 77: 12 - 16.
- Charrier, A. (1978). La structure génétique des caféiers spontanés de la région malgache (*Mascarocoffea*). Leurs relations avec les caféiers d'origine africaine (*Eucoffea*). *Série Mémoires* 87, 223 p. Paris, France, Presses de l'ORSTOM.
- Chevalier, A. (1947). Les caféiers du globe. Systématique des caféiers et faux caféiers. Maladies et insectes nuisibles. *Encycl. biol.* XXVIII, Fas. III, Presses Lechevalier, P. Paris, France 356 p.
- De Laat, A.M.M., Göhde, W., & M.D.C. Vogelzang (1987). Determination of ploidy of single plants and plant populations by flow cytometry. *Plant Breeding* 99:303-307.
- Dickson, E.E., Arumuganathan, K., Kresovitch, S. & J.J. Doyle (1992). Nuclear DNA content variation within the *Rosaceae*. *American J. of Botany* 79 (9): 1081 - 1086.
- Dolezel, J. (1991). Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Phytochemical analysis* 2:143-154.
- Dolezel, J. Sgorbatti, S. and S. Lucretti (1992). Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia Plantarum* 85:625-639.
- Essad, S. (1988). Mise en évidence de variations saltatoires de l'ADN nucléaire dans et entre les espèces du genre *Medicago* L.. *Genome* 30: 825-834.
- Furuta, Y. & K. Nishikawa (1991). Variation in nuclear chromosomal DNA content and its role in evolution of plants. In *Chromosome engineering in Plants: Part A*. Edt. Gupta, P.K. & T. Tsuchiya. Elsevier, Amsterdam: 71 - 85.
- Galbraith, D.W., Harkins, K.R., Madox, J.M., Ayres, N.M., Sharma, D.P. and E. Fizoozabaky (1983). Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* 220: 1049-1051.
- Ganal, M.W., Lapitan, N.L.V. & S.D. Tanksley (1991). Macrostructure of the tomato telomeres. *Plant Cell* 3:87-94.
- Hamon, P. Brizard, JP, Zoundjihekpon, J., C. Duperray & A. Borgel (1992). Etude des index d'ADN de huit espèces d'ignames (*Dioscorea sp.*) par cytofluorométrie en flux. *Can. J. Bot.* 70: 996 - 1000.
- Hamon, S., Anthony, F., and D. Le Pierrès (1984). La variabilité génétique des caféiers de la section *Mozambicoffea* A. Chev. Précisions sur 2 espèces affines: *C. pseudozanguebariae* Bridson et *C. sp.* Bridson. *Bull. Mus. Hist. nat., Andansonnia* 4°, série 6: 207-223.
- Jouve, N. McIntyre, C.L. & J.P. Gustafson (1991). Chromosome preparations from protoplasts: *in situ* hybridization banding pattern of a dispersed DNA sequence in rye (*Secale cereale* L). *Genome* 34:524-527.
- Lannaud, C., Hamon, P. & C. Duperray (1992). Estimation of nuclear DNA content of *Theobroma cacao* L. by flow cytometry. *Café Cacao Thé*, vol XXXVI (1): 3 - 8. -
- Lapitan, N.L.V. (1992). Organisation and evolution of higher plant nuclear genomes. *Genome* 35: 171 - 181.
- Laurie, D.A. & M.D. Bennet (1985). Nuclear DNA content in the genera *Zea* and *Sorghum*. Intergeneric, interspecific and intraspecific variation. *Heredity* 55:307-313.
- Leitch, I.J., A. Leitch, & J.S. Heslop-Harrison (1991). Physical mapping of plant DNA sequences by simultaneous hybridization of two different labelled probes. *Genome* 34: 329 - 333.

- Leitch, I.J. and J.S. Heslop-Harrison (1992). Physical mapping of the 18S-5.8S 26S genes in barley by *in situ* hybridization. *Genome* 35: 1013-1018.
- Leroy, (1980). Evolution et taxogenèse chez les caféiers. Hypothèse sur leur origine. *C. R. A. S. Paris* 291: 593-596.
- Louarn, J. (1993). Structure génétique des caféiers africains diploïdes basée sur la fertilité des hybrides interspécifiques. Communication au XV^e congrès de l'ASIC, Montpellier France. (Ref in these proceedings).
- Lucretti, S., Dolezel, J. Scubert, I; & J. Fuchs (1993). Flow karyotyping and sorting of *Vicia faba* chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 85: 665-672.
- Marie, D. & Spencer C. Brown (1993). A cytometric exercise in plant DNA histograms with 2C values for seventy species. *Biology of the Cell* (In press).
- Michaelson, M.J., Price, H.J., Johnson, J.R & Ellison, J.R. (1991). Variation of nuclear DNA content in *Helianthus annuus* (*Asteraceae*). *American J. of Botany* 78(9): 1238-1243.
- Mukai, Y. and B.S. Gill (1991). Detection of barley chromatin added to wheat by genomic *in situ* hybridization. *Genome* 34: 448-452.
- Price, H.J. (1988). DNA content variation among higher plants. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 75: 1248-1257.
- Schweizer, G. M. Ganal, H. Ninnemann & V. Hemleben (1988). Species specific DNA sequences for identification of somatic hybrids between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum acaule*. *Theor. Appl. Genet.* 75: 679-684.
- Sim, L. and H.J. Price, (1985). Nuclear DNA content variation in *Helianthus* (*Asteraceae*). *American Journal of Botany* 72: 1213-1219.
- Swift, H. (1950). The constancy of deoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proc. Natn Acad. Sci. USA.* 36:643.
- Ulrich, I. & W. Ulrich (1991). High-resolution flow cytometry of nuclear DNA in higher plants. *Protoplasma* 165: 212-215.
- Walbot, V. & C.A. Cullis (1985). Rapid genomic changes in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol*, 36: 367 - 396.

DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DE QUELQUES GROUPES DE CAFÉIERS : UTILISATION DES OUTILS MOLÉCULAIRES, RFLP et RAPD

M. PAILLARD, N. DUCHATEAU, V. PÉTIARD

FRANCERECO
101 Avenue Gustave Eiffel
37390 - Notre-Dame-D'Oé
France

INTRODUCTION

Plusieurs classifications ont rendu compte de la grande diversité génétique des caféiers, classifications botaniques (BERTHAUD et CHARRIER, 1988), classification par l'emploi de marqueurs enzymatiques (MONTAGNON *et al.*, 1992), étude de la diversité biochimique (F.ANTHONY, M.N. CLIFFORD, M. NOIROT, 1989). L'étude du polymorphisme au niveau moléculaire a d'abord été réalisée à l'aide de l'analyse des fragments de restriction (RFLP) sur 4 grands groupes de caféiers (*C. arabica*, *C. canephora*, *C. liberica* et l'hybride *Arabusta*) pour être ensuite détaillée sur *Coffea canephora*. L'application de la technique de détection d'ADN polymorphe amplifié au hasard (RAPD) à certaines de ces espèces a permis d'accroître la diversité observée.

MATERIELS ET METHODES

Matériel végétal

Les 72 génotypes utilisés pour l'étude RFLP proviennent d'une collection en serre établie à Francereco ; il est à noter que certains des génotypes étudiés dans le groupe des *Arabusta* sont en réalité des "types agronomiques *Arabica*", ce qui signifie que des *Arabusta* d'origine ont été plusieurs fois rétrocroisés sur *C. arabica*. Par ailleurs 9 génotypes de *C. arabica* et 9 génotypes *Arabusta* ont été choisis parmi les précédents pour l'étude RAPD.

Extraction d'ADN et conditions expérimentales

L'ADN total de feuilles vertes a été isolé par gradient de densité sur chlorure de Césium après centrifugation. Pour l'analyse RFLP, l'ADN a été digéré par différentes enzymes de restriction (DraI, HinDIII), séparé sur gel d'agarose 0,8% (10µg par profil) et transféré sur membrane nylon Hybond N⁺ selon les recommandations du fabricant. Les bibliothèques d'ADN de l'hybride *Arabusta* ont été réalisées qu'il s'agisse de bibliothèques génomiques ou c-DNA.

Le marquage des sondes génomiques, c-DNA non répétées et de quelques amplifications RAPD a été réalisé à l'aide du Kit Megaprime DNA labelling system (Amersham) et de α^{32} PdCTP.

Pour l'analyse RAPD, plusieurs conditions d'amplification ont été testées (quantité d'ADN matrice, d'ADN amorce, température d'hybridation, nombre de cycles). Enfin pour 50 μ l de volume final, les conditions retenues sont les suivantes : 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,1% gélatine, 150 μ M de chaque dNTP, 60 ng d'ADN matrice, 0,4 μ M d'ADN amorce (décamères Operon) et 2 unités de Taq Polymerase Stratagène. Les réactions recouvertes d'huile minérale ont subi le cycle suivant 40 fois (thermocycler Braun) : 94°C pendant 1 min, 37°C 2 min, 72°C 2 min. Les produits d'amplification ont été analysés sur gel d'agarose 1,4%.

Analyses statistiques

Les données collectées ont été enregistrées sous forme 1 ou 0 (Excel Microsoft), deux approches (bande ou diagramme) ont été utilisées. Les indices de similitude ont été calculés (NEI et LI, 1979). Le dendrogramme a été construit à partir du logiciel F-Val suivant le procédé UPG (unweighted pair group). Les données ont été également traitées de façon multidimensionnelle par le logiciel Statgraphics et le module Unistat.

RESULTATS ET DISCUSSION

RFLP

Les pourcentages de sondes génomiques répétées ont varié selon l'enzyme utilisée (83% pour la banque EcoRI, 20% pour BamHI et 17% pour Pst) ; 41% de sondes répétées ont été trouvés dans la banque c-DNA. La plupart (60%) des sondes génomiques non répétées qui se sont révélées polymorphes provenaient de la banque BamHI. Les enzymes polymorphes choisies ont été DraI, EcoRI, EcoRV et HindIII.

La première série d'analyses a porté sur 4 espèces (*C. liberica*, *C. canephora*, *C. arabica* et l'hybride *Arabusta*), une plante par espèce, 2 enzymes (DraI et EcoRV) et 40 sondes ; ceci a permis de mettre en évidence l'existence de polymorphisme interspécifique (figure 1). L'étude ensuite étendue à 18 plantes par espèce a révélé du polymorphisme interspécifique (144 sondes), mais 30% seulement des sondes se sont révélées exploitables. La figure 2 donne le pourcentage de polymorphisme observé selon l'espèce considérée : on constate que le niveau de polymorphisme reste faible pour l'espèce *C. arabica* et l'hybride *Arabusta* (10%) tandis qu'il est élevé pour *C. canephora* (54%). La première de ces observations nous a conduits à rechercher du polymorphisme au sein des espèces tétraploïdes que sont *C. arabica* et *Arabusta* par une autre approche, l'étude RAPD, tandis que la seconde de ces observations nous a incités à étudier plus en détail l'espèce diploïde *C. canephora*.

Parmi les 50 sondes testées jusqu'ici sur *C. canephora*, 20 ont révélé du polymorphisme avec les deux enzymes DraI et HindIII. Le tableau 1 montre qu'il n'y a pas indépendance entre les deux enzymes quant au polymorphisme qu'elles révèlent ($\chi^2 = 14$; $P < 0,001$) : ceci peut suggérer que le polymorphisme provient essentiellement d'événements d'insertion-délétion.

Tableau 1. : Test d'indépendance de deux enzymes de restriction (sondes génomiques et c-DNA)

		DRAI		
		Nombre sondes monomorphes	Nombre sondes polymorphes	Total
HINDIII	monomorphes	17 (10,64)	11 (17,36)	28
	polymorphes	2 (8,36)	20 (13,64)	22
Total		19	31	50

Les valeurs attendues en cas d'indépendance sont données entre parenthèses

RAPD

Etude de fiabilité et de reproductibilité des résultats

Nous avons entrepris une étude systématique de la fiabilité de la technique RAPD. L'étude a porté sur trois génotypes aussi proches que possible (3 génotypes *Arabica typica* provenant de boutures : G1, G2 et G3) ; ceux-ci ont été cueillis, soit le même jour (J1), soit des jours différents (J2, J3 et J4) ; 4 amorces ont été utilisées soit 24 combinaisons possibles sur les 6 extractions d'ADN effectuées le même jour, permettant ainsi de dissocier jour de cueillette et génotype.

D'autre part, nous avons prélevé pour ces extractions des feuilles d'âge différent donc d'état physiologique différent.

Les amplifications ont été répétées soit le même jour, soit des jours différents. De même, les extractions d'ADN ont été testées pour les mêmes génotypes des jours différents, également selon des méthodes différentes.

De tout ceci il est ressorti que ni le jour de cueillette, ni l'âge des feuilles prélevées, ni le jour d'amplification n'influent sur les résultats. En revanche, nous avons constaté que le procédé d'extraction de l'ADN est important. En effet, selon la qualité de l'ADN obtenu, nous avons observé un effet inhibiteur de l'amplification qui pouvait être annulé si la quantité d'ADN utilisé lors de l'amplification était ramenée de 20-100 ng à 2-10 ng. D'autre part, toute coloration de l'ADN après extraction inhibe l'amplification.

Il reste cependant que la plupart des problèmes de reproductibilité des résultats sont dus à des erreurs ou à des contaminations. Il y a en effet apparition de bandes parasites que l'on retrouve dans le contrôle négatif (sans ADN végétal) et qui prouvent la présence d'ADN étranger mais aussi d'ADN végétal transporté d'un pipetage à l'autre (PCR carryover).

Il reste à tester la conservation de l'ADN dans le temps.

Résultats

Sur 84 amorces testées sur l'espèce *C.arabica* et l'hybride *Arabusta*, 35 ont été retenues pour l'analyse (figure 3).

Environ 120 produits d'amplification de 0,2 à 2,3 Kb ont été amplifiés avec une moyenne de 4 produits par amorce, la majorité des produits (64%) se situant entre 0,4 et 1 Kb. Le nombre de diagrammes par espèce est de 43 pour *Arabica* contre 94 pour *Arabusta*. Le nombre d'amorces polymorphes est de 8 pour *Arabica* contre 29 pour *Arabusta*. Tandis que plusieurs segments sont communs à tous les individus d'une espèce, on constate que quelques segments sont amplifiés par un individu et pas par un autre. A l'exception de deux génotypes sur les 18 examinés (*Caturra* et *Catuai*), il y a toujours au moins un cas de polymorphisme observé pour chacune des espèces examinées. Plus de la moitié des fragments produits sont identiques ; cependant 9 amorces permettent l'identification des 9 *Arabica* choisis pour l'analyse tandis que 28 permettent celle des 9 *Arabusta*. Aux vues de ces résultats on voit qu'il y a peu de polymorphisme à l'intérieur de l'espèce *Arabica* tandis que la variabilité chez *Arabusta* est plus importante et reflète probablement la variabilité due au génome de *C. canephora* intervenu dans le croisement. Le résultat du calcul des distances génétiques entre les 18 génotypes étudiés est présenté sur la figure 4.

La figure 5 montre une excellente corrélation entre les valeurs F et F', indices de similarité entre les échantillons selon que l'on considère les bandes ou les diagrammes obtenus.

L'analyse conduit à l'établissement d'un arbre phylogénétique (figure 6) pour lequel quelques remarques peuvent être faites ; sur ce phénogramme, l'axe de 1 à 0 permet de hiérarchiser les génotypes *Columbia* et *Catimor* s'apparentant au groupe des *Arabica* ; il s'agit de "types *Arabica*" déjà identifiés lors de l'étude RFLP. Une variabilité intraspécifique plus importante pour l'hybride *Arabusta* est mise en évidence parmi les six génotypes non apparentés aux *Arabica* avec seulement 50% d'homologie. On retrouve les *Arabusta* d'origine génétique commune (Guyane), les génotypes 1304, 1323 et 1338 tandis que les trois autres génotypes ont été maintenus par culture *in vitro*.

L'analyse en composantes principales (ACP) (figure 7) obtenue à partir de la matrice F dispose les génotypes en nuage de points. Avec seulement deux axes, nous arrivons à visualiser 86,7% de la variabilité totale ; sur cette figure, on distingue deux nuages de points bien distincts. Le nuage de droite dont les points sont très rapprochés les uns des autres, regroupe les génotypes *Arabica*, ce qui confirme une faible variabilité intraspécifique pour cette espèce. Les trois génotypes *Arabusta* de type *Arabica* (codes 10 à 12) s'y superposent. Le nuage de gauche permet de grouper à nouveau les *Arabusta* Guyane (codes 16 à 18).

Enfin 5 des 9 produits d'amplification polymorphes ont été utilisés comme sondes sur les 18 génotypes *Arabica* de l'étude RFLP sans qu'aucun ne donne de bons résultats.

CONCLUSION

La technique RAPD est une alternative intéressante à la technique RFLP pour l'étude des relations phylogénétiques entre espèces ; elle a permis d'augmenter le taux de polymorphisme détecté (de 10% à 25%) au sein d'une espèce tétraploïde autogame de base génétique relativement étroite, *Coffea arabica*. Une telle étude comparative est entreprise pour l'espèce diploïde allogame, *Coffea canephora*.

BIBLIOGRAPHIE

- BERTHAUD J., CHARRIER A., 1988. Genetic resources of *Coffea*, in R.J. Clarke et R. Macrae (ed.) : "Coffee, volume 4 : Agronomy", Elsevier Applied Science (Londres), 334 p
- MONTAGNON C., LEROY T., YAPO A., 1992. Diversité génotypique et phénotypique de quelques groupes de caféiers en collection, Café Cacao Thé, Vol XXXVI, n°3, 187 p
- ANTHONY F., CLIFFORD M.N., NOIROT M., 1989. La diversité biochimique dans les genres *Coffea* et *Psilanthus*, ASIC, 13è Colloque, Paipa, 474p
- NEI M., LI W.H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases, P.N.A.S. USA 76, 5269p

RESUME

L'étude de la diversité génétique est une des applications immédiates des outils moléculaires que sont les techniques RFLP et RAPD.

L'étude du polymorphisme au niveau moléculaire a été réalisée à l'aide de l'analyse de longueur des fragments de restriction sur des plantes de Caféier (*Coffea*). Elle a montré combien il est difficile de mettre en évidence du polymorphisme intraspécifique chez l'espèce *Coffea arabica* et chez l'hybride *Arabusta*. L'application de la technique de détection d'ADN polymorphe amplifié au hasard (RAPD) à ces espèces a permis d'une part de conforter les résultats RFLP obtenus et d'autre part de montrer qu'il est possible de détecter de la diversité génétique selon la puissance de l'outil utilisé.

L'analyse statistique des résultats a conduit à l'élaboration d'un phénoграмme mettant en évidence l'existence de groupes intéressants.

SUMMARY

The study of genetic variability has been greatly facilitated by the development of RAPD and RFLP techniques.

The present work describes the use of RFLP in crops such as *Coffea*. The level of intraspecific polymorphism was shown to be low within the *Coffea arabica* species and within different *Arabusta* hybrids. The use of RAPD technique on those species has confirmed the RFLP results and showed that it is possible to find genetic variability, depending on the molecular tools.

The statistical data allowed the construction of a phenogram revealing interesting genetic groups.

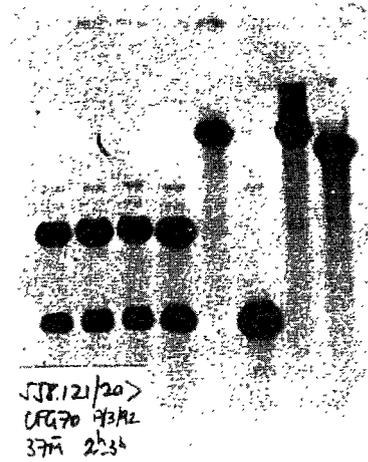
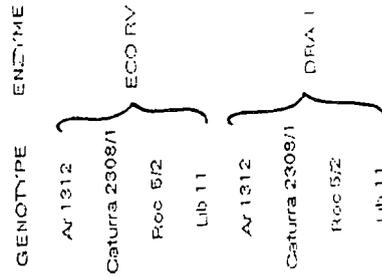


figure1

figure 2 POLYMORPHIC PROBES POURCENTAGE
144 PROBES, 18 X 4 GENOTYPES

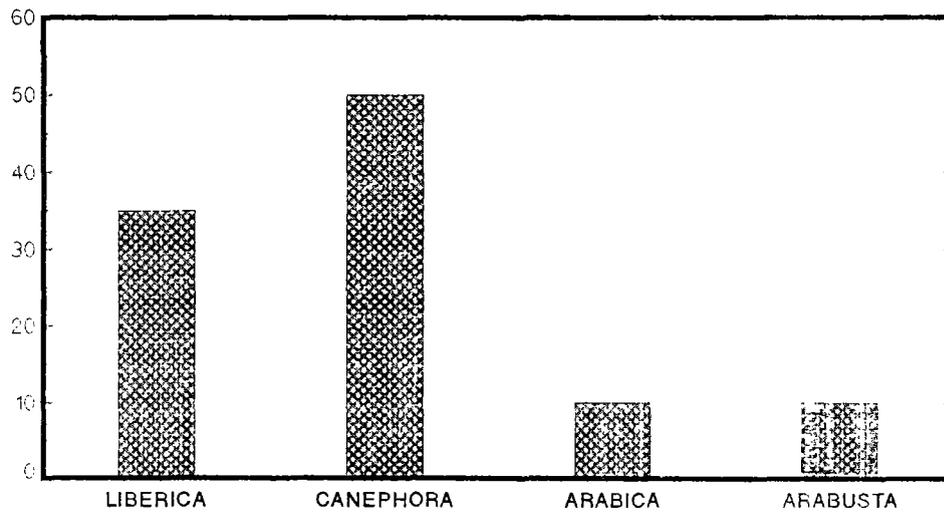


Fig.5 Corrélation entre F et F'

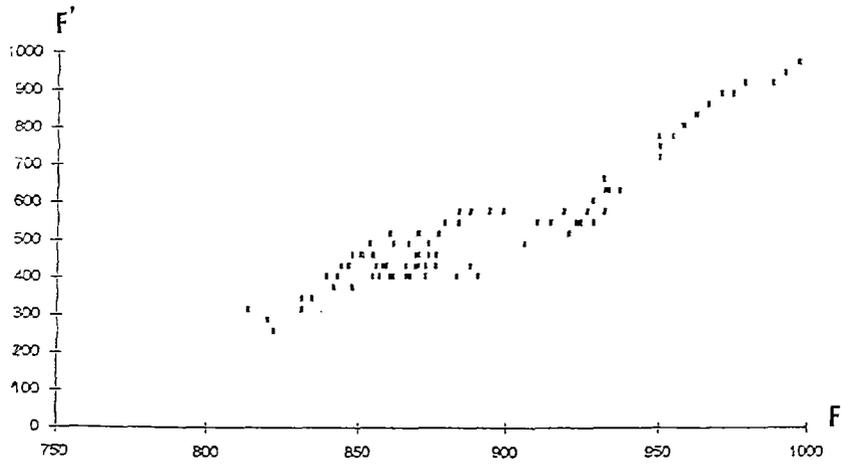


Fig.6 ARBRE PHYLOGENETIQUE généré par l'approche diagramme (indice F')

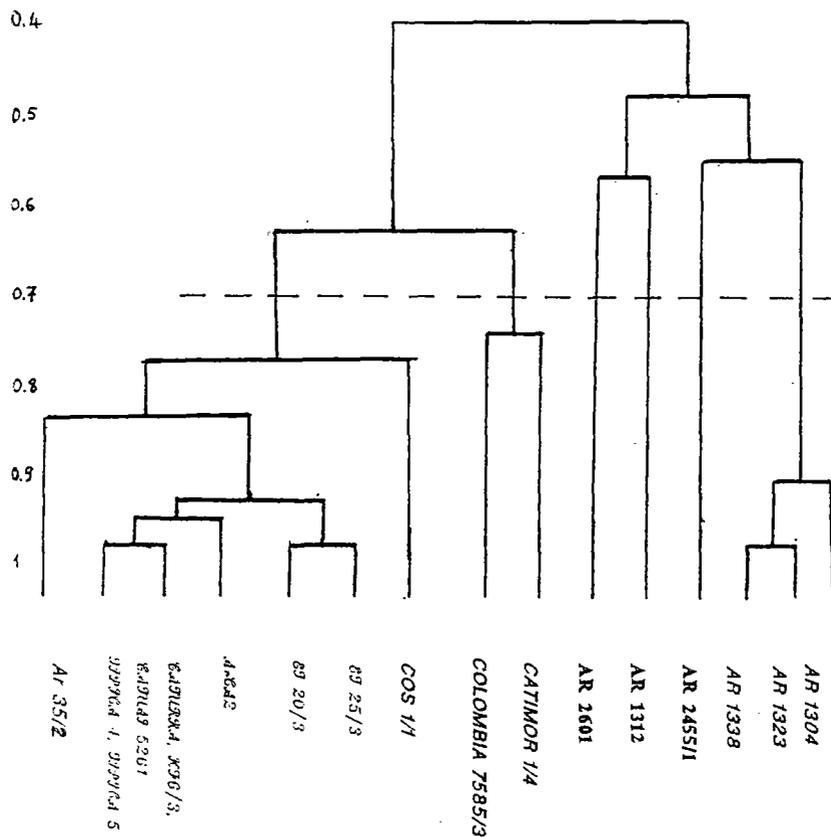
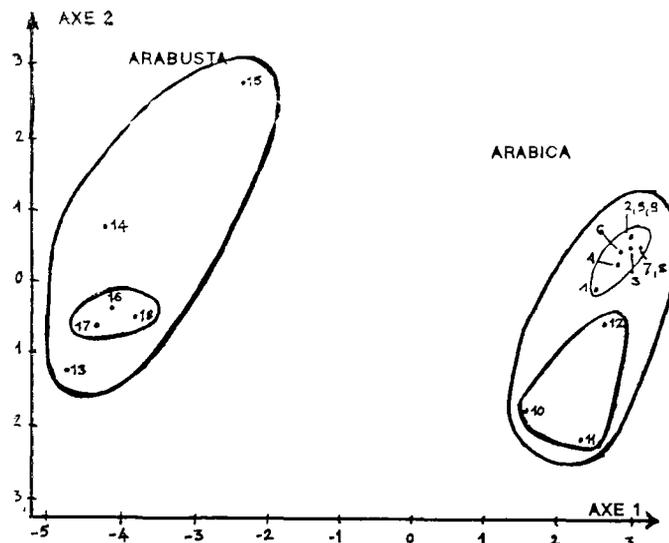


figure 7

ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE (ACP)

générée à partir de l'indice F



Les composantes principales représentent 76,9% et 9,8% de la variance totale. 1=Ar35-2, 2=Caturra, 3=Et20-3, 4=Et25-3, 5=KF6-3, 6=ArCa2, 7=Tipica 4, 8=Tipica 5, 9=Catuai 5261, 10=Columbia 7585-3, 11=Catimor 1-4, 12=Cos 1-1, 13=AR2455-1, 14=AR1312, 15=AR2601, 16=AR1338, 17=AR1323, 18=AR1304

MOLECULAR ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY AND PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS IN *COFFEA*

J. CROS, Ph. LASHERMES, Ph. MARMEY, F. ANTHONY, S. HAMON, A. CHARRIER

ORSTOM, Laboratoire de Ressources Génétiques et Amélioration des Plantes Tropicales,
911 Av. Agropolis, BP 5045, 34032 Montpellier, France

Introduction

Coffea subgenus *Coffea* consists of approximately 100 taxa so far identified. Commercial coffee production relies on only two species: *Coffea arabica* and *Coffea canephora*, but many species are a valuable gene reservoir for different breeding purposes (Berthaud & Charrier, 1988).

Coffee genetic resources have been analysed using geographical distribution, cytological observations and taxonomic data including agro-morphological and biochemical characteristics (Charrier, 1977 ; Berthou & al., 1980 ; Louarn, 1982 ; Anthony & al., 1989 ; Clifford & al., 1989 ; Rakotomalala & al., 1993). However, structure of the genetic diversity and phylogenetic relationships between species remain imprecise.

Molecular marker techniques are particularly suitable for genetic diversity analysis. DNA-based marker techniques such as Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) have been recently adapted to coffee germplasm at ORSTOM. In this communication, we report two preliminary studies.

Use of RAPD for assessing variation in coffee

The RAPD technique (Williams et al., 1990) based on the polymerase chain reaction (PCR) offers a new class of DNA markers which present particular interests. This approach provides many advantages over the RFLP/southern blotting approach to revealing polymorphisms. It is faster, does not use cloned probes and is independent of prior DNA sequence information. The amplification protocol differs from the standard PCR conditions in that only a short single random oligonucleotide is employed as a primer. Number and size of fragments generated by the RAPD system strictly depend on the nucleotide sequence of the primer used and on the source of the template DNA, resulting in a genome-specific "fingerprint" of random DNA fragments. Use of such fragments as genetic markers in *Coffea* was investigated. Nineteen coffee samples representing major coffee species (*arabica*, *canephora*, *congensis*, *eugenioides*, *liberica*, *resinosa*, *stenophylla*, *pseudozanguebariae*) were studied. *C. arabica*, *C. canephora* and *C. liberica* were represented by different plants which were chosen to display a wide genetic variability. In addition, we analysed Hibrido de Timor, a tetraploid genotype that presents a phenotype like *C. arabica* and combines important resistance to coffee berry disease (CBD) and to most rust races (Moreno, 1989).

Twenty-three arbitrary oligonucleotides were used singly as primers for the amplification of random DNA sequences from genomic DNA. DNA extraction and RAPD experiments were carried out as described by Lashermes & al. (1993). RAPD were scored as dominant markers (presence versus absence), and a similarity index (D) expressing the probability that a RAPD in one sample is also found in another was calculated according to Wetton & al. (1987) for all possible pairwise comparisons between accessions.

All samples generated comparable numbers of amplified products (mean of 4.3 amplified fragments per primer) with the exception of *C. pseudozanguebariae* and *C. sp.* A801 which produced consistently less fragments. This result can be related to the relatively low genome size determined for *C. pseudozanguebariae* by laser flow cytometry (Cros & al. 1993).

Intraspecific variation was easily detected in *C. canephora* and *C. liberica*. Comparisons between *canephora* yielded D-values of 0.62 to 0.73. *Liberica* variety *liberica* yielded D=0.66 when compared with the *liberica* variety *dewevrei*. On the other hand, the primers assayed failed to reveal polymorphism between *C. arabica*. Hibrido de Timor was found to be slightly different from *arabica* samples. In particular, results showed that Hibrido de Timor shares a marker (common amplified product) with one accession of *C. canephora*, confirming that Hibrido de Timor most likely originated from a spontaneous interspecific cross between *C. arabica* and *C. canephora*.

Considerable interspecific genetic variation was evidenced within the range of *Coffea* species analysed. More than 50% of the amplified DNA fragments differed between all pairwise species. A hierarchical clustering analysis (Benzecri 1973) was performed to generate a dendrogram showing genetic relationships between accessions (Figure 1). The coffee species from West Africa (*C. canephora*, *C. liberica*, *C. congensis* and *C. stenophylla*), and from the highland forest of Kenya and Ethiopia (*C. arabica* and *C. eugenioides*) present a high similarity and constitute a first group. The different accessions of *C. canephora* as well as the two accessions of *C. liberica* cluster before they join the clusters of other species. *C. resinosa* originated in Madagascar and appears distantly related to all species surveyed and forms a second group. *C. pseudozanguebariae* indigenous to the coastal region of East Africa also presents a low similarity with all species analysed. Only *C. sp.* A801, accession unidentified, appears closely related to *C. pseudozanguebariae*. These results are consistent with the classification in three sections proposed by Berthaud (1986) based on morphological and cytological studies: *Erythrocoffea*, *Mozambicoffea* and *Mascarocoffea* including respectively *Coffea* species from West and Central Africa, the Indian Ocean coast of East Africa and Madagascar.

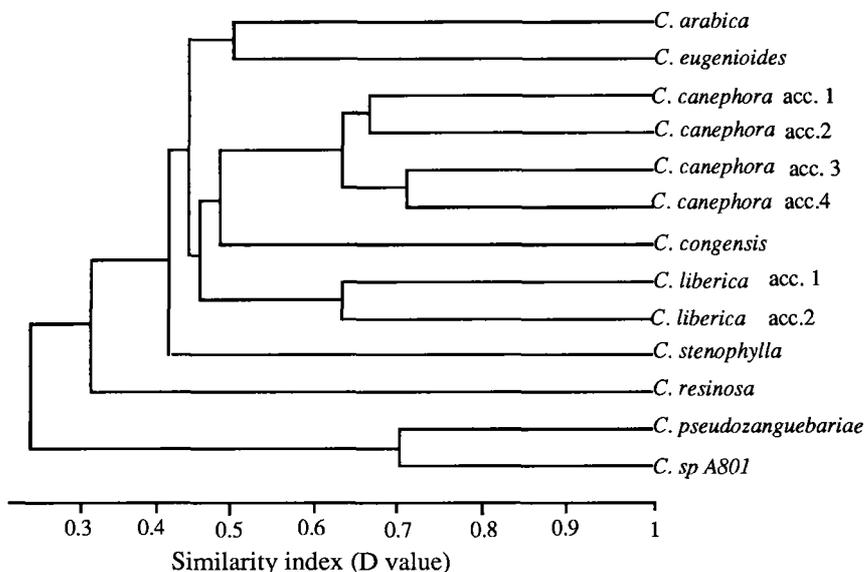


Figure 1: Dendrogram showing genetic relationships between *Coffea* accessions constructed by hierarchical clustering analysis using RAPD markers.

RFLP analysis of chloroplastic DNA

Analysis of the chloroplast genome (cpDNA) has proved to be a very powerful approach for determining phylogenetic relationships among populations and species (Hooglander & al., 1993 ; Dally & Second, 1990 ; White, 1990 ; Sytsma & Gottlieb, 1986 ; Wilson & al., 1992). The cpDNA is circular and usually ranges in size from 120 to 150 kilobase pairs (Pillay, 1993). Its gene organization and nucleotide order are extremely conserved through evolutionary time and make it an ideal target for plant phylogenetic study. Estimates of cpDNA variability can be obtained by comparison of cpDNA restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Jansen & al., 1990 ; Bremer, 1991).

The purpose of the current study is 1) to determine levels of cpDNA variation within and between *Coffea* species and 2) to determine relationships among *Coffea* species by chloroplast DNA phylogeny.

Species	Accession (Code/population)	Origin
<i>C. arabica</i>	ET 12-5	Ethiopia
<i>C. arabica</i>	Hibrido de Timor	Timor island
<i>C. bertrandi</i>	HA5K	Madagascar
<i>C. brevipes</i>	Mt Cameroun	Cameroon
<i>C. brevipes</i>	Kumba Loum	Cameroon
<i>C. brevipes</i>	var. <i>heterocalyx</i>	
<i>C. canephora</i>	IF A25	
<i>C. canephora</i>	BB7	Congo
<i>C. canephora</i>	BC8 (de la Nana)	Central African Rep.
<i>C. canephora</i>	BD10 (Mt Cameroun)	Cameroon
<i>C. congensis</i>	CA9	Central African Rep.
<i>C. congensis</i>	CB9	Cameroon
<i>C. eugenioides</i>	A16	Kenya
<i>C. farafanganensis</i>	A 208	Madagascar
<i>C. humilis</i>	G2	Ivory Coast
<i>C. liberica</i>	EA1 (var. <i>liberica</i>)	Ivory Coast
<i>C. liberica</i>	EB25 (var. <i>dewevrei</i>)	Central African Rep.
<i>C. millotii</i>	CM1	Madagascar
<i>C. perieri</i>		Madagascar
<i>C. pseudozanguebariae</i>	H35	Kenya
<i>C. racemosa</i>	IB9	Tanzania
<i>C. racemosa</i>	IA10	Mozambique
<i>C. sessiliflora</i>	PA4 (Shimba)	Kenya
<i>C. stenophylla</i>	FB1 (Assabli)	Ivory Coast
<i>C. stenophylla</i>	FA21 (Ira)	Ivory Coast

Table 1: Accessions used for RFLP analysis of chloroplastic DNA.

Twenty-five accessions representing 15 *Coffea* species were analysed. Code and origin of samples are listed in table 1. All material came from the ORSTOM genetic resources collection except IF A25, a cultivated clone of *C. canephora*. *C. brevipes* var. *heterocalyx* is an accession the origin of which is unknown (Anthony, 1991). Total DNA samples were extracted from leaves. Freeze-dried tissue (1 g dry weight) was mechanically ground to fine powder, dispersed in MATAB extraction buffer (TrisHcl 0.1M, NaCl 1.25M, EDTA 0.02M, MixedAlkylTriMethylAmoniumBromide 2%, β mercaptoethanol) and incubated at 60°C for 30 min. with slow rocking. After two consecutive chloroform:isoamyl alcohol (24:1) extractions the aqueous phase was transferred. DNA was precipitated with isopropanol and resuspended in TRIS-EDTA buffer. Following a second precipitation with ethanol, DNA was washed in 76% ethanol, dried onto a Kimwipe and resuspended in TRIS-EDTA buffer. Total DNA from each sample was digested singly to completion with Eco RI and with Eco RV restriction enzymes. After electrophoresis, restriction fragments were transferred to a nylon membrane (Hybond N+) under alkaline condition.

Fifteen clones of *Lactuca sativa* cpDNA *SacI* fragments served as heterologous chloroplast DNA probes for southern analysis (Jansen and Palmer, 1987). These fragments represent approximately 95% of the

Lactuca chloroplastic genome (150Kb). CpDNA inserts were radiolabelled by random priming. Prehybridization, hybridization and wash were performed in accordance with manufacturer's recommendations. Autoradiography was carried out using Amersham Hyperfilm-MP film at -80°C.

Hybridization of the 15 cpDNA probes to Southern blots obtained for both enzymes revealed a total of 101 restriction fragments but only 33 fragments were phylogenetically informative. Differences between the endonuclease/probe combinations were observed. RFLPs were detected by only 6 of the 15 cpDNA probes, and digestion with *EcoRV* revealed significantly more polymorphism than the *EcoRI* digests. The chloroplast genome of *Coffea* species showed a high degree of colinearity with the *Lactuca* genome, as has been observed in angiosperm and several other *Rubiaceae* (Bremer and Jansen, 1991).

Interpretation of banding patterns was undertaken. Presence of either restriction-site mutation or length mutation was considered. It was assumed that variability was due to restriction-site polymorphism if the sum of the two restriction fragments equalled the size of a missing fragment. Six different restriction-site mutations were unambiguously identified.

Combinations of these six restriction-sites mutations produced 8 different plastotypes. Pairwise distance (Jaccard index) between all individual genotypes were calculated and entered into a distance matrix program (PHILYP computer package ; Felsenstein, 1987) to generate a UPGMA tree (unweighted pair group of matrix average). The number of site-mutations was considered too low to construct parsimony phylogenetic trees.

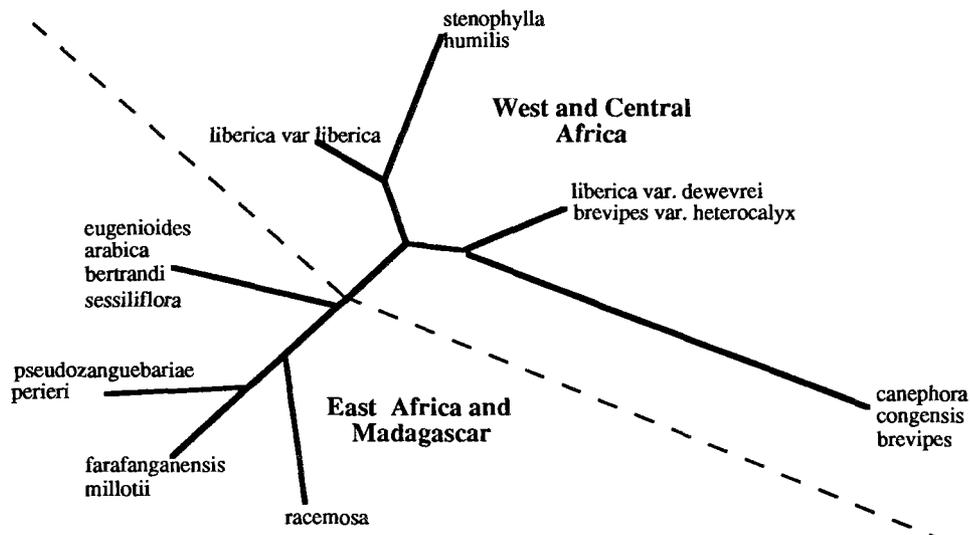


Figure 2: Dendrogram showing genetic relationships between *Coffea* species based on preliminary chloroplastic data.

The clustering analysis is presented in figure 2. Despite the low number of site mutations considered, we were able to distinguished most *Coffea* species.

The main separation was found between the group constituted by *C.canephora* / *C.congensis* / *C.brevipes* , and other species, but caution needs to be exercised in interpretation of this dendrogram. Identification of additional site mutation changes is required for further analysis.

Intraspecific variations were found in *C. liberica* and *C. brevipes*. The identification of several restriction-site changes between *liberica* variety *liberica* and *liberica* variety *dewevrei* was to be expected since the two varieties present large morphological differences and their hybrid shows a reduced fertility (Louarn, 1993). Regarding *C. brevipes*, it has been already proposed to consider the taxa *C. brevipes* variety *heterocalyx* distinct from *C. brevipes* (Louarn, 1992).

Conclusion and prospects

In recent years, molecular marker techniques have gained widespread applications in many fields of plant genetics and evolution. With regards to the analysis of the genetic diversity of coffee, both RAPD and RFLP marker techniques offer unique opportunity and will be of great interest.

RAPD assay provides a highly effective and convenient means to "fingerprint" coffee plants. This method should therefore be of high value for germplasm characterization and genetic resource maintenance in *Coffea*. Applications could include fingerprinting of genotype, identification of duplicate samples and analysis of genetic diversity in a collection. The usefulness of RAPD markers for genetic mapping has been largely reported (Carlson et al., 1991; Klein-Lankhorst et al., 1991; Martin et al., 1991). In connection with assisted backcross-breeding (Tanksley et al., 1989), RAPD technology is obviously a very powerful tool to increase the effectiveness of introgression to cultivated species of desirable traits (e.g. rust resistance) from wild coffee material or spontaneous hybrid such as Hibrido de Timor.

RFLP analysis of chloroplastic DNA appeared as a very attractive approach for determining phylogenetic relationships among *Coffea* species. Highly informative genetic variations were evidenced in this preliminary study despite the limited number of restriction enzymes assayed. This study on chloroplastic DNA will be extended to a higher number of species.

Summary

Molecular markers techniques provide suitable tools for analysis of genetic diversity and phylogenetic relationships in *Coffea* species. Two preliminary studies are reported:

-Arbitrary oligonucleotides were used as primers to amplify genomic DNA of different coffee accessions (representing major *Coffea* species) by polymerase chain reaction. Extensive interspecific variation was observed, intraspecific variation was easily detected in *C. canephora* and *C. liberica*. Random amplified DNA markers appeared to be of high value for characterization, analysis and utilization of coffee genetic resources.

-A set of 15 chloroplastic DNA fragments from *Lactuca sativa* were used to probe southern blot of total DNA of 25 *Coffea* accessions digested by 2 restriction endonucleases. Nine of the 30 enzymes/probes combinations show polymorphism. Six polymorphic restriction-sites were evidenced. Height different plastotypes were identified. The low level of interspecific variation detected was enough to give phylogenetic information.

References

- Anthony F., Clifford M.N. & Noirot M., 1989. La diversité biochimique dans les genres *Coffea* et *Psilanthus*. 13th Conference of ASIC, Paipa (Colombie), pp 474-484.
- Anthony F., 1991. Les ressources génétiques des Caféiers. Thèse, université de Paris -Sud Orsay. 317p.
- Bertaud J., & Charrier A., 1988. Genetics resources of Coffea. In: R J Clarke and R Macrae (eds) Coffee vol 4 : Agronomy. Elsevier Applied Science, London, pp 1-42.
- Berthou F., Mathieu C. & Vedel F. 1983. Chloroplast and mitochondrial DNA variation as indicator of phylogenetic relationships in the genus *Coffea* L. Theor Appl Genet 65:77-84.
- Berthou F., Trouslot P., Hamon S., Vedel F. & Quetier F., 1980. 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 24:313-326.
- Bremer B. & Jansen R.K., 1991. Comparative restriction site mapping of chloroplast DNA implies new phylogenetic relationships within rubiaceae. American Journal of Botany 78:198-213.
- Carlson J.E., Tulsieram L.K., Glaubitz J.C., Luk V.W.K., Kauffeldt C., Rutledge R., 1991. Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. Theor Appl Genet 83:194-200.
- Charrier A., 1977. La structure génétique du genre *Coffea* ; ses conséquences pour l'amélioration des caféiers cultivés. 8th Conference of ASIC, Abidjan (Ivory Coast), pp 407-410.

- Cros J., Gavalda M.C., Chabrillange N., Recalt C., Duperray C. & Hamon S., 1993. Variation du contenu en ADN nucléaire chez les caféiers. 15th Conference of ASIC, Montpellier (France), Abstract B2.
- Dally A.M. & Second G., 1990. Chloroplast DNA diversity in wild and cultivated species of rice (Genus *Oryza*, section *Oryza*). Cladistic-mutation and genetic-distance analysis. *Theor Appl Genet* 80:209-222.
- Hooglander N., Lumaret R. & Bos M., 1993. Inter-intraspecific variation of chloroplast DNA of European *Plantago* spp. *Heredity* 70:322-334.
- Jansen R.K., Holsinger K.E., Michaels H.J. & Palmer J.D., 1990. Phylogenetic analysis of chloroplast DNA restriction site data at higher taxonomic levels: an example from the *Asteraceae*. *Evolution* 44:2089-2105.
- Klein-Lankhorst R.M., Vermunt A., Weide R., Liharska T., Zabel P., 1991. Isolation of molecular markers for tomato using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theor Appl Genet* 83:108-114.
- Lashermes P., Cros J., Marmey P. & Charrier A., 1993. Use of random amplified DNA markers to analyze genetic variability and relationships of *Coffea* species. *Genetic Resources and Crop Evolution* (in press).
- Louarn J., 1982. Bilan des hybridations interspécifiques entre caféiers africains diploïdes en collection en Côte d'Ivoire. 10th Conference of ASIC, Salvador (Brazil), pp369-374.
- Louarn J., 1992. La fertilité des hybrides interspécifiques et les relations génomiques entre caféiers diploïdes d'origine africaine (Genre *Coffea* sous genre *Coffea*) Thèse, Université de Paris -Sud centre d'Orsay. 200p.
- Louarn J., 1993. Structure génétique des caféiers africains diploïdes basée sur la fertilité des hybrides interspécifiques 15th Conference of ASIC, Montpellier (France).
- Martin G.B., Williams J.G.K., Tanksley S.D. 1991. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. *Proc Natl Acad Sci* 88:2336-2340.
- Moreno G., 1989. Etude du polymorphisme de l'hybride de Timor en vue de l'amélioration du caféier *arabica*. Thèse de Docteur-ingénieur, ENSA Montpellier, France, 127p.
- Pillay M., 1993. Chloroplast genome organization of brome grass, *Bromus inermis* Leyss. *Theor Appl Genet* 86:281-287.
- Rakotomalala J.J., Cros E., Anthony F., Noirot M. & Charrier A., 1993. Marqueurs biochimiques de la diversité des caféiers. 15th Conference of ASIC, Montpellier (France), Abstract B5.
- Sytsma K.J. & Gottlieb L.D., 1986. Chloroplast DNA evolution and phylogenetic relationships in *Clarkia* sect. *Perispetasma* (Onagraceae). *Evolution* 40:1248-1261.
- Tanksley S.D., Young N.D., Paterson A.H., Bonierbale M.W., 1989. RFLP mapping in plant breeding : new tools for an old science. *Biotechnology* 7:257-264.
- Wetton J.H., Carter R.E., Parkin D.T. & Walter D., 1987. Demographic study of a wild house sparrow population by DNA fingerprinting. *Nature* 327:147-149.
- White E.E., 1990. Chloroplast DNA in *Pinus monticola*. *Theor Appl Genet* 79:119-124.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A. & Tingey S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* vol. 18:6531-6535.
- Wilson H.D., Doebley J. & Duvall M., 1992. Chloroplast DNA diversity among wild and cultivated members of *Cucurbita* (Cucurbitaceae). *Theor Appl Genet* 84:859-865.

MARQUEURS BIOCHIMIQUES DE LA DIVERSITÉ DES CAFÉIERS

J.-J. R. RAKOTOMALALA ¹, E. CROS ², A. CHARRIER ³, F. ANTHONY ³, M. NOIROT ³

¹ Programme Café, Département de Recherches Agronomiques, FOFIFA, Antananarivo (101), Madagascar

² Laboratoire de Chimie-Technologie, I.R.C.C., Département des Plantes Pérennes, CIRAD Montpellier, France

³ Laboratoire de Ressources Génétiques et d'Amélioration des Plantes Tropicales, ORSTOM Montpellier, France

INTRODUCTION

Deux espèces de caféiers, *Coffea arabica* et *C. canephora*, sont cultivées dans le monde alors qu'actuellement on connaît plus d'une centaine d'espèces botaniques. Les variations morphologiques sont telles qu'il est difficile d'établir des subdivisions systématiques entièrement satisfaisantes. La dernière classification proposée par BRIDSON (1987) divise les caféiers en deux genres, *Coffea* et *Psilanthus*, lesquels sont également subdivisés en deux sous-genres. Nous nous intéresserons uniquement au sous-genre *Coffea*, le plus riche, qui rassemble les espèces agronomiquement intéressantes.

Tous les peuplements spontanés du sous-genre *Coffea* sont endémiques de la zone intertropicale africaine. Ils se répartissent en trois ensembles biogéographiques :

- 1- en Afrique centrale et occidentale, les caféiers (*C. canephora*, *C. liberica*, *C. congensis*) sont de grande taille, à long cycle de fructification, à teneur moyenne à élevée en caféine ;
- 2- en Afrique orientale, les caféiers (*C. arabica*, *C. racemosa*, *C. sessiliflora*, *C. eugenioides*, *C. pseudozanguebariae* ...) sont de taille plus petite, ont un cycle de fructification plus court et contiennent moins de caféine ;
- 3- dans la région malgache, on rencontre une multitude de taxons présentant une grande diversité visible aux niveaux de la morphologie, de la phénologie, de l'adaptation édapho-climatique et de la qualité organoleptique des graines. CHEVALIER (1938) a créé la section des *Mascarocoffea* pour séparer ces caféiers, réputés sans caféine, des caféiers africains à caféine, nommés *Eucoffea*. Les botanistes ont proposé une classification des taxons malgaches en sept séries : *Verae*, *Mauritanae*, *Humboldtianae*, *Multiflorae*, *Millotii*, *Garcinioides* et *Subterminales*.

Les méthodes utilisées pour comprendre la structure de la diversité des caféiers ont été nombreuses et variées : la biosystématique et la taxinomie numérique (CHARRIER, 1978), les isozymes et les caractéristiques morpho-physiologiques (BERTHAUD, 1986 ; ANTHONY, 1992). Du point de vue chimiotaxinomique, les travaux touchant le sous-genre *Coffea* sont limités et concernent généralement un nombre restreint d'espèces (CHASSEVENT *et al.*, 1974 ; LOPES et MONACO, 1979 ; COLONNA, 1979 ; MAZZAFERA, 1991). CLIFFORD *et al.* (1989) puis ANTHONY *et al.* (1989) ont analysé la variabilité biochimique d'un large éventail d'échantillons, mais essentiellement d'origine africaine.

Notre travail est centré sur la diversité de la composition chimique des graines de *Mascarocoffea*, en comparaison avec celle de quelques *Eucoffea*.

1.- MATERIEL ET METHODES

1.1.- Le matériel végétal

Le matériel végétal étudié est composé de :

- 14 échantillons appartenant à 9 espèces africaines ; 5 sont originaires de l'Afrique occidentale et centrale (*C. arabica*, *C. canephora*, *C. congensis*, *C. liberica* et *C. kapakata*) et 4 de l'Afrique orientale (*C. eugenoides*, *C. racemosa*, *C. sessiliflora* et *C. pseudozanguebariae*),
- 56 échantillons de caféiers malgaches appartenant à environ 25 taxons dont 10 ne sont pas décrits dans les flores. Ces échantillons représentent chacun un peuplement et sont répartis dans toutes les séries botaniques définies par CHEVALIER (1947).

1.2.- Les composés chimiques analysés

Nous avons analysé des métabolites secondaires appartenant à trois familles de composés : les acides hydroxycinnamiques, les bases puriques et les diterpènes glycosidiques. Ces composés interviennent dans la qualité organoleptique du café-boisson et sont caractérisés par :

- leur stabilité chimique dans les graines matures car ils ne participent plus au métabolisme de la plante,
- une importante diversité structurale reposant sur la substitution de groupements fonctionnels simples (méthyl ou hydroxyl), ou par leur forme de condensation (ester ou ether) avec d'autres molécules (acide quinique, glucose, tryptophane...)
- leur absorption dans l'UV, ce qui facilite leur repérage mutuel et leur caractérisation.

1.3.- Les méthodes d'analyse chimique

Les composés contenus dans les broyats de graines matures ont été extraits suivant la méthode mise au point par FLEURIET et MACHEIX (1972) pour le dosage des acides phénols. Il s'agit d'une extraction alcoolique délipidée à l'ether de pétrole et purifiée par l'acétate d'éthyle. Cette méthode excellente pour les dérivés hydroxycinnamiques s'avère médiocre pour l'épuisement des bases puriques et des diterpènes glycosidiques. La méthode de VITZTHUM *et al.* (1974) a été adoptée pour l'extraction des bases puriques, tandis que les diterpènes glycosidiques ont été séparés sur colonne de polyamide à partir de la phase aqueuse, puis purifiés au réactif de Carrez selon la technique mise au point par CLIFFORD (1985).

Les analyses reposant essentiellement sur l'utilisation de l'HPLC (analytique et semi-préparative) ont été réalisées au Laboratoire de Chimie-Technologie de l'IRCC/CIRAD à Montpellier. L'identification des composés, appuyée par différentes techniques d'hydrolyse (alcaline, acide et enzymatique), est confirmée par la comparaison de leurs caractéristiques chromatographiques (RT) et spectrales (UV, SM) avec celles de témoins commerciaux.

2.- RESULTATS DES ANALYSES CHIMIQUES

2.1.- Les caféiers cultivés

Nous n'avons pas rencontré de difficultés majeures pour déterminer les composés extraits des graines de *C. canephora* et de *C. arabica*. Les chromatogrammes obtenus (fig. 1) montrent deux types de composés :

- des composés majeurs parfaitement identifiés qui sont les isomères de l'acide caféique (les acides caféyl 3, 4 et 5 quinique, et les acides dicaféyl 3-4, 3-5 et 4-5 quinique), l'acide férulyl 5 quinique et la caféyl tryptophane. La caféine est la seule base purique présente et aucun diterpène glycosidique n'a été détecté.

- des composés mineurs dont l'identification est généralement basée sur la comparaison de leurs caractéristiques chromatographiques et UV à celles décrites dans la littérature : les acides férulyl 3 et 4 quiniques, les isomères dicaféylférulyl quiniques et la caféyltyrosine.

Les deux espèces cultivées diffèrent principalement par la présence de l'acide *p*-coumaryl 5-quinique en quantité appréciable chez *C. arabica*.

2.2.- Les caféiers sauvages

Les caféiers sauvages présentent une diversité chimique beaucoup plus importante que celle des caféiers cultivés (fig.2).

2.2.1.- Les dérivés des acides hydroxycinnamiques

Dans l'extrait méthanolique des caféiers sauvages malgaches, nous n'avons pu caractériser avec assurance que l'acide caféyl 5-quinique. L'application des différentes techniques d'hydrolyse permet d'affirmer la présence de dérivés des molécules suivantes :

- l'acide *p*-coumarique,
- l'acide *o*-coumarique,
- l'acide 4-méthoxycinnamique,
- l'acide sinapique,
- l'acide diméthoxy 3,4-cinnamique,
- l'acide triméthoxy 3,4,5-cinnamique,
- et l'acide caféique, présent chez tous les caféiers,
- ainsi que l'acide férulique, largement distribué.

Pour les caféiers sauvages africains analysés, les dérivés hydroxycinnamiques détectés sont limités aux deux acides principaux des caféiers cultivés (acide caféique et acide férulique). l'acide *p*-coumarique présent chez *C. arabica* a été retrouvé chez *C. kapakata*, endémique d'Angola.

2.2.2.- Les bases puriques

Concernant les bases puriques, nous avons trouvé de la caféine chez deux taxons sauvages malgaches (*C. lancifolia* et *C. kianjavatensis*) avec des teneurs allant jusqu'à 0,8% MS (CLIFFORD *et al.*, 1991). Cette découverte est importante car elle remet en cause les assertions antérieures qui stipulaient que tous les *Mascarocoffea* produisent des graines dépourvues de caféine. En plus de la caféine, nous avons également mis en évidence dans les mêmes caféiers la théobromine (0,03 à 0,08% MS)[RAKOTOMALALA *et al.*, 1992] et la théacrine (1,46% MS) chez le peuplement A602 de *C. kianjavatensis*.

Parmi les caféiers sauvages africains, nous avons détecté, en plus de la caféine des traces de théobromine et de la théophylline (0,07 à 0,20% MS) chez *C. racemosa* et *C. sessiliflora*. Nous avons également confirmé l'absence de la caféine chez *C. pseudozanguebariae*.

2.2.3.- Les diterpènes glycosidiques

Les diterpènes glycosidiques ont été plus difficiles à caractériser. Dans l'état actuel de notre étude, nous pouvons dire que des composés chromophores ayant des structures isomères diversifiées existent en quantités importantes chez de nombreux caféiers sauvages malgaches ainsi que chez l'espèce africaine *C. pseudozanguebariae*. Leur spectres UV correspondent à ceux des diterpènes glycosidiques rapportés dans la littérature. Par hydrolyse acide, nous avons montré l'existence probable de sucres liés à l'aglycone. Par contre, l'hydrolyse enzymatique avec la α -glucosidase n'a été efficace que pour le composé présumé mascaroside qu'on trouve sous forme majeure chez *C. humblotiana*, *C. farafanganensis*, *C. richardii* et en plus petite quantité chez *C. viamneyi*. La même enzyme et l' β -glucosidase, appliquées dans les mêmes conditions sur le diterpène de *C. pseudozanguebariae*, sont complètement inopérantes. L'hydrolyse acide aboutit à la formation de plus de 4 pics majeurs apolaires. Ces résultats rejoignent les observations de CLIFFORD (communication personnelle) mais sont en contradiction avec celles de PREWO *et al.* (1990) qui attribuent au mozambioside la structure de l'hétéroside majeur naturel de *C. pseudozanguebariae*.

L'inventaire des composés identifiés pour l'ensemble des caféiers étudiés est résumé dans le tableau 1.

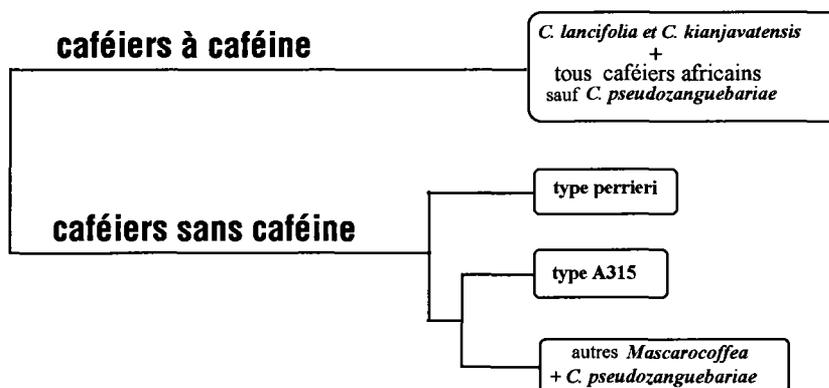
3.- ETUDE DE LA DIVERSITE BIOCHIMIQUE DES CAFEIERS

L'analyse de nos données par les méthodes statistiques classiques et les analyses multivariées permet de comprendre l'organisation de cette diversité. Notre étude intègre à la fois les différences qualitatives et les variations quantitatives des trois familles de composés biochimiques. Les descripteurs qualitatifs correspondent au codage de leur présence/absence. Les descripteurs quantitatifs sont estimés par la teneur de ces composés. L'acide chlorogénique *s.s.* et ses deux isomères monocaféyl quiniques sont les seuls composés représentés dans tous les échantillons. Les fortes variations de leur teneurs, de 0,16 à 7,5% MS (soit un rapport de 1/45), justifie amplement leur prise en compte dans l'analyse. Le caféate de méthyle (produit accumulé lors de la transestérification des dérivés caféiques par hydrolyse au TMAH) sert de base pour la comparaison quantitative des esters méthyliques des autres acides phénols.

3.1.- Analyse globale de la diversité

L'analyse globale de la diversité est résumée par la classification ascendante hiérarchique (CAH) de la figure 3. Le sous-genre *Coffea* est divisé du point de vue composition chimique en deux groupes fondamentaux : les caféiers à caféine et les caféiers sans caféine.

Figure 3 : Différenciation des peuplements de caféiers établie à partir de classification ascendante hiérarchique



1°) Le groupe des "caféiers à caféine" contient 2 taxons malgaches de la série *Verae*, *C. lancifolia* et *C. kianjavatensis*, et tous les caféiers africains sauf *C. pseudozanguebariae*. Ces caféiers sont caractérisés par la présence de la caféine variant de 0,3% MS chez *C. eugenioides* à plus de 2% MS chez *C. canephora*. Leurs teneurs en acides monocaféyl quiniques sont généralement élevées (1,5% à 7% MS) et ils ne contiennent pas de diterpènes glycosidiques chromophores.

2°) Le groupe des "caféiers sans caféine" est composé de l'espèce est-africaine *C. pseudozanguebariae* et de tous les caféiers malgaches à l'exception des deux taxons de la série *Verae* appartenant au groupe précédent. Leurs caractéristiques principales sont :

- l'absence de caféine dans les graines ou sa présence seulement sous forme de traces (<0,05% MS),
- la faible teneur en acides monocaféyl quiniques (rarement supérieure à 1% MS),
- et une diversification importante de leur contenu en composés rares.

3.2.- Subdivisions liées aux composés rares

La répartition des composés rares met en évidence l'existence de subdivisions plus élaborées au sein des grands groupes botaniques définis par CHEVALIER (1947) :

Chez les *Eucoffea*,

- *C. arabica* et *C. kapakata* se distinguent des autres taxons par la présence en quantité relativement élevée de l'acide *p*-coumaryl 5-quinique,
- *C. racemosa* et *C. sessiliflora* par la présence à la fois de théobromine et de théophylline,
- et *C. canephora* par des teneurs importantes en diesters apolaires.

Chez les *Mascarocoffea*,

- Les subdivisions mises en évidence par les composés rares interviennent d'abord au sein des séries botaniques. La situation rencontrée dans les séries *Verae*, *Multiflorae* et *Complexe Millotii* illustre bien ces subdivisions :

- Dans la série *Verae*, *C. lancifolia* et *C. kianjavatensis*, qui diffèrent nettement de *C. homollei* par la présence de la caféine, se distinguent des espèces africaines du groupe des "caféiers à caféine" par la présence de la théobromine ;
- Chez les *Multiflorae*, les peuplements de *C. perrieri* (A12, A305, A421 et A724) sont caractérisés par leur contenu en dérivés di et triméthoxycinnamiques ; tandis que *C. andrambovatensis* A227 et d'autres taxons affines (*C. sp* A315, A311, A507, A525, A808) se singularisent par la présence de mélilotoside (δ -glucoside de l'acide *trans-o*-coumarique)
- Dans le *Complexe Millotii*, deux sous-groupes biochimiques ressortent des analyses :
 - 1- d'un côté les taxons macrophyllés à diterpènes glycosidiques (*C. richardii*, *C. farafanganensis*)
 - 2- de l'autre, la majorité des peuplements *millotii* (*C. millotii*, *C. ambodirienensis*, *C. dolichophylla* ...) caractérisée par des chromatogrammes pauvres en composés où le seul pic majeur est l'acide caféyl 5-quinique.

D'autres différences existent au sein des séries *Subterminales*, *Mauritianaes* et *Humblotianaes*. Par contre, la série *Garcinioides* apparaît remarquablement homogène malgré un fort polymorphisme morphologique.

Par ailleurs, certaines différenciations apparaissent aussi au niveau infra-spécifique avec les exemples frappants suivants :

- chez *C. kianjavatensis*, la population A602 s'écarte nettement de l'autre population A213 par une très forte teneur en acides monocaféyl quiniques (7,54% MS) et une quantité élevée de théacrine (1,46% MS) et de théobromine (0,36% MS),
- chez *C. vianneyi*, la population A946 diffère du peuplement A20 par une plus grande quantité de diterpène glycosidique lequel se trouve en outre sous forme estérifiée.

Un autre résultat important est révélé par les analyses statistiques : il s'agit de l'existence d'un continuum de la composition chimique qu'illustrent les arborescences des CAH et plus concrètement par la variation continue de la teneur en caféine que l'on a détectée sous forme de traces chez de nombreux taxons du groupe sans caféine. Cette absence de discontinuité franche que l'on doit considérer en parallèle avec l'absence de barrière stricte à l'hybridation évoquée par CHARRIER (1978) indique que tous les taxons ne sont pas encore arrivés à accéder au statut d'espèces biologiques. Le concept de "complexes d'espèces" introduit par PERNES et LOURD (1984) s'adapte mieux à cette structuration de la diversité.

CONCLUSIONS

Le sous-genre *Coffea* est subdivisé chimiquement en deux groupes fondamentaux : "les caféiers à caféine" et "les caféiers sans caféine". Deux taxons malgaches de la série *Verae* se rattachent bien au premier groupe et une espèce Est-africaine, *C. pseudozanguebariae*, possédant un chimiotype semblable à celui de nombreux taxons malgaches, se classe clairement dans le deuxième groupe. La puissance de l'outil chimiotaxinomique s'exprime dans la mise en évidence de subdivisions au sein de chacun de ces groupes. Au niveau infra-spécifique, des composés rares caractérisent des peuplements précis et peuvent donc servir de marqueurs. Ces marqueurs sont probablement très utiles pour la constitution de "core collection" selon le concept de FRANKEL et BROWN (1984).

Une conséquence de nos travaux a trait, d'une part, à la classification botanique des caféiers. Il paraît nécessaire de la réviser. La réunion des caféiers africains dans la section *Eucoffea* et des caféiers malgaches dans la section des *Mascarocoffea* masque une hétérogénéité de la composition chimique des grains. Celle-ci ne coïncide pas avec l'origine géographique, contrairement à la définition des sections donnée par CHEVALIER (1947). D'autre part, la découverte de l'ensemble de la diversité chimique dans la région malgache et la présence en Afrique de l'Est d'espèces chimiquement affines de plusieurs espèces malgaches constituent des arguments qui s'accordent avec l'hypothèse de LEROY (1982), sur l'origine kényane des caféiers, et celle d'ANTHONY (1992), sur leur mode de dispersion entre le continent et les îles.

Un autre point important à souligner dans cette étude est le foisonnement de chimiotypes qu'on observe en parallèle avec la multitude des types morphologiques existant dans la région malgache. Cette situation est conforme à l'aspect général de la spéciation observée chez les plantes supérieures endémiques de cette région. Il s'agit d'une flore ancienne, conservée et modelée par l'existence de microclimats liés à l'insularité et aux variations importantes du relief et du sol (GUILLAUMET et MANGENOT, 1975). Dans ce cadre, la sélection naturelle s'effectue dans des peuplements à faible effectif. Il s'en suit une fixation au hasard qui détermine une homogénéisation appelée dérive génétique (WRIGHT, 1931), renforcée par les croisements entre apparentés. Cette fixation est toutefois limitée par le mode de reproduction allogame qui favorise le maintien de l'hétérozygotie de certains caractères.

Concernant l'hérédité des marqueurs chimiques, les observations effectuées sur les hybrides entre caféiers cultivés et caféiers sauvages (RAKOTOMALALA, 1992) révèlent une dominance des caféiers cultivés dans la transmission des composés majeurs (acide chlorogénique s.s., caféine). Nous avons cependant constaté qu'une ségrégation importante se produit dans les descendance des retcroisements ainsi que la restauration de leur fertilité.

Nous avons pu constater par ailleurs que presque tous les composés de la série cinnamique et la majorité des bases puriques ont été trouvés chez les caféiers. Cette plante tropicale constituerait donc un matériel privilégié pour clarifier les voies restées hypothétiques du métabolisme général de ces composés.

Résumé

Grâce à leur variabilité structurale, leur stabilité et leur répartition qualitative et quantitative dans les graines, trois familles de composés (les dérivés hydroxycinnamiques, les bases puriques et les diterpènes glycosidiques) se prêtent parfaitement à l'étude de la diversité des caféiers. Elle a porté sur 56 peuplements sauvages malgaches (*Mascarocoffea*) et 14 échantillons représentant 9 espèces africaines (*Eucoffea*). Deux compartiments biochimiques fondamentaux sont distingués dans le sous-genre *Coffea* : "les caféiers à caféine" et "les caféiers sans caféine".

- 1) Les caféiers à caféine rassemblent tous les caféiers africains (sauf *C. pseudozanguebariae*) et deux taxons malgaches de la série *Verae* (*C. lancifolia* et *C. kianjavatensis*). Leurs teneurs en acides monocaféylquiniques sont généralement élevées (1,5 à 7,5% MS). Ils ne contiennent pas de diterpènes glycosidiques.
- 2) Les caféiers sans caféine regroupent tous les caféiers sauvages de la région malgache (à l'exception des taxons de la série *Verae* ci-dessus) et l'espèce sauvage Est-africaine *C. pseudozanguebariae*. Ils se caractérisent par de faibles teneurs en acides monocaféylquiniques, et une diversification importante de leur contenu en composés rares (ac. *o*-coumarique, ac. méthoxycinnamiques, théacrine...).

Au sein de ces deux grands ensembles, la répartition des composés rares met en évidence d'autres subdivisions au niveau infragénérique et au niveau infraspécifique. Ces résultats conduisent à réviser la classification des caféiers.

Summary

The systematic study of hydroxycinnamic acid, purine and glycosidic diterpene composition was carried out on beans from mature fruits of 56 populations of wild Madagascan coffee trees (*Mascarocoffea*), 14 accessions representing 9 African coffee species (*Eucoffea*). Due to their chemical characteristics and sampling distribution, such compounds are particularly well suited for diversity study. Two basic biochemical groups were characterized in the subgenus *Coffea* : "caffeine-coffee trees" and "caffeine-free coffee trees".

- 1) Caffeine coffee trees included all African species except of *C. pseudozanguebariae*, and two Madagascan taxa (*C. lancifolia* and *C. kianjavatensis*). Their contents in monocafeylquinic acids was generally high (1.5 to 7.5% DW) and they did not contain glycosidic diterpene.

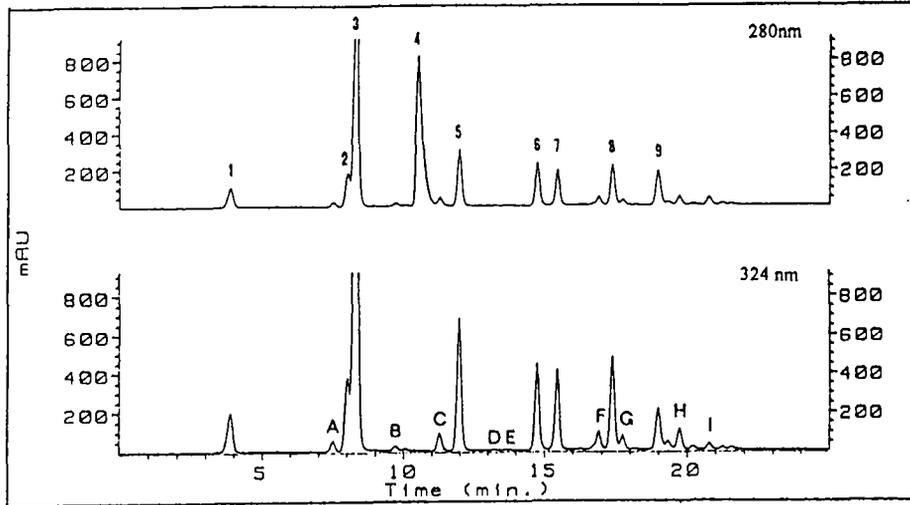
- 2) Caffeine-free coffee trees comprized all the wild Madagascan coffee species (except *C. lancifolia* and *C. kianjavatensis*) and the wild Est-African species *C. pseudozanguebariae*. They were characterized by a low content in monocafeylquinic acids and large qualitative variations reflecting a high biochemical diversity.

Distribution analysis of uncommon and accession-specific compounds allowed to constitute sub-groups at the infrageneric and infraspecific level. These results suggest a re-examination of the classification of coffee trees.

BIBLIOGRAPHIE

- ANTHONY F., 1992. Les ressources génétiques des caféiers. Collecte, gestion d'un conservatoire et évaluation de la diversité génétique. Travaux et Documents de l'ORSTOM, N°81, 320 p..
- ANTHONY F., CLIFFORD M.N., NOIROT M., 1989. La diversité biochimique dans le genre *Coffea* et *Psilanthus*. 13è Colloque de l'A.S.I.C., Paipa (Colombie), 474-484.
- BERTHAUD J., 1986. Les ressources génétiques pour l'amélioration des caféiers africains diploïdes : évaluation de la richesse génétique des populations sylvestres et de ses mécanismes organisateurs. Conséquences pour l'application. Travaux et Documents de l'ORSTOM, 188, 372 p..
- BRIDSON D., 1987. Nomenclatural notes on *Psilanthus*, including *Coffea* sect. *Paracoffea* (Rubiaceae tribe Coffeae). Kew Bulletin, 42, 817-859.
- CHARRIER A., 1978a. La structure génétique des caféiers spontanés de la région malgache (*Mascarocoffea*). Leurs relations avec les caféiers d'origine africaine (*Eucoffea*). Mémoires ORSTOM, 87, 223p..
- CHASSEVENT F., DALGER G., GERWIG S., VINCENT J. C., 1974. Contribution à l'étude des *Mascarocoffea* : Etude des fractions lipidique et insaponifiable. Relation éventuelle entre les teneurs en caféine et en acides chlorogéniques. Café, Cacao, Thé, XVIII, 1, 49-56.
- CHEVALIER A., 1938. Essai d'un groupement systématique des caféiers sauvages de Madagascar et des Iles Mascareignes. Rev. Bot. Appl. et Agr. Trop., 825-843.
- CHEVALIER A., 1947. Les caféiers du globe. III: Systématique des caféiers et faux caféiers. Maladies et insectes nuisibles. Encycl. Biol., P. Lechevalier, Paris, 356 p..
- CLIFFORD M. N., 1985. Chlorogenic acids. In Coffee. Volume 1 : Chemistry, R. J. Clarke and R. Macrae éd., Elsevier Applied Science (Londres), 153-202.
- CLIFFORD M. N., GIBSON C. L., RAKOTOMALALA J. J. R., CROS E., CHARRIER A. 1991, Caffeine from green beans of *Mascarocoffea*. Phytochemistry, 30, 4039-4040.
- CLIFFORD M. N., WILLIAMS T., BRIDSON D., 1989d. Chlorogenic acids and caffeine as possible taxonomic criteria in *Coffea* and *Psilanthus*. Phytochemistry, 28, 829-838.
- COLONNA J. P., 1979. L'acide chlorogénique et les depsides de divers caféiers africains et malgaches : leur participation au métabolisme et leur signification biologique. Travaux et Documents de l'ORSTOM, N°102, 210p.
- FLEURIET A., MACHEIX J. J., 1972. Séparation et dosage par chromatographie en phase gazeuse de l'acide chlorogénique et des catéchines des fruits. J. Chromatogr., 198, 373-376.
- GUILLAUMET J. L., MANGENOT G., 1975. Aspects de la spéciation dans la flore malgache. Boissiera, 24a, 119-123.
- LEROY J.F., 1982. L'origine kenyane du genre *Coffea* et la radiation des espèces de Madagascar. 10è Colloque de l'A.S.I.C., Montreux (Suisse), 411-417.
- LOPES C. R., MONACO L. C., 1979. Chemotaxonomic studies of some species of the genus *Coffea*. Journal of Plantation Crops, 7,1, 6-14.
- MAZZAFERA P., 1991. Trigonelline in coffee. Phytochemistry, 30, 12, 3913-3916.
- PREWO R., GUGGISBERG A., LORENZI-RIATSCHE A., BAUMANN T. W., WETTSTEIN-BÄTTIG M., 1990. Crystal structure of mozambioside, a diterpene glycoside of *Coffea pseudozanguebariae*. Phytochemistry, 29, 3, 990-992.
- RAKOTOMALALA J. J. R., 1992. Diversité biochimique des caféiers : Analyse des acides hydroxycinnamiques, bases puriques et diterpènes glycosidique. Particularités des caféiers sauvages de la région malgache (*Mascarocoffea* Chev.). Thèse Université de Montpellier II, 220 p..
- RAKOTOMALALA J. J. R., CROS E., CLIFFORD M. N., CHARRIER A., 1992. Caffeine and theobromine in green beans from *Mascarocoffea*. Phytochemistry, 26, 273-279.
- VITZTHUM O. G., BARTHELS M., KWASNY K., 1974. Rapid gas-chromatographic determination of caffeine in caffeine-containing and decaffeinated coffees with the nitrogen-sensitive detector. Z. Lebensm. Unters.Forsch., 154, 135-140.
- WRIGHT S., 1931. Evolution in mendelian populations. Genetics, 16, 97-159.

Figure 1 - Chromatogrammes de *C. canephora* lus à 280 et à 324 nm



Composés majeurs : 1 = AC3Q, 2 = AC4Q, 3 = AC5Q, 4 = caféine, 5 = AF5Q, 6 = AdiC34Q
 7 = AdiC35Q, 8 = AdiC45Q, 9 = caféyltryptophane
 Composés mineurs : A = AF3Q, B = N.D.*, C = AF4Q, D et E = N.D., F, G et I = AdiCFQ, H = caféyltyrosine
 *N.D. = non déterminé

Figure 2 - Diversité des profils chromatographiques des caféiers sauvages

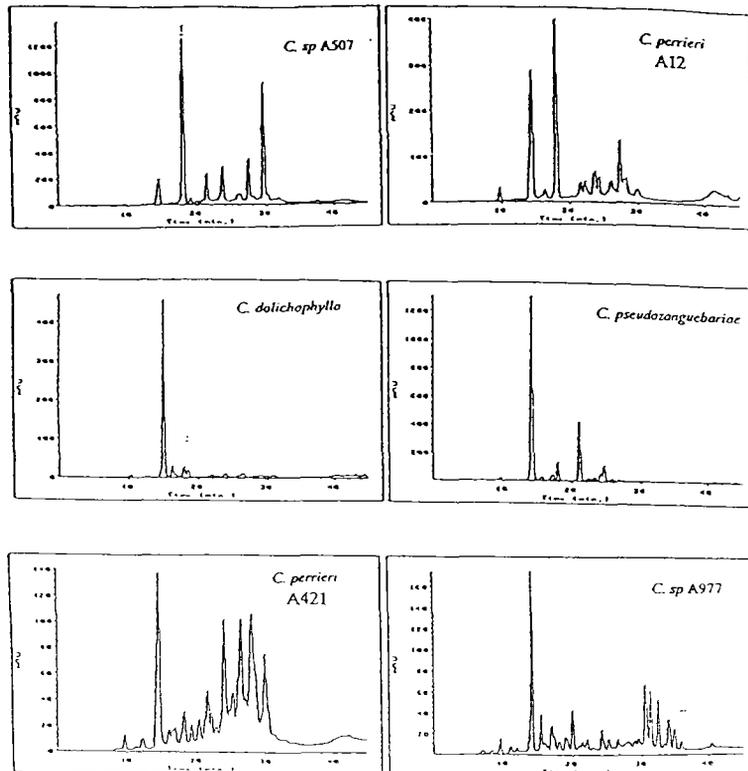


Tableau 1 - Inventaire des composés déjà connus dans la bibliographie (en clair) et ceux nouvellement identifiés (sur fond noir)

		Caféiers cultivés	Caféiers sauvages africains	Caféiers sauvages malgaches
Acides hydroxy-cinnamiques	ac. <i>p</i> -coumarique	+	+	+
	ac. <i>o</i> -coumarique	-	-	+
	ac. 4-méthoxycinnamique	-	-	+
	ac. caféique	+	+	+
	ac. férulique	+	+	+
	ac. sinapique	-	-	+
	ac. diméthoxy 3,4-cinnamique	-	-	+
	ac. triméthoxy 3,4,5-cinnamique	-	-	+
Bases puriques	caféine	+	+	+
	théobromine	-	+	+
	théophylline	-	+	+
	théacrine	-	-	+
Diterpènes glycosidiques	mozambioside	-	+ ?	-
	mascaroside	-	-	+
	cafamarine	-	-	+ ?
	autres	-	-	+

BIOTECHNOLOGIES APPLIQUÉES AU CAFÉIER

V. PÉTIARD, H. BOLLON, J. P. DUCOS, B. FLORIN, M. PAILLARD, J. SPIRAL, A. ZAMARRIPA

FRANCERECO
101 Avenue G. Eiffel
37390 - Notre-Dame-D'Océ
France

L'essor technique des biotechnologies végétales fut très rapide : 1983 première plante génétiquement transformée (1) ; 1993 première commercialisation officielle d'une plante alimentaire transformée.

L'essor économique en a été freiné par divers facteurs non techniques telles que la mise en place des réglementations et la réticence d'une partie de l'opinion à l'égard de ce qu'il appelle globalement "les manipulations génétiques".

Qu'en est-il pour le caféier ?

Quel pourrait être l'impact des biotechnologies sur l'amélioration de cette espèce tropicale, pérenne, ligneuse ?

Quel degré de maîtrise technologique a d'ores et déjà été atteint pour cette espèce ?

Quelles perspectives cette maîtrise laisse-t-elle entrevoir à court et moyen terme ?

C'est à ces questions essentielles que nous tenterons de répondre au cours de cet exposé sur "les biotechnologies appliquées au caféier". De ce fait il s'agit donc clairement d'un essai d'analyse stratégique et non d'une synthèse exhaustive des résultats acquis à ce jour.

D'une façon générale les biotechnologies doivent être considérées comme des outils. Soit en lui permettant de franchir des étapes naturellement inaccessibles soit en lui facilitant la tâche, ces outils permettront au sélectionneur de mener à bien certains programmes d'amélioration des plantes.

Afin de bien replacer les biotechnologies dans leur contexte nous avons donc jugé utile de rappeler les principes de sélection des caféiers.

I - PRINCIPES DE SELECTION DES CAFEIERS (figure 1)

Il faut d'abord souligner que ces espèces pérennes ont un cycle graine à graine de l'ordre de deux à trois années et un cycle moyen de sélection de l'ordre de 4 à 5 années. Le facteur temps et la sûreté de choix des plantes introduites dans un programme de sélection seront donc essentiels.

Par ailleurs, *Coffea arabica* L. et *Coffea canephora* (Robusta) Pierre constituant probablement près de 95% de la production mondiale, nous centrerons notre analyse sur ces deux espèces et leurs hybrides interspécifiques. Il est clair que d'autres espèces dont la biologie florale est similaire à celle de *Coffea arabica* ou de *Coffea canephora* seront à priori justifiables des mêmes techniques.

Coffea arabica L. est une espèce tétraploïde autofertile. La structure génétique des variétés est de type lignée et la sélection suivra des modèles généalogiques, ou de "back-cross" sur un parent recurrent.

L'utilisation d'une variété de type hybride F1 suppose soit une multiplication végétative soit une production de semences hybrides après émasculature et pollinisation manuelle.

Coffea canephora Pierre est une espèce diploïde autostérile. La structure génétique des variétés est de type clonale. La multiplication est faite par voie végétative après sélection d'individus performants parmi des descendants de croisements. Une multiplication par voie sexuée conduit évidemment à un enrichissement en allèles d'autoincompatibilité identiques et à une perte de fertilité dans la population ainsi créée.

Les hybrides interspécifiques dits *Arabusta* sont tétraploïdes ou hexaploïdes et principalement autofertiles. Ils sont multipliés par voie végétative et conduisent ainsi à des variétés clonales. Retrocroisés sur le parent *C. arabica* ils permettent d'introgresser des caractères de *C. canephora* dans *C. arabica*.

On est donc avec le caféier en présence des deux grands types de sélection : autogame et allogame.

II - ETAT DES TECHNIQUES

Il convient tout d'abord de rappeler que les biotechnologies recouvrent un ensemble de techniques et ne peuvent être assimilées au seul "génie génétique".

Certaines de ces techniques ont en effet pour objectif non de modifier le patrimoine génétique mais simplement de valoriser par leur identification, leur préservation ou leur multiplication, certains génotypes sélectionnés.

D'autres techniques ont effectivement pour objectif de modifier un génotype mais de façon aléatoire (variation somaclonale et hybridation somatique) ou enfin de façon dirigée (génie génétique).

II.1. Identification et marqueurs moléculaires

La description des variétés a jusqu'à présent été principalement réalisée sur la base de critères morphologiques. L'utilisation de marqueurs isoenzymatiques a constitué une seconde étape rapprochant le phénotype de son déterminisme. Le développement des méthodes moléculaires basées sur les RFLP ("Random fragments length Polymorphism") et sur les RAPD ("Random amplified primer DNA") a permis d'aborder ces descriptions au niveau même de l'information génétique et donc de les rendre indépendantes de l'environnement de l'arbre observé.

Ces techniques évoluent très rapidement du fait même des efforts dont elles font l'objet pour les génômes animal et humain.

A court terme leur apport pour le caféier consistera principalement dans la caractérisation non ambiguë des arbres des collections permettant d'éliminer ainsi des duplicats.

Une autre application sera l'évaluation des distances génétiques entre des plantes permettant ainsi un choix dirigé en fonction de l'objectif : vigueur hybride, ou similarité au parent recurrent.

Sur d'autres espèces des travaux récents ont montré que par un choix judicieux des individus à retrocroiser sur le parent recurrent le nombre de cycles de "back-cross" pouvait être ramené de 5 à 3. Pour une espèce pérenne de cycle long ceci constitue un avantage significatif.

La caractérisation de marqueurs moléculaires QTL ("Quantitative Trait Loci") devra permettre de pratiquer des sélections précoces pour des caractères exprimés au stade adulte mais également de repérer les arbres combinant les caractères recherchés. A plus long terme la localisation de ces QTL constitue le préalable indispensable au clonage de gènes par une approche basée sur la carte génétique. Ceci serait particulièrement important pour des gènes dont le produit d'expression est inconnu.

Bien qu'encore fort éloignée du degré de connaissance acquis sur des espèces comme la tomate, la pomme de terre, les céréales ou même la canne à sucre, l'exploitation de ces techniques moléculaires a été engagée sur les caféiers. Elle devrait être facilitée par une relativement petite taille du génôme $1,3 \times 10^6$ Kb pour *C. canephora* et $2,3 \times 10^6$ Kb pour *C. arabica*. Cette observation supporterait d'ailleurs l'hypothèse selon laquelle *C. arabica* ne serait pas un autotétraploïde de *C. canephora*.

Comme indiqué lors d'autres présentations de ce colloque, les premiers arbres phylogénétiques des caféiers ont été récemment réalisés. *C. canephora* présente un important polymorphisme génétique contrairement à *C. arabica* (2 ; 3 ; 4).

Il est raisonnable d'espérer les premières cartes moléculaires dans les deux années à venir. La définition de QTL risque, elle, d'être plus dépendante de la disponibilité de ségrégations bien choisies, et de notre capacité à en analyser les caractéristiques phénotypiques, que des techniques de biologie moléculaire.

Comme pour d'autres espèces on peut également supposer qu'une part importante de la variabilité génétique n'a pas été exploitée par le sélectionneur. La recherche de QTL dans des descendances de croisement avec des parents sauvages devrait faciliter la caractérisation et l'exploitation de l'originalité génétique de ces parents.

II.2. Conservation

Les caféiers sont des espèces à graines récalcitrantes ou semi récalcitrantes. La conservation de ces espèces suppose donc l'établissement de collections d'arbres. Soumises aux risques génétiques, climatiques et politiques, ces collections sont, de plus, coûteuses.

Le développement de méthodes modernes de conservation devrait donc permettre l'établissement de collections fiables et peu coûteuses. Il devrait aussi faciliter, d'une part, les échanges (conditions phytosanitaires) et d'autre part, la distribution commerciale de matériel génétique sélectionné (5).

La micropropagation est une méthode permettant de créer des banques de génotypes. Néanmoins, cette méthode nécessite des repiquages réguliers et reste de ce fait contraignante et incertaine techniquement. La conservation après congélation dans l'azote liquide constituerait un procédé éminemment plus fiable et plus économique. Après des prétraitements appropriés dans des milieux riches en sucres ou sous des conditions de déshydratation partielle, il a été possible de congeler avec succès des embryons zygotiques de caféier ou des tissus somatiques embryogènes (6 ; 7).

Ceci permet donc d'ores et déjà la conservation à long terme du patrimoine génétique avec ou sans passage obligé par un phénomène de régénération *in vitro*.

La cryoconservation d'embryons somatiques apparaît également possible (8). Néanmoins, la reprise de croissance de ces embryons se fait par régénération adventive à partir de tissus ayant survécu à la congélation. Le stockage d'embryons somatiques en vue de leur distribution commerciale ultérieure apparaît donc toujours comme impossible dans la mesure où il nécessiterait des phases intermédiaires de culture *in vitro* et conduirait à des "semences" de type multigerme.

Sur la base de résultats récents obtenus sur des embryons somatiques d'espèces modèles comme la carotte, il apparaît que la déshydratation et la conservation sous atmosphère à humidité contrôlée (33% d'humidité relative par exemple) constituent des voies plus prometteuses pour le stockage à moyen terme et le développement conforme d'embryons somatiques. Des résultats préliminaires sur le caféier montrent des tolérances partielles à des humidités relatives réduites après un prétraitement approprié (6).

Ceci étant, par congélation dans l'azote liquide, soit d'embryons zygotiques, soit de tissus embryogènes aptes à régénérer des plantes conformes soit même d'embryons somatiques aptes à une régénération adventive, il devrait être possible d'établir dans les toutes prochaines années des banques de "germplasm" dont il sera aisé d'échanger les constituants.

Bien sûr, le collectionneur souhaitera toujours avoir à disposition des arbres adultes pour éviter d'attendre deux à trois années pour leur développement à partir d'un embryon congelé. Néanmoins, il pourra limiter les collections vivantes au matériel dont il peut prévoir l'utilisation à court terme dans les protocoles de sélection.

II.3. Haploïdisation

Les haplométhodes sont des outils couramment employés en sélection tant pour les espèces autogames (blé, orge, riz ...) que pour les espèces allogames (betterave....).

Pour le caféier, elles permettraient de raccourcir les temps de sélection chez *C. arabica* et de créer des lignées pures pour *C. canephora* à partir desquelles l'obtention d'hybrides F1 homogènes deviendrait possible.

Par détection des graines contenant deux embryons il a pu être possible d'isoler des embryons haploïdes qui, après doublement, ont permis d'obtenir des plantes dihaploïdes et ce tant pour *C. arabica* que pour *C. canephora* (9)

Leur potentiel d'utilisation en sélection reste à évaluer (10).

Par culture *in vitro* d'anthères ou de microspores des structures tissulaires plus ou moins définies et haploïdes ont été observées. Il semble que des embryons haploïdes aient également été obtenu en grand nombre récemment (11). Comme pour les autres espèces il conviendra de vérifier si la fréquence d'obtention de ces embryons est suffisante pour rendre cette technique utilisable et également si elle ne conduit pas à une régénération préférentielle de certaines combinaisons génétiques provoquant ainsi une perte de variabilité, qui serait incompatible avec une exploitation pratique régulière du procédé.

Une technique *in situ* (embryons doubles) et une technique *in vitro* (androgenèse) semblent donc aujourd'hui disponibles. L'avenir dira quelle est la plus facile à mettre en oeuvre et la plus fiable. C'est évidemment celle-ci qui sera retenue par le sélectionneur.

II.4. Multiplication

Comme pour de nombreuses espèces pérennes ligneuses, la multiplication végétative est un élément clé des stratégies de sélection du caféier.

Elle peut être utilisée pour des hybrides F1 de *Coffea arabica* (12 ; 13) évitant ainsi une production semencière délicate, incertaine et coûteuse puisque manuelle.

Elle peut également être appliquée pour des clones sélectionnés de *C. canephora* ou de *C. arabusta*. Par ailleurs, des dihaploïdes de *C. canephora* dont la vigueur est très faible pourraient être maintenus et si nécessaire multipliés par cette voie pour de la production de semences hybrides.

Le bouturage est très efficace pour *C. canephora*. Il n'en est pas de même pour *C. arabica*. Dans tous les cas la multiplication en grand nombre reste quand même limitée par le nombre de boutures orthotropes que l'on peut prélever sur un même arbre (20 à 50 par année). L'introduction commerciale de nouveaux clones risque donc de s'en trouver retardée.

Le microbouturage *in vitro* avec des coefficients de multiplication de l'ordre de 3 à 5 pour deux mois est efficace et fonctionnel pour chacune des espèces et pour l'hybride interspécifique. Il a, d'ores et déjà, permis de constituer des vitrothèques et de faciliter des échanges de matériel génétique. La conformité des plantes ainsi obtenues apparaît satisfaisante.

L'utilisation de la micropropagation *in vitro* pour une multiplication commerciale de plants sélectionnés reste plus incertaine. En effet, elle conduirait à un surcoût à la plantation de l'ordre de 500 à 1000 US \$ par hectare selon l'espèce considérée et la densité de plantation utilisée.

C'est donc naturellement vers l'embryogenèse somatique, technique demandant beaucoup moins d'intervention manuelle, que les chercheurs se sont tournés.

Il doit d'abord être souligné que l'obtention d'embryons somatiques est possible sur chacune des espèces ou des génotypes testés (14). L'embryogenèse somatique apparaît logiquement comme une interaction génotype-environnement. D'une façon générale un choc auxinique est nécessaire pour *C. arabica* alors qu'il ne l'est pas pour *C. canephora*. Les tissus embryogènes ainsi initiés peuvent être maintenus et multipliés par repiquage régulier. Ils pourront également être cryoconservés dans l'azote liquide sans perte de leur potentiel embryogène.

Il est apparu possible de cultiver ces souches et de produire les embryons somatiques en milieu liquide et en bioréacteur. Par ces méthodes de 4 à 600.000 embryons/l peuvent être obtenus après environ 2 mois de culture. La productivité est donc de l'ordre de 5 à 10 000 embryons par litre et par jour (15).

Il est intéressant de noter que cette production est largement dépendante de facteurs inhibiteurs ou au contraire inducteurs, produits par les tissus eux-mêmes et dont la nature exacte reste à déterminer.

De 40 à 60% de ces embryons sont aptes à se développer en plantules viables transférables à la serre.

Cette technique apparaît comme très intéressante pour deux raisons :

- d'une part, elle permettra l'introduction commerciale rapide de nouveaux génotypes.
- d'autre part, elle aboutira à une production de plants à un coût comparable à celui des plants issus de semences.

Son avenir nous semble dépendant en priorité des résultats des contrôles de conformité. Il est clair que cet aspect est essentiel. Il est clair également que l'objectif doit être une fréquence de hors types compatible avec une exploitation avantageuse et non une absence totale de hors types. Sur la base d'observations effectuées sur d'autres espèces, il semble que la conservation par congélation dans l'azote liquide et non par repiquage régulier des souches embryogènes permette d'espérer un taux de conformité élevé des plantes obtenues.

En second lieu, il conviendra d'améliorer et de simplifier les procédures de conversion des embryons en plantules. L'objectif serait la création d'un substrat qui évite tout repiquage manuel entre la récolte des embryons et le transfert de la plantule en pépinière. Celui-ci devra permettre successivement une phase de culture *in vitro* pendant laquelle l'embryon acquiert son état chlorophyllien et son autotrophie puis une phase d'acclimatation aux conditions *ex vitro*.

Enfin cette technique devra être développée sur d'autres génotypes et/ou espèces de caféier que ceux utilisés jusqu'à ce jour.

II.5. Variation somaclonale - Mutagenèse

La variation somaclonale est l'apparition apparemment aléatoire de modifications dans la structure et/ou l'organisation et/ou l'environnement du génome lors de la culture *in vitro*. Alors qu'elle constitue un inconvénient majeur à éviter lors de procédures de multiplication, elle peut être un moyen de création de variabilité pour certaines espèces. Il semble que le nombre de repiquages et la nature des substances de croissance végétale utilisées dans les milieux soient des facteurs importants pour l'induction de variabilité (16).

La mutagenèse *in vitro* n'est finalement que l'application de traitements mutagènes sur des tissus cultivés *in vitro* le plus souvent sur des milieux sélectifs. On cherche alors à amplifier la probabilité de mutation et à sélectionner dès le stade tissulaire les mutants recherchés.

Pour ce qui est du caféier, ces méthodes s'appliqueront principalement à du matériel d'ores et déjà commercial sur lequel on souhaitera induire une modification précise sans pour autant déstabiliser l'ensemble du patrimoine génétique.

Même si une telle modification existait à l'état naturel dans le germplasm la variation somaclonale permettrait d'éviter tout un programme de croisements nécessaire à son introduction dans un matériel commercial, provoquant ainsi un gain de temps significatif.

Si cette modification n'existait pas dans le germplasm, la variation somaclonale permettrait d'induire un caractère qu'il n'aurait pas été aisé d'obtenir par une autre voie si son déterminisme génétique est inconnu ou plurigénique.

Un seul programme dans ce domaine a été rapporté pour le caféier. Appliquée sur différents génotypes de *C. arabica*, il semble que l'embryogenèse somatique ait conduit à l'apparition de nombreux variants (ou mutants ?) de l'ordre de 10% tous caractères confondus; et ce pour des caractères morphologiques (taille), physiologiques (synchronicité de floraison) ou technologiques (teneur en caféine) (17).

Ces résultats doivent être confirmés avant de pouvoir conclure sur l'intérêt de la variation somaclonale pour le caféier. En premier lieu, l'héritabilité des modifications observées doit être analysée. Si celle-ci est élevée la variation somaclonale pourrait alors être appliquée avec succès à d'autres génotypes ou espèces. Il convient de souligner que le facteur limitant est ici beaucoup plus le travail de "screening" dans les essais que celui de création *in vitro* de variants ou mutants.

II.6. Hybridation somatique

La fusion de protoplastes isolés à partir de tissus somatiques a conduit à des résultats intéressants soit en interspécifique pour l'introduction de caractères cytoplasmiques (colza) (18) soit en intraspécifique pour l'addition de caractères nucléaires (pomme de terre) (19).

Pour ce qui est du caféier cette technique n'a pas, à notre connaissance, été utilisée.

La régénération de protoplastes est maîtrisée sur les principales espèces (20 ; 21). Celle-ci peut être exploitée pour des expériences de variation somaclonale ou de transformation génétique.

La fusion de protoplastes pourrait être exploitée pour la création de nouveaux hybrides interspécifiques en additionnant les patrimoines génétiques d'une cellule de *C. arabica* diploïde obtenue à partir d'une graine à embryon double et d'une cellule de *C. canephora*.

De telles expériences de fusion pourraient conduire à la création de nouveaux équilibres nucléocytoplasmiques qui n'auraient pu être obtenus par voie sexuée. Encore faudra-t-il que la capacité de régénération de protoplastes isolés soit maintenue après leur fusion.

II.7. Transformation génétique

Alors que la première plante transgénique a été obtenue en 1983, en 1993 on recense plus de 50 espèces différentes dans lesquelles on sait introduire un gène précis.

Près de 400 essais au champ avec des plantes transgéniques auront été officiellement autorisés à fin 1993.

Même s'il reste difficile de prédire les premières applications commerciales, et ce pour des contraintes plus politiques que techniques, il est clair que la transformation génétique des plantes aura un impact majeur sur le futur de la sélection.

Cette technique permet une approche dirigée et précise de la création de variabilité pour des caractères agronomiques ou technologiques.

Elle permet, bien sûr, l'introduction de caractères hétérologues, mais également celle de caractères homologues modifiés ou non. Dans ce dernier cas, elle offrirait un gain de temps significatif. A titre d'exemple, l'introduction d'un gène de résistance à la rouille orangée de *C. canephora* dans *C. arabica* serait beaucoup plus rapide par transformation génétique que par croisement et "back-cross". Bien sûr, cela suppose que le gène ait été cloné auparavant.

Pour ce qui est du caféier, des plantules transformées à l'aide d'*Agrobacterium rhizogenes* ont été récemment obtenues pour *C. arabica*, *C. canephora* et l'hybride interspécifique (22 ; 23).

La transformation a été mise en évidence à l'aide du gène marqueur GUS, à la fois par l'expression de la glucuronidase et par l'amplification des séquences correspondantes ou leur hybridation avec une sonde spécifique sur de l'ADN extrait de feuilles de jeunes plantules transformées.

Il est à noter que, du fait d'une très faible sensibilité à la kanamycine, la résistance à cet antibiotique n'a pu être utilisée comme outil de screening.

Ces résultats ouvrent la voie à l'utilisation de la transformation génétique via *Agrobacterium rhizogenes* pour l'introduction de caractères d'intérêt pratique.

Il peut s'agir de caractères agronomiques, telle la résistance aux insectes, ou de caractères technologiques, telle la suppression de la présence de caféine, comme cela a été fréquemment proposé. Dans ce dernier cas, il serait judicieux de réfléchir aux conséquences agronomiques, technologiques et qualitatives d'une absence totale de caféine.

La stabilité et l'héritabilité des gènes marqueurs, d'ores et déjà transférés, devront également être évaluées.

II.8. Bilan général

De l'énumération préalable, il ressort clairement (figure 2) que pratiquement tous les outils biotechnologiques sont aujourd'hui disponibles pour le sélectionneur de caféier. Seule la fusion somatique n'a pas encore été réalisée et évaluée.

Certes, selon les cas, la mise au point de ces outils est plus ou moins récente et encore justifiable de plus ou moins d'efforts d'optimisation.

Il est néanmoins remarquable de disposer de cette "panoplie" d'outils pour un même genre. A titre d'exemple en considérant d'autres espèces :

chez la pomme de terre et la tomate, l'embryogenèse somatique est toujours inconnue,

chez la carotte, où l'embryogenèse somatique en a fait une espèce modèle pour cette technique, les haplométhodes n'existent pas. De même pour la tomate d'ailleurs,

chez certaines céréales, la transformation génétique reste très aléatoire et la fusion somatique également.

Il est relativement banal d'indiquer que des cultures cellulaires en milieu liquide de caféier ont pu être réalisées. Celles-ci peuvent néanmoins être fort utiles pour l'étude de voies métaboliques dans un contexte biochimique décompartimenté et plus simple que celui de la plante entière. Elles peuvent aussi constituer le matériel de base pour l'obtention et la sélection de mutants cellulaires pour ces voies métaboliques à partir desquels ou pourra tenter de cloner les gènes responsables de ces mutations.

III - STRATEGIES

L'amélioration de la qualité technologique de matières premières végétales utilisées en alimentation passe par deux approches complémentaires.

D'une part, la génétique permettra de sélectionner des variétés bien adaptées si ce n'est spécifiées pour leur utilisation ultérieure.

D'autre part, des pratiques culturales et des traitements post récolte optimaux doivent permettre de valoriser les qualités intrinsèques de la variété utilisée.

Il n'en est pas autrement pour le café. A quoi servirait un génotype présentant des qualités à la tasse exceptionnelle s'il n'est pas traité correctement ? A quoi servirait un traitement post récolte optimal si le produit récolté ne présente pas intrinsèquement les précurseurs nécessaires pour développer cette qualité à la tasse ? Ces deux aspects ne peuvent être dissociés.

Pour ce qui est de la sélection celle-ci nécessite deux préalables, l'accès au "germplasm" et la définition de marqueurs de sélection lié au critère de qualité recherché. Ces marqueurs doivent être fiables et aussi simples que possible à mettre en oeuvre.

Pour le caféier, les outils de sélection conventionnels ou biotechnologiques sont disponibles. Ce qui paraît maintenant faire défaut en vue d'une sélection pour la qualité technologique ce sont ces marqueurs.

Ici encore la biologie moderne peut être d'une grande aide si les analyses moléculaires ou biochimiques qu'elle permettra d'effectuer peuvent être reliées à des évaluations technologiques fiables réalisées sur des échantillons définis.

Que ce soit pour la définition de marqueurs ou pour l'identification et le clonage de gènes impliqués dans des caractéristiques technologiques ou agronomiques, il devient à notre avis prioritaire de mettre en place des essais multiloceaux avec des génotypes bien définis en vue d'en corrélérer l'évaluation phénotypique et technologique avec des analyses moléculaires ou biochimiques.

La définition de QTL passe en quelque sorte par une superposition de deux images, l'une moléculaire, l'autre phénotypique. Si cette dernière n'est pas fiable, le travail mené au niveau moléculaire perd tout sens. Il convient donc en premier lieu de vérifier la fiabilité de ces évaluations phénotypiques afin de pouvoir par la suite les corrélérer aux observations faites au niveau moléculaire.

Un autre objectif à court ou moyen terme est certainement la caractérisation de promoteurs spécifiques. Ceux-ci seront indispensables à toute utilisation appliquée du génie génétique.

IV - CONCLUSION

De façon peut être inattendue mais non moins réelle le caféier s'est révélé être une espèce peu récalcitrante aux progrès biotechnologiques. Pratiquement toutes les techniques de la biotechnologie sont aujourd'hui disponibles sur cette espèce. Il reste au sélectionneur à les mettre en oeuvre à bon escient. Il lui reste d'abord à définir clairement les objectifs qu'il souhaite atteindre et le support génétique qui les conditionne. Quel intérêt de savoir transformer le caféier si l'on ne dispose pas de gènes pratiquement utiles à introduire dans cette plante ?

Disposant à la fois des outils et des connaissances le sélectionneur pourra alors faire effectuer des progrès rapides à la génétique de cette espèce dont l'importance économique n'est plus à souligner. Espérons que ce sera pour le bénéfice commun du producteur, de l'utilisateur et du consommateur et que la volonté politique nécessaire à une pleine valorisation des acquis permettra ces progrès et leur juste exploitation.

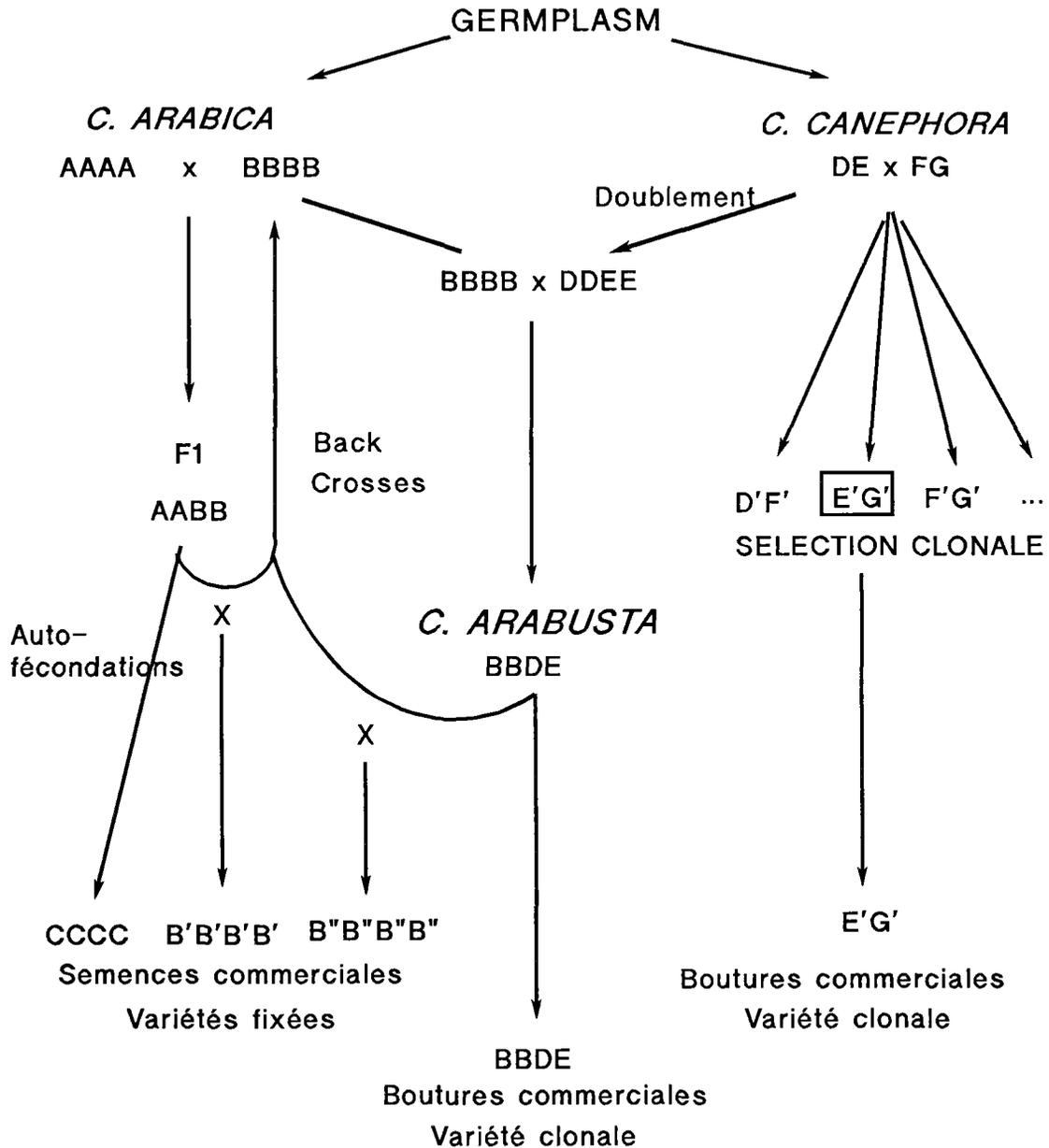
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 - HERRERA-ESTRELLA L., DEPICKER A., VON MONTAGU M. and SCHELL J., 1983 - Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti plasmid-derived vector, *Nature* (London), 303 : 209.
- 2 - LASHERMES P., CROS J., MARMEY P. and CHARRIER A. - 1993. Use of random amplified DNA markers to analyze genetic variability and relationships of *Coffea* species. *Genetic Resources and Crop Evolution*, In press.
- 3 - DUCHATEAU N. et PAILLARD M. - 1993. Diversité génétique de quelques groupes de caféiers : utilisation des outils moléculaires RFLP and RAPD. *ASIC*, 15ème Colloque Montpellier, In press.
- 4 - OROZCO-CASTILLO C., CHALMERS K.J., WANGH R. and POWELL W., 1993 - Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* In press.
- 5 - BERTRAND-DESBRUNAIS A., NOIROT M. and CHARRIER A., 1991 - Minimal growth *in vitro* conservation of coffee (*Coffea* spp.). Influence of low concentrations of 6-benzyladenine. *Plant Cell. Tiss. and Org. Cult.*, 27 : 333-339.
- 6 - FLORIN B., TESSERAU H. et PETIARD V., 1993 - Conservation à long terme des ressources génétiques de caféier par cryoconservation d'embryons zygotiques et somatiques et de cultures embryogènes. *ASIC* 15ème Colloque Montpellier, In press.
- 7 - ABDELNOUR-ESQUIVEL A., VILLALOBOS V. and ENGELMANN F., 1992 - Cryoconservation of zygotic embryos of *Coffea* spp. *Cryo-Lett.*, 13 : 297-302.

- 8 - TESSERAU H., LECOUTEUX C., FLORIN B., SCHLIENGER C. and PETIARD V., 1991 - Use of a simplified freezing process and dehydration for the storage of embryogenic cell lines and somatic embryos. *Rev. Cytol. Biol. Végét. Bot.*, 14 : 297-310.
- 9 - COUTURON E. et BERTHAUD J., 1982 - Présentation d'une méthode de récupération d'haploïdes spontanés et d'obtention de plantes diploïdes homozygotes chez les caféiers de l'espèce *C. canephora*, ASIC, 10^e Colloque, Salvador, 385-391.
- 10 - LASHERMES P. *et al.*, 1993 - De l'utilisation en sélection des haploïdes doublés de *Coffea canephora*, ASIC, 15^e Colloque Montpellier, In press.
- 11 - CARNEIRO M.F., 1993 - Induction of double haploïds on *Coffea arabica* cultivars via anther or isolated microscopes culture. ASIC, 15^e Colloque Montpellier, In press.
- 12 - AGWANDA C.O., 1993 - Hybrid seed production in Arabica coffee : Consequences of isolation techniques in preventing alien pollen contamination. ASIC, 15^e Colloque Montpellier, In press.
- 13 - VAN DER VOSSEN H.A.M et WALYARO D.J., 1981 - The coffee breeding programme in Kenya : a review of progress made since 1971 and plan of action for the coming years. *Kenya coffee*, 46 (541) : 113-130.
- 14 - ZAMARRIPA A., 1993 - Study and development of somatic embryogenesis in liquid medium of coffee . Ph. D. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes. 191 p.
- 15 - DUCOS J.P., ZAMARRIPA A., ESKES A.B. and PETIARD V., 1993 - Production of somatic embryos in a bioreactor. ASIC 15^e Colloque Montpellier, In press.
- 16 - SKIRVIN R.M. and JANICK J., 1976 - Tissue culture-induced variation in scented *Pelargonium* spp., *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 101 : 281-290.
- 17 - SONDAHL M.R. and BRAGIN A., 1991 - Somaclonal variation as a breeding tool for coffee improvement, ASIC 14^e Colloque, San Francisco, 701-709.
- 18 - PELLETIER G., PRIMARD C., VEDEL F., CHETRIT P., REMY R., ROUSSELLE P. and RENARD M., 1983 - Intergeneric cytoplasmic hybridization in *cruciferae* by protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet.*, 191 : 244-250.
- 19 - AUSTIN S., BAER M., EHLENFELDT M., KAZMIERCZAK P.J. and HELGESON J.P., 1986 Intraspecific fusions in *Solanum tuberosum*, *Theor. Appl. Genet.*, 71 : 172-173.
- 20 - SPIRAL J. et PETIARD V., 1991 - Protoplast culture and regeneration in *coffea* species, ASIC, 14^e Colloque San Francisco, 383-391.
- 21 - ACUNA J.R. and M. PENA, 1991 - Plant regeneration from protoplasts of embryogenic cell suspensions of *Coffea arabica* L. cv. caturra. *Plant Cell Rep.*, 10 : 345-348.
- 22 - SPIRAL J., THIERRY C., PAILLARD M. et PETIARD V., 1993 - Obtention de plantules de *Coffea canephora* (Robusta) transformées par *Agrobacterium rhizogenes*. *C. R. Acad. Sci Paris*, t.316, Série III, 1-6.
- 23 - SPIRAL J. et PETIARD V., 1993 - Développement d'une méthode de transformation appliquée à différentes espèces de caféiers et régénération de plantules transgéniques, ASIC 15^e Colloque, Montpellier, In press.

BIOTECHNOLOGIES APPLIQUEES AU CAFEIER

PRINCIPES DE SELECTION



VP93090

BIOTECHNOLOGIES APPLIQUEES AU CAFEIER

BILAN GENERAL JUIN 93

Régénération directe	+
Régénération indirecte	+
Régénération de protoplastes	+
Conservation	+
Identification moléculaire	+/-
Haploïdisation	+/-
Multiplication par microboutures	+
Multiplication par embryogenèse somatique	+
Variation somatique	+
Hybridation somatique	-
Transformation génétique	+
Cultures cellulaires	+

COLD SENSITIVITY OF *IN VITRO* MICROCUTTINGS OF *COFFEA ARABICA* AND *C. CANEPHORA* DURING STORAGE AT VARIOUS TEMPERATURES

EVOLUTION OF SUGAR, PROLINE, MDA AND ETHYLENE PRODUCTION

F. ENGELMANN, L. JOUVE, N. CHABRILLANGE, S. DUSSERT, F. ANTHONY, A. CHARRIER

ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 01, France

INTRODUCTION

Genetic resources of coffee are generally preserved as field collections. However, plant material remains exposed to climatic hazards and to attacks by pests and pathogens. Therefore, *in vitro* collections of microcuttings have been set up, in order to ensure germplasm medium-term conservation in safe conditions. Moreover, exchanges of plant material as *in vitro* plantlets are considerably facilitated. At ORSTOM/Montpellier, the *in vitro* collection comprises a total number of 635 accessions, representing 13 species. Intervals between subcultures can be extended to 6-12 months, depending on the species, when plants are cultivated at 27°C (Bertrand-Desbrunais *et al.*, 1992). These intervals may be significantly increased by lowering the culture temperature. However, there exists an important variability among coffee species as concerns their tolerance to low temperatures. This was illustrated recently when observing the different resistance of plantlets of two coffee species, *C. arabica* and *C. canephora*, during storage at various temperatures (Jouve *et al.*, 1991).

The exposure of plants to low temperatures induces biochemical and physiological changes which allow them to withstand this stress (Levitt, 1980; Graham and Patterson, 1982). The disorders caused by cold temperatures are particularly important in the case of tropical and subtropical species and are reversible or not depending on their sensitivity and on the storage period. Irreversible damages can occur before any visible symptom be detected on the plants. Therefore, it is of primordial importance to define marker(s) which could inform about the extent of damages caused to the plants by low temperature before they become irreversible.

During storage at low temperature, accumulation of low molecular weight compounds is observed in numerous species (Kushad and Yelenosky, 1987; Salerno and Pontis, 1989). Among them, carbohydrates like sucrose, sorbitol or raffinose were the first protective substances described with plants. Their quantity can show an up to ten-fold increase during storage at low temperature. Similarly, accumulation of free proline is often associated with resistance of plants to numerous stresses and particularly to low temperature (Kushad and Yelenosky, 1987; Krall *et al.*, 1989).

Another well known aspect of acclimation of plants to low temperature exposure is the biochemical and physical restructuring of cell membranes (Steponkus, 1984; Lynch and Steponkus, 1987). Cold exposure can alter the structure of membranes due to lipid peroxidation, thus producing malonaldehyde. Therefore, changes in MDA concentration can be a good indicator of the structural integrity of membranes for plants submitted to low temperature. After a conservation period, an increase in ethylene production by plant tissues is generally associated with the stress conditions (Yang and Hoffman, 1984). Cold treatments can increase its production by cold-sensitive tissues. After transfer of the plant material to standard temperature, the burst of ethylene which can be observed results from the reactivation of the ethylene forming enzyme which is a thermodependent

membrane enzyme (Chen and Patterson, 1985), and can thus allow to estimate the functional integrity of membranes.

In the present study, we observed the effect of conservation at different temperatures on the physiology of shootlets of *C. arabica* and *C. canephora* by following the evolution of their sugar, proline, MDA concentration and ethylene production. The results were related with their survival rates in the various experimental conditions.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

This study was carried out with two coffee species which differed by their ecology: *C. arabica* L, originating from mountain areas of South West Ethiopia, resistant to low temperatures, and *C. canephora* Pierre, originating from warm and humid plains of the intertropical african zone. The microcuttings of *C. arabica* belonged to the cultivar Moka de Tahiti and those of *C. canephora* to a maternal origin of clone IF 23. The explants used were orthotropic axes without terminal buds, roots or basal calluses, bearing two pairs of leaves, of an average length of 10 mm.

Methods

The microcuttings were cultured on a medium (Jouve *et al.*, 1991) derived from that of Dublin (1980). They were placed in 150 x 24 mm glass test tubes containing 20 ml of medium with an average free volume of 34 ± 1 ml. Cultures were placed at 27, 22, 17 and 12°C with a photoperiod of 12 hrs light/12 hrs dark under a photon flow of $55.5 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

At the end of each storage period, the survival rate was estimated as a function of the total number of remaining microcuttings. At each sampling date, 12 microcuttings were randomly chosen in each condition. Six of them were grouped in two batches of three and freeze-dried for the further measurement of sugar, proline and MDA concentration. The six remaining microcuttings were placed at standard temperature (27°C) for 10 days in order to measure their ethylene production. They were then grouped in two batches of three and freeze-dried for further measurement of their MDA concentration.

The concentrations in D-fructose, D-glucose and sucrose were measured enzymatically using the method of Bergmeyer and Bernt (Bergmeyer and Bernt, 1974). The results were expressed in $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ fresh weight (FW).

The free proline concentration was measured by the method of Bates *et al.* (1973), using L-proline as a standard. Plant material was grounded in 3 % (w/v) sulfosalicylic acid. After filtration and reaction with ninhydric acid, the chromophore was extracted in toluene and absorbance was measured at 520 nm. The results were expressed in $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ FW.

MDA content was measured by colorimetry using the method of Heath and Packer (1968) modified by Hagège *et al.* (1990). Specific absorbance was measured at 532 nm and non specific absorbance at 590 nm. Results were expressed in $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ fresh weight (FW). MDA concentration was measured after each storage duration and in some cases only after a further period of 10 days at 27°C. The data correspond to the mean value of three measurements of each of the two batches for each storage duration.

Ethylene production was measured every 24 hours during 10 days at 27°C, after all storage durations and also during storage at the different storage temperatures experimented. The microcuttings were confined for 24 hours before sampling 2 ml of the test tube atmosphere. Samples were injected in a gas chromatograph (Delsi DN 200) equipped with a flame ionisation detector and a Porapak Q column (500 x 6 mm). The results were expressed in $\text{nl}\cdot 24\text{ hrs}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ FW. Each point corresponded to the mean value of the maximal ethylene production of the 6 samples analyzed. For data analysis, ANOVA and Newman (1939) and Keuls (1952) tests were used for multiple comparison of treatment means.

RESULTS

After 20 weeks in storage, the survival rate of the microcuttings varied between the two species. With *C. arabica*, the lowest survival rate (67 %) was obtained at 27°C (Fig. 1A). However, no significant differences were observed between the four storage temperatures experimented. With *C. canephora* (Fig. 1B), the results were comparable to that described previously with *C. arabica* for 17, 22 and 27°C, whereas survival dropped down to 25 % after 20 weeks of storage at 12°C.

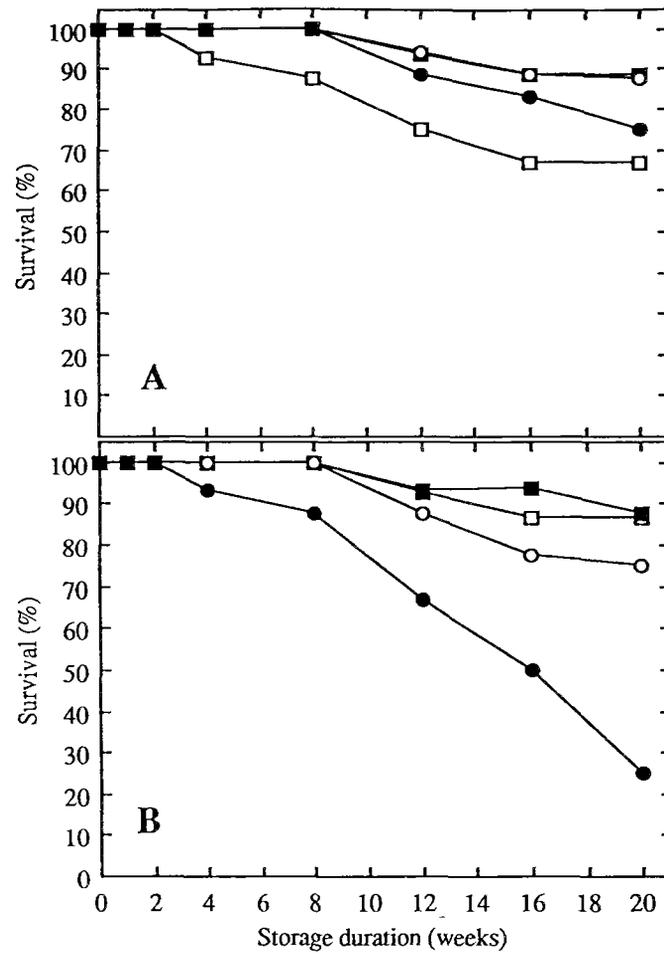


Figure 1: Evolution of the survival rate of microcuttings of *C. arabica* (A) and *C. canephora* (B) during storage at different temperatures (27°C □, 22°C ■, 17°C ○ and 12°C ●).

The sugar concentration varied differently during storage, depending on the storage temperature. A peak of fructose and glucose was observed immediately after the transfer to 12°C, with a maximum after two weeks both for *C. arabica* and *C. canephora* (1300 µg/g FW for glucose and fructose). This peak was also observed at 17°C with *C. canephora* for glucose. In the other treatments, the glucose and fructose concentrations generally remained stable around 500 µg/g FW over the storage duration, but for glucose level which increased significantly for *C. canephora* stored at 27°C up to 800 µg/g FW, at the end of the storage period. The evolution of sucrose concentration was generally similar for both species in all conditions. After two to four weeks in storage, the sucrose level reached 1 mg.g⁻¹ FW and remained stable afterwards. The sucrose concentration decreased significantly at the end of the storage period, in *C. canephora* microcuttings kept at 12°C only.

Proline concentration did not vary significantly in microcuttings of both species placed at 22 and 27°C, remaining between 5-10 mg/g FW. At the lower temperatures, the evolution was different. At 17°C, the increase was delayed and appeared from the 8th week onwards for *C. arabica* and from the 12th week onwards for *C. canephora*. At 12°C, proline concentration increased rapidly and reached a maximal level (20 mg/g FW) after 4 weeks in storage. It remained stable for *C. arabica* but decreased progressively down to the initial value for *C. canephora*.

During storage, the MDA concentration varied little with *C. arabica*, whatever the temperature (Fig. 2A). At 12 and 27°C only, the MDA level increased transitorily between the 12th and 16th weeks of storage. The MDA contents did not differ between the batches submitted to 20 weeks of storage at different temperatures. With *C. canephora*, there was no significant increase in the MDA content during storage at 17, 22 and 27°C (Fig. 2B). On the contrary, at 12°C, an important increase in the MDA content was observed (around 4-fold that measured at the other temperatures). This value became stable and remained constant until the end of the experiment. Ten days after their transfer to 27°C, the MDA concentration was modified in the case of microcuttings stored for 4 weeks at 12, 22 and 27°C (Table 1): with *C. canephora* it decreased close to the level measured in the controls stored at 27°C. On the contrary, for *C. arabica*, the MDA concentration increased. After 20 weeks of storage, there was no further modification of the MDA level. For *C. arabica*, the levels were comparable for plants stored at 12, 22 and 27°C. Microcuttings of *C. canephora* stored at 12°C conserved a high MDA concentration which did not decrease to the level of the controls.

Table 1: Modifications in the MDA concentration (nmol.g⁻¹ FW) after 4, 16, and 20 weeks of storage at different temperatures (storage) and 10 days at 27°C (storage + 10 days). Different letters indicate significantly different values (p = 0.05).

Storage duration (weeks)	Storage temperature (°C)	Species	malonedialdehyde	
			storage	storage + 10 days
4	27	<i>C. arabica</i>	8.6 a	16.3 ab
	12	"	9.6 a	20.8 b
	27	<i>C. canephora</i>	9.0 a	13.2 a
	12	"	33.2 c	22.9 b
16	27	<i>C. arabica</i>	17.3 b	19.7 b
	12	"	25.0 b	28.1 b
20	27	<i>C. arabica</i>	18.8 ab	17.5 ab
	22	"	14.1 a	12.5 a
	12	"	21.7 b	18.3 ab
	27	<i>C. canephora</i>	9.5 a	14.0 a
	22	"	44.4 c	42.3 c

During storage and whatever the temperature, the ethylene production remained low and constant (between 30 and 200 nl.24h⁻¹.g⁻¹FW). During the 10 days following the transfer at 27°C, differences in ethylene production were observed, depending on the species and the storage temperature. For both species, a peak was present immediately after the transfer of the microcuttings (500-600 nl/24 h/g FW). In the case of *C. arabica*, there was no significant difference in the ethylene production for microcuttings stored at 22 or 27°C, whatever the storage duration. At 12°C, a peak appeared after 12 weeks of storage only. After 16 and 20 weeks of storage, it was

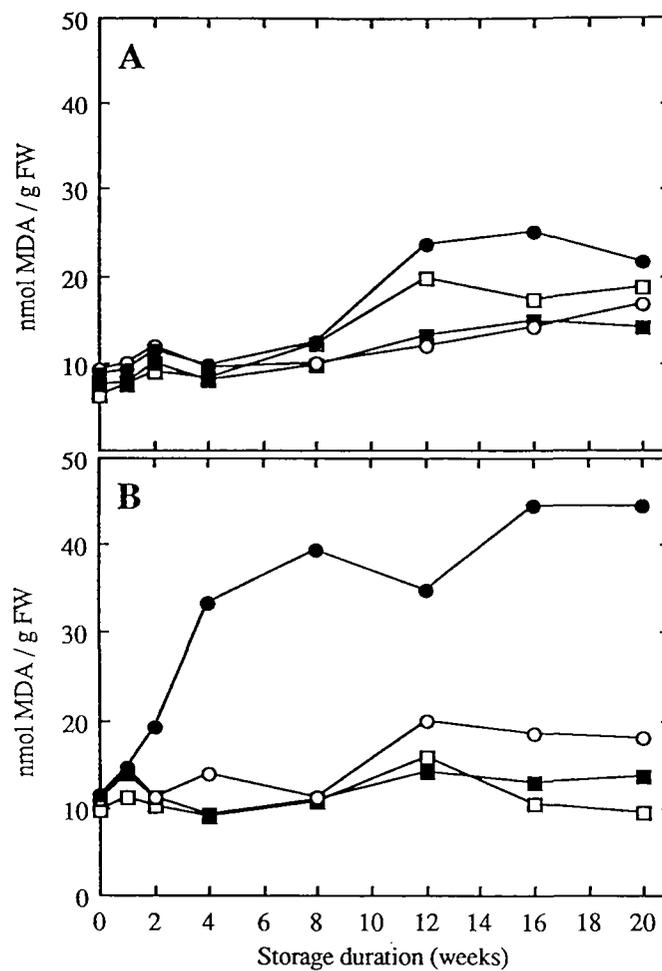


Figure 2: Evolution of the malonaldehyde (MDA) concentration of microcuttings of *C. arabica* (A) and *C. canephora* (B) during storage at different temperatures (27°C □, 22°C ■, 17°C ○ and 12°C ●).

present for plants stored at 12 and 17°C. For *C. canephora*, a peak of ethylene was already observed after 2 weeks of storage at 12, 17 and 22°C. After 4 and 8 weeks of storage, its intensity increased for these three temperatures up to 600-700 nl/24 h/g FW. However, after 12 weeks of storage, an important reduction of the ethylene burst was observed for the microcuttings conserved at 12°C, whereas it was higher for the ones stored at 17 and 22°C.

DISCUSSION/CONCLUSION

In the majority of cases, the critical storage temperature is much higher for tropical, cold sensitive species, in comparison to that of plants from temperate climates. It is generally comprized between 8 and 15°C (Banerjee and De Langhe, 1985) and appeared to be even higher for coffee. In this experiment, *C. canephora* microcuttings were much more cold sensitive than that of *C. arabica*, which confirms the previous results of Jouve *et al.* (1991) obtained with the same species and reflects their different ecology. The four markers used in this study to assess the cold sensitivity of coffee plantlets varied differently.

No increase in the sugar concentration was noted in relation with the storage temperature, contrarily to what is observed in cold tolerant plants from temperate climates during cold acclimation (Calderon and Pontis, 1985; Salerno and Pontis, 1989). The transitory increase in glucose and fructose contents at the beginning of the storage period could be due to a decrease in metabolic activity, leading to their accumulation and not to an active phenomenon, like in cold tolerant species.

The fluctuations in the proline level observed in the present study were relatively low in comparison to that noted in the literature (Kushad and Yelenosky, 1987; Krall *et al.*, 1989). Moreover, differences in proline level were not apparent when survival started to diminish and may be an effect rather than a cause of the decrease of the susceptibility.

For *C. arabica* conserved at 12°C, the MDA concentration did not increase during the whole storage duration, whereas that measured in *C. canephora* microcuttings stored at the same temperature significantly increased from the 4th week on. This showed an increased production of peroxide ions in this species in comparison with *C. arabica* or a less efficient detoxification by the superoxide dismutase-catalase system (Benson, 1990). This modification in the MDA concentration was reversible after short-term exposures to cold temperatures, which reflected the fact that the metabolic activity was sufficient to repair the damages induced by cold. On the contrary, after longer storage durations at low temperature, no reduction in the MDA concentration was observed after transfer to 27°C, which indicates that the structural integrity of the membranes was too severely damaged for repair mechanisms to take place. Evolution of MDA clearly preceded the decrease in survival rate of the microcuttings, thus demonstrating the usefulness of this compound to monitor early damage. After transfer to standard temperature following cold storage, an increased ethylene production is often observed for cold sensitive plants or organs like *Citrus* (Cooper *et al.*, 1969) or tropical species such as *Carica papaya* (Chan *et al.*, 1985) and *Elaeis guineensis* (Corbinau *et al.*, 1990). Chen and Patterson (1985) indicate that an important ethylene production after the transfer to high temperature corresponds to a reversible stress, whereas a more severe stress induces the irreversible incapacity to produce ethylene. A progressive decrease in ethylene production after extended storage periods at low temperatures was observed in the case of oil palm somatic embryos stored for more than 11 weeks at 12°C, in line with a progressive drop in their survival rate (Corbinau *et al.*, 1990). In the present study, for both species and at all temperatures, dissection was a stressing event, as assessed by an important peak of ethylene occurring immediately after their transfer in storage conditions. After transfer at 27°C, a slight increase of ethylene occurred after different storage durations at low temperature for the two species. However, it did not seem clearly correlated with a decrease in survival. A simple hypothesis for the occurrence of this ethylene burst would be that ACC, the precursor of ethylene, accumulates at low temperature because of the inhibition of EFE in these conditions and is converted to ethylene after transfer at higher temperature.

In conclusion, among the four potential markers experimented in the present work, MDA appears as the best indicator of cold sensitivity in the case of *C. arabica* and *C. canephora* microcuttings. In order to complete this study, it would be interesting to compare the activity of the enzymes superoxide dismutase and catalase which are involved in the defense processes against free radicals.

ARABICA COFFEE MICROPROPAGATION THROUGH SOMATIC EMBRYOGENESIS VIA BIOREACTORS

C. NORIEGA, M. R. SÖNDAHL

DNA Plant Technology Corporation, Cinnaminson, NJ, 08077, USA

INTRODUCTION

Vegetative propagation is usually referred to budding, cutting and grafting methods. Micropropagation relates to all *in vitro* cloning techniques. The majority of commercial plant micropropagation protocols are currently exploring the presence of axillary or apical meristems of donor genotypes, (Kurtz, *et al.*, 1991). All cultures are made under semi-solid medium and the micropropagation process is characterized by three distinct phases: explant inoculation and shoot development (Stage 1), shoot multiplication (Stage 2), and rooting/hardening off (Stage 3). Each phase requires a great amount of labor and sufficient laboratory area for incubation of the solid cultures for all three stages of the cloning process.

Enormous potential and short-term return can be realized through the utilization of vegetative propagation, especially for tropical species that have high levels of phenols and tannins which inhibit rooting and grafting. Great advantages can be gained by applying micropropagation methods to a perennial crop like coffee because of the long period of time required for breeding. Here, one can easily evaluate the commercial advantages of cloning a few selected individual trees and so, bypassing all the time involved in selfing and selecting homozygous seed donors. The advantage would not only be in reduced time to establish high-value commercial plantations, but also the preservation of heterozygosity and plasticity in such cloned coffee populations. Production of large numbers of plants of a unique hybrid, mutated somaclone or transgenic plant for field evaluation could be accomplished by micropropagation. Finally, it also may be useful to apply micropropagation to establish seed orchards for bulk seed production or cloning segregating parental lines for the synthesis of intervarietal hybrid seeds.

Coffee somatic embryogenesis was first established in *C. canephora* by Staritsky (1970) and in *C. arabica* by Söndahl and Sharp (1977). Coffee somatic embryos can be produced via "direct" and "indirect" embryogenesis. Somatic embryos obtained by direct embryogenesis are more limited in number than embryos derived from indirect embryogenesis. In the latter case, the cells undergo extensive proliferation leading to the

formation of a "friable embryogenic tissue" (FET) which later differentiates into normal embryos (Söndahl *et al.*, 1979, 1985). This self-cloning process may produce some subtle genetic differences (somaclonal variation) among plants derived from either direct or indirect embryogenesis (Söndahl and Bragin, 1991).

New micropropagation processes are being developed whereby the cloned plants will be produced inside bioreactor vessels, taking advantage of regeneration systems via somatic embryogenesis or organogenesis or even axillary shoot multiplication (Ammirato and Styer, 1985; Cazzulino *et al.*, 1991). The advantage of these new micropropagation technologies is the possibility of producing much larger numbers of cloned plants in smaller lab space, with reduced labor input and, probably, with a reduction in the total process time (starting from the bioreactor inoculation). The use of a bioreactor in a somatic embryogenesis process will increase by several-fold the multiplication capacity of one particular embryogenic cell line. Also, several bioreactor units can be operated simultaneously for multiplication of distinct cell lines. Bioreactors will permit a high degree of culture control and they are amenable to mechanization and robotics.

Over the past several years, we have researched the application of bioreactor vessels and/or liquid cultures for large-scale micropropagation. Initial efforts focused on adapting a spin filter bioreactor design to embryogenic cell systems like carrot and celery (Ammirato and Styer, 1986; Styer, 1986). More recently, we have worked with coffee, oil palm and rose embryogenic systems. In preliminary studies, friable embryogenic tissue (FET) isolated from coffee leaf explants of *Coffea arabica* and maintained on solid medium for 3 months was inoculated in liquid medium (Söndahl and Noriega, 1992). These FET cultures initiated at a low density increased 20-fold in packed cell volume. After this period, torpedo-stage embryos were observed at a low frequency. Cultures kept without any medium exchange for an additional 9 weeks differentiated entirely into embryos. Somatic embryos at different stages of differentiation were subcultured into liquid maturation medium for 4 weeks with a two-week subculture schedule. Mature embryos were plated on solid germination medium as individual embryos or in clusters. Preliminary data revealed a yield of 12,500 embryos from an original inoculum of 1.0 g f.w. FET cells (Söndahl and Noriega, 1992).

Excellent progress has been made for bioreactor micropropagation of *C. canephora* cell lines. Production rates of 460,000 coffee embryos/3-liters after 7 weeks in Erlenmeyer flasks, or 200,000 coffee embryos/liter bioreactor vessel after 8 weeks have been reported (Zamarripa *et al.*, 1991).

This paper presents the most recent progress for micropropagation of *C. arabica* through large-scale production of somatic embryos via bioreactor vessels. A simple design of a bioreactor for micropropagation purposes is also being presented.

MATERIALS AND METHODS

Plant material:

Leaf explants were obtained from mature leaves of *C. arabica* cv. Red Catuai plants grown under greenhouse conditions.

Isolation of friable embryogenic tissue:

Callus and friable embryogenic tissue (FET) were obtained following the protocols described by Söndahl and Sharp (1977) and Söndahl *et al.*, (1984). Mature leaves were disinfested, cut into small pieces (0.5 mm₂) and cultured in petri dishes containing the conditioning medium MSI (Table 1). Cultures are kept in darkness at 27 ± 2° C. After 6-8 weeks of culture in MSI medium, the explants were transferred to the secondary MSII medium for embryogenesis induction. Cultures were kept under the same culture conditions for approximately 4-6 months when the friable embryogenic tissue (FET) was isolated. FET colonies have been maintained on the same MSII medium through periodic subcultures in the form of early embryogenic tissue (EET), i.e. without the presence of globular stages of embryo development, for approximately 36 months.

Liquid cultures:

FET liquid cultures were initiated by inoculating about 0.5 g f.w. of FET in 15 ml of MSII medium devoid of gelrite. Erlenmeyer flasks of 125 or 250 ml were maintained on a rotary shaker at 100 rpm, at 25° C. in darkness. MSII medium was replaced twice a week for a period of 10-12 weeks. Fresh liquid medium was added as the packed cell volume (PCV) increased. After liquid cultures were completely established, they were divided every 3 weeks maintaining a cell density of about 5-10 ml PCV/100 ml. Only EET cells were present in these liquid cultures in the form of large cell clusters measuring about 0.5 - 1 mm in diameter.

Bioreactor embryo regeneration:

High frequency embryo regeneration was induced by inoculating FET liquid cultures into a bioreactor vessel at a density of 1-5 ml PCV of FET/liter of regeneration medium (RM, Table 1). A 5-liter magnetic bioreactor model (K. Ray Ono Biotech Instruments, Elmer, NJ, USA), specially designed for coffee micropropagation purposes, was utilized. The bioreactor was maintained at 70-120 rpm, at 25° C. in darkness. The RM was completely replaced by fresh medium every week for the next 5 weeks. Cell density was maintained at 1-5 ml PCV/liter by removing the excess tissue simultaneously with the spent medium. By the end of the 6th week, the bioreactor entered into a resting period for 4 weeks, after which the old medium was replaced by the embryo development medium (DM, Table 1). Four weeks later, embryos were harvested from the bioreactor vessel and samples were plated in large petri plates containing embryo germination medium (EGM, Table 1). An overall diagram summarizes the steps required for solid and liquid cultures leading to somatic embryos and plantlet production (Figure 1).

RESULTS AND DISCUSSIONFET solid and liquid cultures:

The isolation and maintenance of the friable embryogenic tissue (FET) on solid and liquid phases in a non-differentiated state is considered a critical requirement for the mass propagation of coffee via the production of somatic embryos. The early embryogenic tissue (EET) allows the long-term maintenance of embryogenic cells that are a valuable source for high frequency somatic embryo production. Using the described method, the coffee FET lines have been maintained on solid medium for approximately 3 years.

The liquid cultures currently used were derived from the long-term FET lines and have been maintained in the liquid phase for about 18 months (Fig. 2A). An important advantage of the present FET protocol is that no embryo filtration is needed for the establishment and maintenance of the liquid cultures. No advanced forms of embryo regeneration are present in these EET liquid cultures (Fig. 2B).

Bioreactor embryo regeneration:

The FET liquid cultures followed a regeneration/differentiation process for somatic embryo production inside the bioreactor according with the process flow summarized in Figure 3. FET cells were inoculated in the bioreactor vessel (Fig. 2C) and FET proliferation began during the second and third week of culture doubling its mass every week. The PCV was maintained at the initial level by removing the excess of tissue during medium exchange. At the 4th week, FET proliferation stopped and no further change in the PVC was observed. At this point, embryo regeneration began and the embryogenic aggregates became globular and more friable. Embryo regeneration was almost complete by the end of the 5th week (Fig. 2D). Very small amounts of undifferentiated tissue still remained in the bioreactor liquid medium. Fresh regeneration medium (RM) was added to the bioreactor vessel for the last time. Four weeks later, embryos enlarged considerably in sizes between 1-2 mm in length, and the presence of heart- and torpedo-shaped embryos was noticed (Fig. 2E). During the next 4 weeks, in the presence of the development medium (DM), the frequency of torpedo embryos increased considerably and at the expense of globular and heart-shaped embryos (Fig. 2F). Three random

samples of the bioreactor-produced embryo population revealed an average of about 25% torpedo, 45% heart and 30% globular embryos (Figure 4). The somatic embryogenesis method just described allows for a coffee micropropagation process, based on long-term embryogenic liquid cultures, that yields very large numbers of single embryos suitable for mechanization. An example of the three developmental stages of embryos collected from the bioreactor at the 14th week is illustrated in Fig. 2G. The total number of embryos estimated by three random samples was 45,000 embryos/ 5 liter bioreactor (Figure 5). A very important characteristic of this work is the fact that the embryos are produced as single units (isolated) which allows for embryo manipulation in a large micropropagation process. Samples of the bioreactor-derived embryos were plated on solid germination medium. These embryos began chlorophyll development 1-2 weeks later (Fig. 2H) and fully germinated embryos were visible at the 10th week (Fig. 2I).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the grant of the USAID/ABSP Project, DAN 4197-A-00-1126-00, which provided the support to carry out this work.

ABSTRACT

Vegetative propagation of coffee is highly desirable because it can reduce the time it takes to establish high-valued coffee plantations. Segregating hybrids, selected somaclone mutants or transgenic plants could be immediately scaled-up for commercial purposes. Coffee somatic embryos produced in liquid cultures inside bioreactor vessels are an ideal system for coffee micropropagation.

Friable embryogenic cultures (FET) were isolated from leaf cultures of *Coffea arabica* cv. Red Catuai and multiplied on solid medium for about 16 months. This FET cell line was used to establish embryogenic liquid cultures at a density of 5-10 ml packed cell volume (PCV) per 100 ml.

High frequency somatic embryo production was obtained after inoculating 18 month-old FET liquid cultures into 5-liter bioreactor vessels at a density of 1-5 ml PCV/liter. Fresh regeneration medium was provided during weekly changes for 5 weeks. Embryo development medium was added at the 9th week and embryos were harvested at the 14th week of culture. In this study, a low cost bioreactor model, specially designed for micropropagation purposes, was successfully tested. A total yield of 45,000 embryos were recovered from the 5-liter vessel. Samples of these bioreactor-generated embryos were plated on germination media to evaluate the plantlet conversion rate.

REFERENCES

- Ammirato, P. V. and Styer, D. J., 1985. Strategies for large-scale manipulation of somatic embryos in suspension culture. In *Biotechnology in Plant Science. Relevance to Agriculture in the Eighties*. M. Zaitlin *et al.* (eds.), Academic Press, New York, pp. 161-178.
- Cazzulino, D., Pederson, H. and Chin, C. K., 1991. Bioreactors and Image Analysis for Scale-up and Plant Propagation. In *Scale-up and Automation in Plant Propagation*. I. K. Vasil (ed.), Academic Press, New York, pp. 147-177.
- Kurtz, S. L., Hartman, R. D. and Chu, I. Y. E., 1991. Current Methods of Commercial Micropropagation. In *Scale-up and Automation in Plant Propagation*. I. K. Vasil (ed.), Academic Press, New York, pp. 7-34.

- Söndahl, M. R., and Noriega, C., 1992. Coffee somatic embryogenesis in liquid cultures. Proc. 2nd In *In Vitro Culture Horticultural Breeding*. Baltimore. USA.
- Söndahl, M. R., and Bragin, A., 1991. Somaclonal variation as a breeding tool for coffee improvement. ASIC, 14th Intl. Conf. Coffee Science, San Francisco, CA, USA, pp. 701-710.
- Söndahl, M. R., Nakamura, T. and Sharp, W. R., 1985. Propagation of Coffee. In *Tissue Culture in Forestry and Agriculture*. R. R. Henke, et al. (eds.), Plenum Press, New York, pp. 215-232.
- Söndahl, M. R., Nakamura, T., Medina, H. P., Carvalho, A., Fazuoli, L. C., and Costa, W. M., 1984. Coffee. In *Handbook of Plant Cell Culture, Crop Species*. Ammirato, P. V., Evans, D. A., Sharp, W. R. and Yamada, Y. (eds.), Macmillan, New York, Vol 3, pp. 564-590.
- Söndahl, M. R., Salisbury, J. I., and Sharp, W. R., 1979. SEM characterization of embryogenic tissue and globular embryos during high frequency somatic embryogenesis in coffee callus cells. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 94, 185-188.
- Söndahl, M. R. and Sharp, W. R., 1977. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L., *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 81: 395-408.
- Staritsky, G., 1970. Embryoid formation in callus cultures of coffee. *Acta Botanica Neerlandica*, 19: 509-514.
- Styer, D. J., 1986. Applications and bioreactor technology to seed production and plant propagation. In *Proc. Agriculture and Life Sciences in China*. Seed certification and seed technology. Inst. Intl. Dev. Edu. Agric. Life Sci., Beltsville, MD, USA pp. 112-127.
- Zamarripa, A., Ducos, J. P., Tessereau, H. Bollon, H., Eskes, A. B. and Petier, V., 1991. Development d'un procede de multiplication en masse du cafeier par embryogenese somatique en milieu liquide. 14th Intl. Conf. Coffee Science, San Francisco, CA, USA, pp. 392-402

Table 1. Culture media for solid and liquid cultures of *Coffea arabica* tissues.

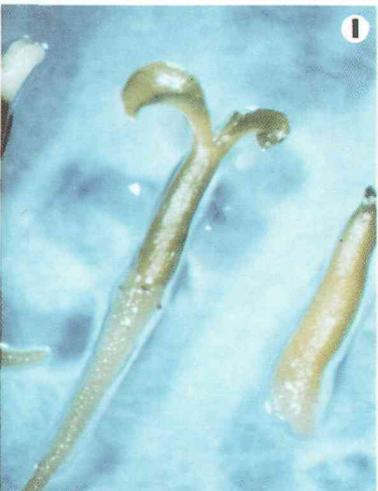
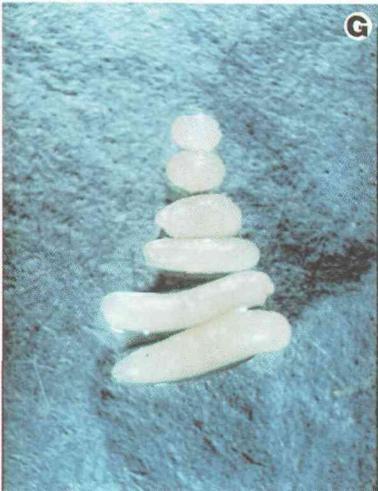
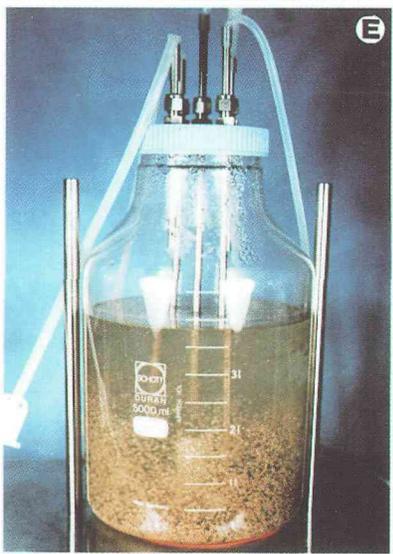
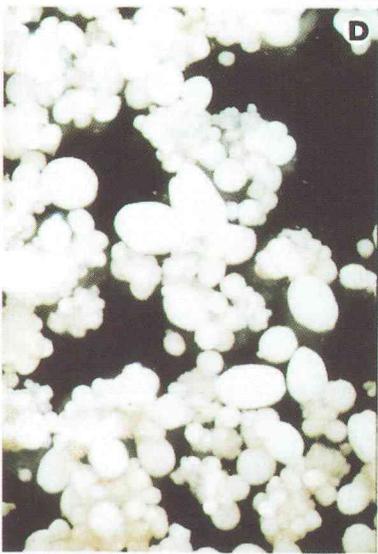
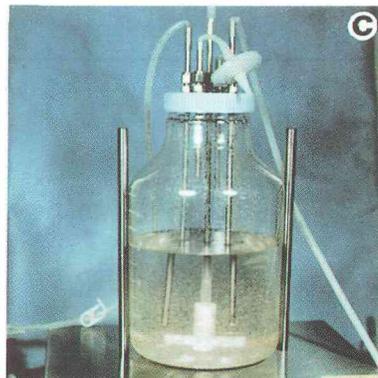
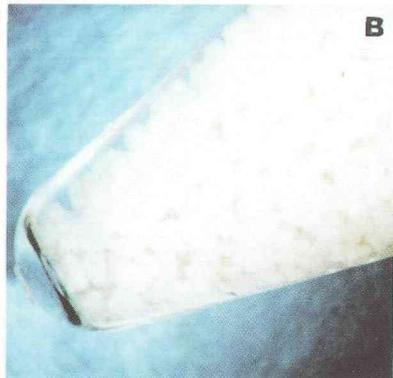
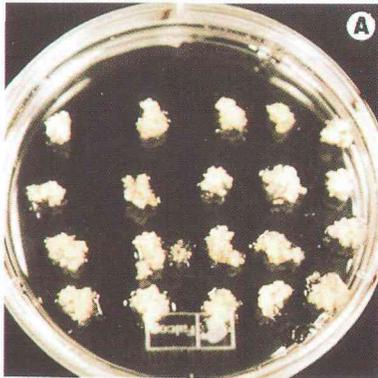
Medium	MSI	MSII	RM	DM	EGM
MS Salts	1 X	0.5 X	0.5 X	0.25 X	0.5 X
Vitamins*	1 X	0.5 X	1 X	1 X	1 X
Inositol (mg/l)	100	50	100	100	100
Cysteine (mg/l)	33	33		33	33
Kinetin (mg/l)	4	1	5-15		
Zeatin (mg/l)					0.1-0.1
Adenine (mg/l)			40		
2,4 D (mg/l)	1				
NAA (mg/l)		0.1			
ABA (mg/l)			0.3-3.0	0.1-0.8	0.01-0.10
Gelrite (g/l)	2.4	2.4			
Sucrose (g/l)	40	20	30	30	20
Casein-HCl					500
Malt Extract (mg/l)			400		100
Kao Vitamins				1 X	
Coconut Water				5%	
PVP-40 (g/l)**					10
pH	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5

* Coffee vitamins (1X): nicotinic acid (1.8 mg/l), thiamine HCl (10.1 mg/l) and pyridoxine (3.1 mg/l).

** Polyvinylpyrrolidone.

Figure 2. Mass production of coffee somatic embryos and plantlets using a bioreactor culture process.

(A) Coffee friable embryogenic tissue at early stage (EET) maintained through frequent subcultures on solid medium. (B) Aspect of FET cultures maintained in liquid medium for almost 2 years. Cluster size: about 0.5 - 1 mm. (C) Coffee bioreactor initiated with FET cells at a density of 1 ml packed cell volume (PCV)/l. (D) Globular and heart stages of embryo regeneration after 5 weeks of culture in regeneration medium inside the bioreactor. (E) Aspect of coffee bioreactor after 9 weeks in culture. Coffee tissue is at a density of 12.5 ml PCV/l and mainly composed of free embryos at the globular, heart and torpedo stages with little FET residue. (F) Close-up of the coffee embryo population after 14 weeks of culture in the bioreactor. Final tissue density: 225 ml PCV/l. (G) Example of the three types of embryos collected from the bioreactor after 14 weeks of culture initiation. Torpedo stage, 3-4 mm; hear stage 1.5 - 2.0 mm and globular stage, 0.7 - 1.0 mm. (H) Embryo growth after 8 weeks of culture on germination medium. Chlorophyll developed 1 - 2 weeks later and slow cotyledon expansion started at the same time. (I) Fully germinated embryo after 10 weeks on germination medium.



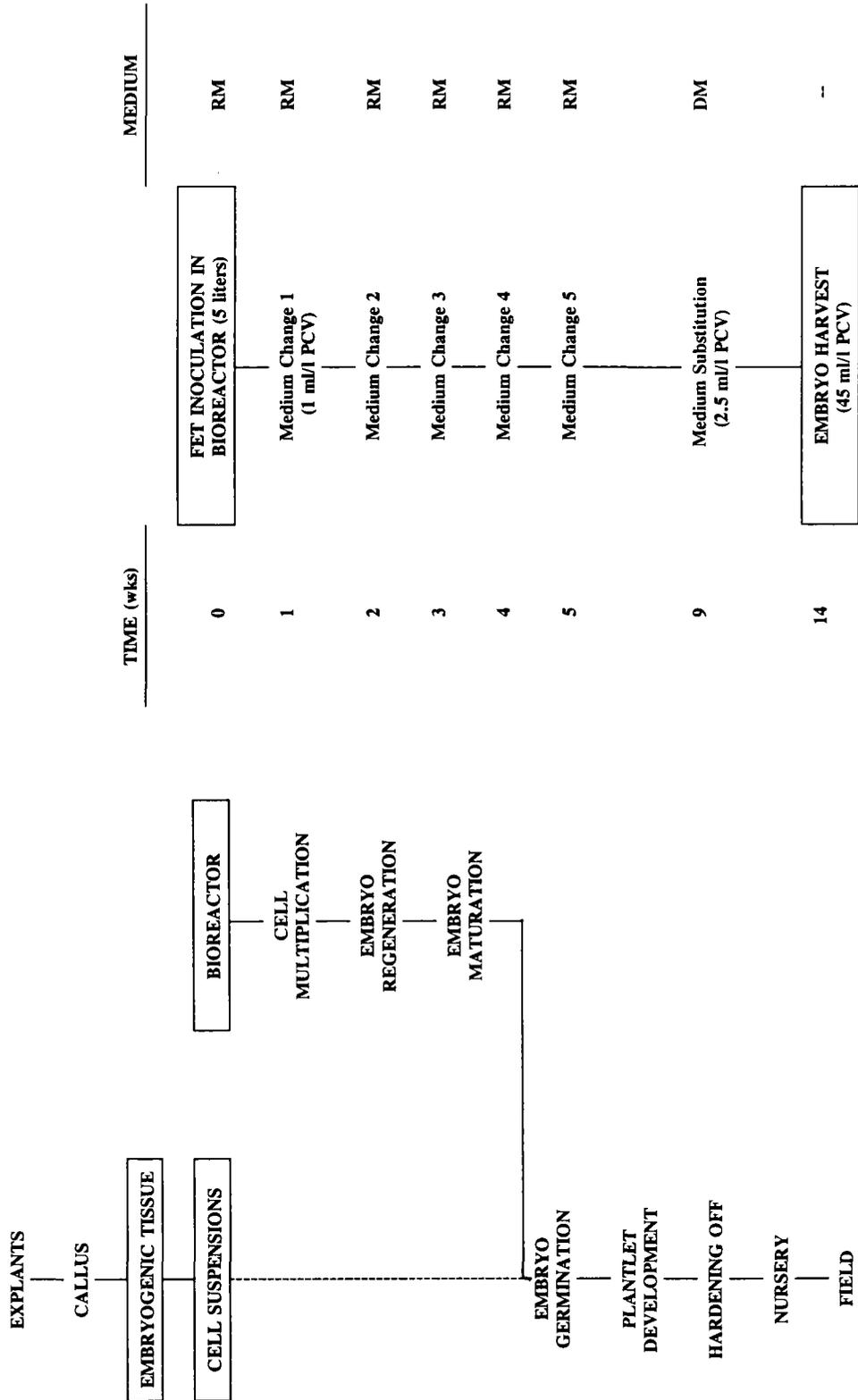


Figure 1. Bioreactor Micropropagation Flow

Figure 3. Process flow for arabica coffee bioreactor micropropagation

BIOREACTOR MICROPROPAGATION EMBRYO STAGE DISTRIBUTION

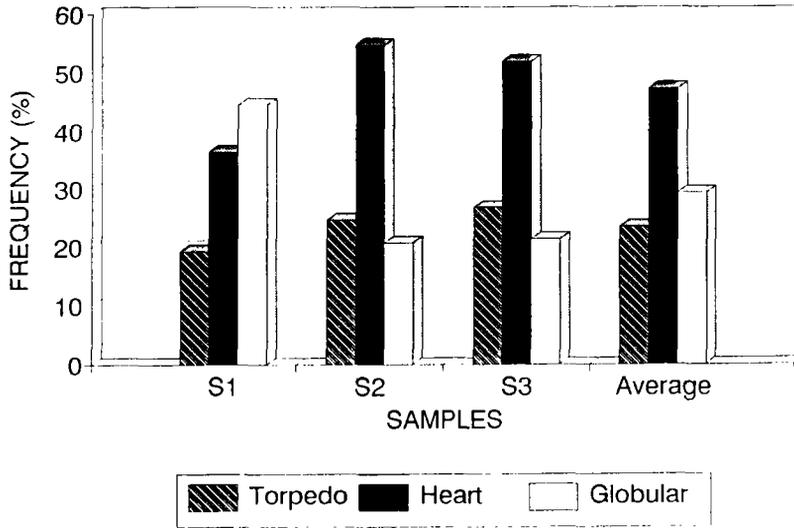


Figure 4

BIOREACTOR MICROPROPAGATION SOMATIC EMBRYO PRODUCTION (5 liter)

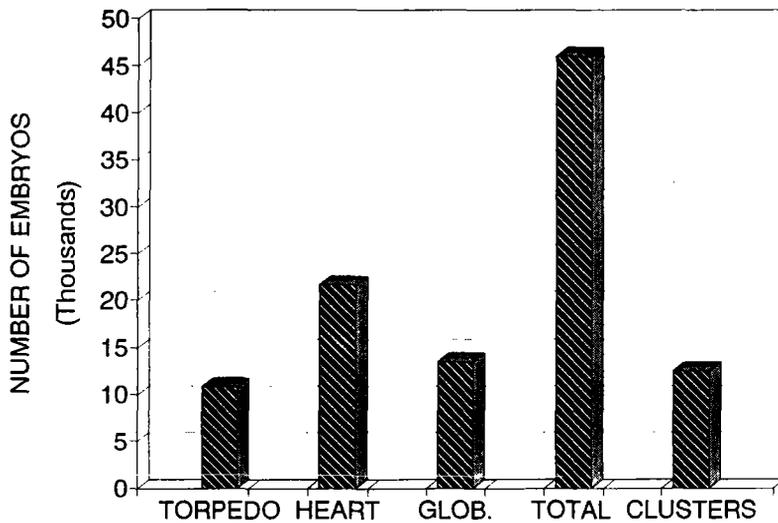


Figure 5

SOMATIC EMBRYOGENESIS INDUCED BY CULTURE ON SINGLE MEDIA IN COFFEE PLANTS FROM CROSSES OF *COFFEA ARABICA* BY TIMOR HYBRID

M. E. APONTE ACUÑA

Scientific Researcher - Biotechnology Section, CENICAFÉ, Chinchiná, Caldas, Colombia

INTRODUCTION

An important application of somatic embryogenesis is gene transfer to embryogenic cells, which opens the possibility to obtain transgenic plants.

The breeding program of CENICAFÉ in Chinchiná, Colombia, has selected some materials that are being used for gene transfer experiments. The final goal for these experiments is the development of a transformation system to introduce coffee berry borer resistance to commercial varieties.

Previously, these materials (derived from crosses *C. arabica* variety Caturra x Timor Hybrid) have been selected for their agronomic characteristics, resistance to leaf rust and to coffee berry disease.

Genotype, tissue type, stage of the donor plants, composition of the medium culture, type and concentration of hormones, may all be determining factors in the embryogenic process. All of these factors are being studied at CENICAFÉ in order to establish an efficient procedure.

Somatic embryogenesis may be "direct" with embryogenic cells developing directly from explant cells or it may be "indirect" when embryogenic cells develop from an unorganized structure called callus. This callus is formed through a number of unorganized, non embryogenic mitotic cycles.

We are evaluating in CENICAFÉ the embryogenic ability of 15 genotypes and different media for the "direct" as well as for the "indirect" pattern of embryogenesis.

This report refers to the "direct" embryogenesis induction using two genotypes and two media. We describe a simple methodology which allows us a quick and highly efficient embryogenic induction. This is an auxin-autotrophic system, using only one kind of cytokinin in low concentration, as inducing agent. We discuss the characteristics of the embryogenic tissue and their potential applications.

Preparation of the donor plants

The donor plants were mature trees (8 - 10 years old) grown on field conditions. Leaf explants were obtained from soft young leaves from new suckers initiated by pruning. The donor plants were fertilized 4 times a year and sprayed with benomyl 1.5 gr/l each week.

Preliminary experiments showed that for "direct" embryogenesis the better explants should be obtained from fully expanded leaves preferentially from the first pair. If they have not completed their development, leaves from second pair may be taken.

Tissue culture technique

Leaves were surface sterilized (3 - 5% Sodium Hypochlorite) for 10 minutes and rinsed three times in sterile destilated water. Leaf explants of ca 1 cm² were cut from the leaf blade excluding the midvein, margins, and the apical and basal portions of the leaf. The explants were cultured "in vitro" in media autoclaved (during 20 min at 120° C). The cultures were incubated in (10 x 100 mm) petri dishes charged with 25 - 30 ml of media, in the dark at 26° C ± 1.

In Table 1, the composition of the media is shown. It contains the macro and micro nutrients of the MS medium in diluted concentration and the vitamins of Gamborg medium. The difference between the two media is the concentration of macronutrients and the kind of cytokinin.

TABLE 1. Media's composition.

	Composition of the media	
	<u>LIQC-1</u>	<u>NAR 1/4</u>
MS (macronutrients)	1/2 x	1/4 x
ms (micronutrients)	1/2 x	1/2 x
Piridoxine	1 mg/l	1 mg/l
Thiamine	10 mg/l	10 mg/l
Nicotinic acid	1 mg/l	1 mg/l
Myo-inositol	100 mg/l	100 mg/l
Sucrose	30 gr/l	30 gr/l
BAP (6-Benzylaminopurine)	1 mg/l	-
2 ip (2-Isopentenyl adenine)	-	1 mg/l
pH	5.8	5.8
Agar	7 gr/l	7 gr/l

Score system

The explants were scored for embryogenic tissue induction at least 1 time/month during the first 3 months. Explants that formed one or more embryogenic tissue colonies were scored as positive. Embryogenic tissue can be detected without ambiguity using a low powered binocular microscope (10x).

Statistical analysis

The experimental unit was considered to be a petri dish, containing ten explants. For each genotype and medium 10 petri dishes were cultured. The experimental design was complete randomized.

RESULTS

The Table 2 shows the frequency of embryogenic induction (% of explants with embryogenic tissue) in the two genotypes and the two media evaluated. The analysis of variance showed highly significant differences between genotypes and media. The interaction was not significant. The more embryogenic genotype was the F5 302 and the better medium the NAR 1/4 (Table 2).

About the effect of the hormone 2-ip (contained in NAR 1/4 medium) the present report confirms the results obtained by Hatanaka et al., (1991) with *C. canephora* about the more efficient effect of 2-ip compared with BA.

With the genotype F5-302 in the medium NAR 1/4 a induction of 93% was obtained. The colonies of embryogenic tissue were initiated after two months in culture, without any transfer of the explants to fresh medium. It represents an important gain in time, medium consumption and manual labour, compared with the indirect induction through calli. According to Zamarripa et al. (1991) and Sondhal (1985) 8 to 9 months are required to obtain the embryogenic stage, when the indirect method is used.

TABLE 2. Frequency of embryogenic tissue induction ($X \pm SD$) in two genotypes and two media, after 4 months in culture.

Media	Genotype		Diff.
	F5-302	F5-31	
LIQC-1	0.77 \pm 0.21	0.05 \pm 0.06	0.72**
NAR-1/4	0.93 \pm 0.12	0.35 \pm 0.23	0.58**
Diff.	0.16**	0.3**	

** Difference highly significant
CV = 28%

Furthermore, in our experiment, a large rate of embryo multiplication per explant is obtained, as will be discussed later.

This experiment confirms the general observation about the strong difference in embryogenic response of the genotypes studied. Hodges (1992)* working with corn recently has shown that these differences in embryogenic response are genetically controlled.

CHARACTERISTICS OF THE EMBRYOGENIC TISSUE: EMBRYO CLONING

On the Figure 1, we can see that two kinds of microcalli are formed on the explants.

1. Small globular compact calli constituted by rounded cells.
2. Greater amorphous not compact calli constituted by parenchimatous elongated cells.

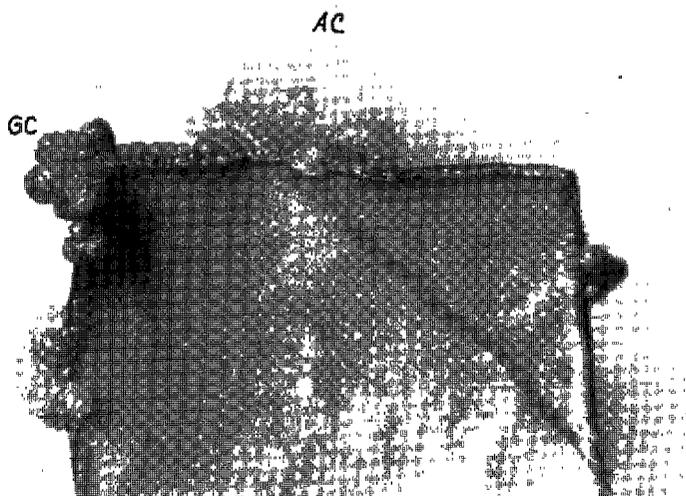


FIGURA 1. Kinds of calli formed on the explants after two months in culture.
GC: Globular compact calli; AC: Amorphous calli.

* Plant Biotechnology explored in Indianapolis. Science (USA) 255 (5040):25. 1992.

From the globular compact microcallus a Friable Embryogenic Tissue initiates and only in the contact areas of the explants with the medium (Figure 2). It was showed by means of radioactivity by Hatanaka et al. (1991) that cytokinins remain at the cut areas and are not transported into leaf tissue.

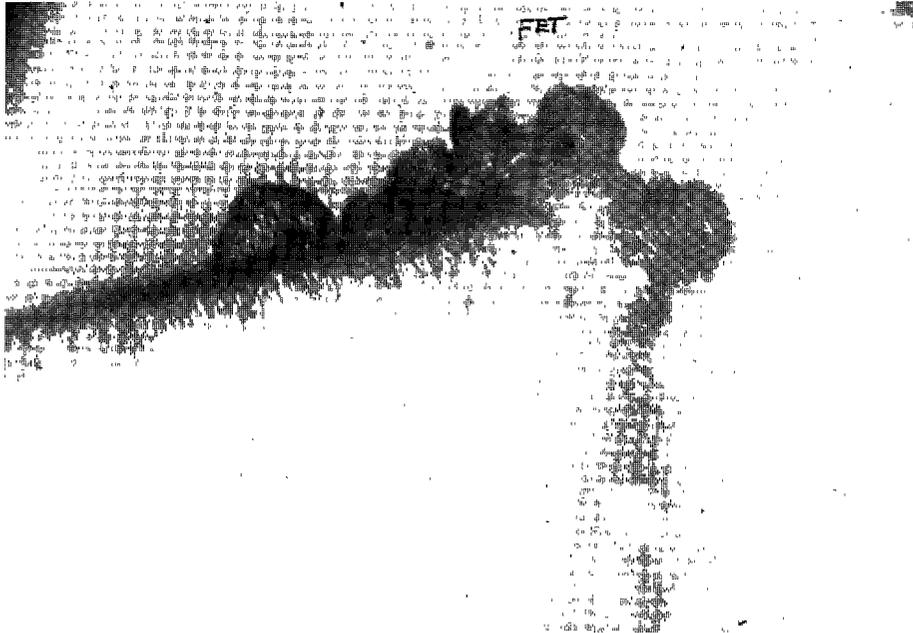


FIGURE 2. Friable embryogenic tissue (FET) initiating from small globular calli.

At the early stage, this friable embryogenic tissue is constituted by clumps of embryogenic, small, dense cytoplasm, rounded cells with a high proliferation capacity which is related with a short cellular cycle (Figure 3).

The phenomenon of direct formation of embryogenic tissue on the explants is described by Wann (1990) and Merckle et al. (1990) as the cloning of pre-embryogenic determined cells (PEDC). This cloning constitutes a large scale pro-embryos reproduction.

We assume that some "pre-embryogenic cells" (PEDC) presents in the explants are cloned and require less epigenetic re-programming than the "Induced embryogenic determined cells" (IEDC) in the indirect process.

If the embryogenic tissue remains adhered to the explant, a heterogeneous mass is observed, consisting of embryogenic tissue and numerous developing embryos in different stages (Figure 4). Very few embryos can be transferred to germination medium. It means that the plant conversion frequency is too low.

To speed up the development and increase the conversion frequency it is advisable to isolate the early embryogenic tissue to liquid medium (Figure 5).

In this case, the conversion frequency is very high. Studies for optimization of the liquid medium are in progress. Some preliminary assays have shown that from 50 mg. of embryogenic tissue (100 ml of medium in 250 ml erlenmeyer) it is possible to obtain about 1200 embryos.

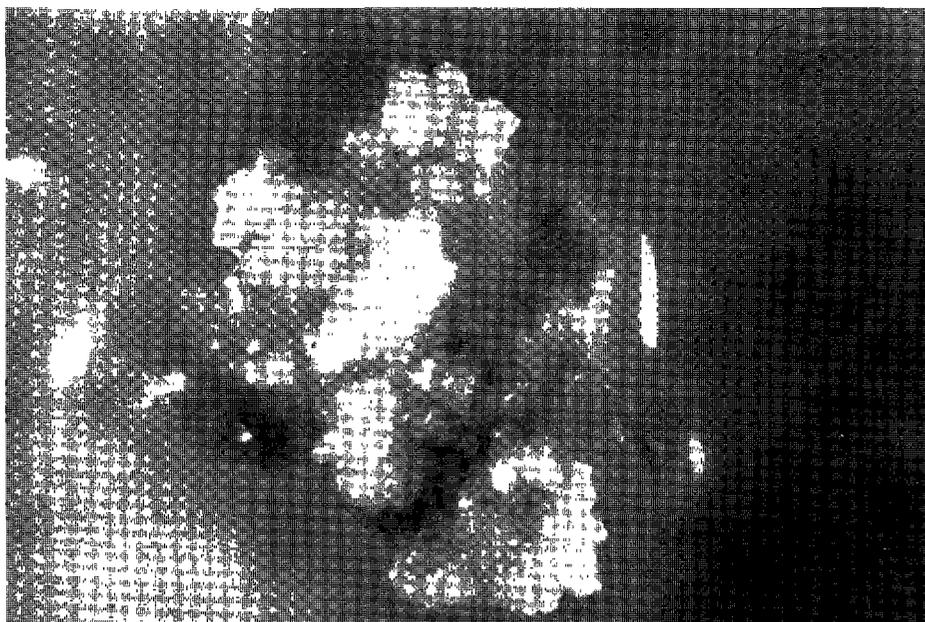


FIGURE 3. Clump of embryonic tissue at the early stage.



FIGURE 4. High frequency somatic embryogenesis directly on the explants. Heterogeneous mass consisting of embryonic tissue and numerous developing embryos different stages.

The potential applications of Embryo Cloning

- Mass propagation
- Protoplast culture
- Gene transfer
- Biochemistry studies
- Embryo cryopreservation
- In vitro screening and selection.

CONCLUSIONS

1. In the coffee genotypes evaluated cytokinins can induce the embryogenic state by **Direct Somatic Embryo Cloning**.
2. 2-ip is more efficient than BA in the genotypes evaluated.
3. There are genotype differences.
4. Compared with Indirect Induction, the direct process is advantageous in aspects as time saving, medium cost and manual labour requirements.

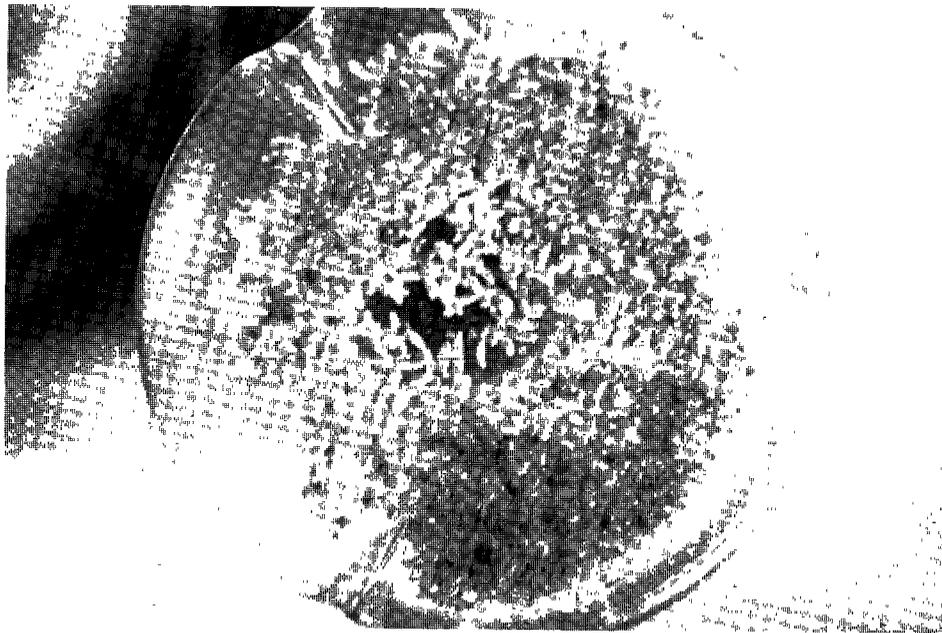


FIGURE 5. Embryos in liquid medium.

BIBLIOGRAPHY

1. HATANAKA, T.; ARAKAWA, O.; YASUDA, T.; UCHIDA, N.; YAMAGUCHI, T. Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of Coffea canephora. Plant Cell Report (Alemania) 10 (3): 179-182. 1991.
2. MERKLE, S.A.; PARROT, W.A.; WILLIAMS, E.G. Applications of somatic embryogenesis and embryo cloning. In: Bhojwani, S.S. Ed. Plant tissue culture: applications and limitations. Amsterdam (Holland) Elsevier, 1990. pp.67-101.
3. SONDAHL, M.R.; NAKAMURA, T.; SHARP, W.R. Propagation of coffee. In: Tissue culture in forestry and Agriculture N.Y. (USA). Penum Publishing Co, 1985. pp. 215-231.

4. WANN, S.R. Somatic embryogenesis in woody species. In: Biotechnology in Agriculture and forestry. Haploids in crop improvement I. London (Inglaterra) Springer-Verlag, 1990. pp. 153-181.
5. ZAMARRIPA, A.; DUCOS, J.P.; BOLLON, H.; DUFOUR, M.; PETIARD, V. Production d'embryons somatiques de caféier en milieu liquide: effets densité d'inoculation et renouvellement du milieu. Café Cacao Thé (Francia) 35(4): 233-244. 1991.

SUMMARY

An efficient and reproducible method is being developed to be used as a regeneration system of coffee plants, within a genetic transformation project. From preliminary experiments two media were chosen: LIQC-3 (MS: 1/2 strength salts; B5: organic constituents; sucrose: 30 g/l; BA: 3 mg/l) and NAR-1/4 (MS: 1/4 strength macro salts and 1/2 micro salts; B5: organic constituents; sucrose: 30 g/l and 2-ip: 1 mg/l). Five, from nine genotypes tested, showed high frequency of induced white friable embryogenic tissue (ET), with marked proliferation capacity. Leaf explants cultivated should be obtained from soft young leaves from new suckers initiated by pruning. The mother trees were fertilized 4 times a year and sprayed with benomil 1,5 g/l each week. In one experiment the genotypes F5.31 and F5.302 appeared embryogenic in both media, LIQC-1 (BA: 1 mg/l) and NAR-1/4. The genotype F5.302 and the medium NAR-1/4 were notably efficient according to the ANOVA, being the variable analyzed the percentage of explants with ET (P, media: 0.003 and P, genotypes: 0.0001). By using the combination F5.302-NAR 1/4 ET was induced in 93% of the explants, after two months in culture and without any subculture. These results suggest that 2-ip is more effective than BA for somatic embryogenesis in the coffee genotypes evaluated.

PRODUCTION OF SOMATIC EMBRYOS OF COFFEE IN A BIOREACTOR

J. P. DUCOS *, A. ZAMARRIPA **, A. B. ESKES ***, V. PÉTIARD *

* Francereco NESTLE, 101, Avenue Gustave Eiffel, 37390 Notre-Dame-D'Océ, France

** CIFAP. CHIAPAS. INIFAP. SARH. Mexique

*** IRCC/CIRAD, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

INTRODUCTION

The cultivation of somatic embryos in liquid medium offers the opportunity for the large scale propagation of selected coffee trees of selected varieties (Staritsky and Van Hasselt, 1980; Neuenschwander and Baumann, 1992; Sondahl and Noriega, 1992). In the last ASIC colloquium, we described a mass propagation process for coffee (Zamarripa *et al.*, 1991b) which is based on the obtainment and maintenance in liquid medium of embryogenic strains composed of undifferentiated tissue with embryogenic potential. A cycle of production contains two phases:

-multiplication of embryogenic tissues (undifferentiated phase)

-induction and development of embryos from these tissues (embryo production phase)

We have assumed the scale-up of the embryo production phase in a bioreactor. Industrial plant cell cultivation for biomass production has reached vessel volumes of up to 75,000 litres ; however, little attention has been paid to the development of somatic embryo culture using bioreactors (Preil and Beck, 1991; for review). The advantages of bioreactors over conventional culture vessels (e.g. Erlenmeyer flasks) are obvious including increased culture size (scale-up) and ease of control and automation including medium renewal, embryo harvesting and the monitoring of different parameters , such as aeration rate, pH, oxygen, carbon dioxide and ethylene concentrations. The effects of environmental factors can be investigated and analysed more precisely. Nevertheless, at present very little data exists concerning the induction and development of somatic embryos in liquid medium and on the optimum levels of these different parameters and the dynamics of uptake of media compounds. It is well known, for instance , that gases produced by the tissues (mainly CO₂ and C₂H₄) can have positive or negative "feed-back" effects on "in vitro" cultures; there is at present little information on the effects of these gases on embryogenesis in suspension cultures.

We describe below the kinetics of development of *C.canephora* and Arabusta somatic embryos in a 3 L. stirred bioreactor and the changes occurring in various parameters (oxygen, CO₂ and C₂H₄) during these cultures.

MATERIALS AND METHODS

Material and general procedure

C.canephora (code R2) and Arabusta (code1312) genotypes were provided kindly by IRCC. Embryogenic strains were established and grown in liquid medium as previously reported (Zamarripa *et al.*, 1991a; Zamarripa,1993). Embryogenesis was initiated in 250 ml shake flasks containing 100 ml of medium. Flasks were agitated at 100 rpm on an orbital shaker. Embryogenesis was initiated with an inoculation density of 0.5 FW/l and the medium were regularly renewed according to optimal conditions described by Zamarripa *et al.*, (1991a)

Bioreactor culture

The fermentation system used was a 3 litre (working volume) stirred bioreactor (model SET4CV, Setric SGI). Agitation was provided by a 4-blade "cell- lift" propeller . The temperature was maintained at 26 C°. Spent medium was regularly removed , after stopping agitation and after tissue sedimentation, by air pressure and replaced by fresh medium. The air flow rate was measured by flowmeter (Setric) and expressed as the volume of air per medium volume per minute (VVM). A sparger equipped with a stainless filter was used to aerate the medium. Dissolved oxygen concentration (DO2) , expressed as a percentage of the saturation value, was measured with an Ingold probe. The initial volumetric oxygen transfer coefficient (K_{la}) was determined dynamically as a function of the aeration rate using a gassing out method to measure the increase in oxygen concentration. Oxygen uptake rate and critical DO₂ value (DO₂ crit.) were measured during runs by the decrease of DO₂ after ceasing aeration . Carbon dioxide and ethylene concentrations in the outlet gas stream were measured by gas chromatography (CPG VARIAN).

RESULTS AND DISCUSSION

1. Preliminary experiments

The maximum embryo production for *C.canephora* obtained in a bioreactor under different initial culture conditions are reported in table I. It must be emphasized that during the work of optimization (1.5 year), the embryogenic potential of the *C.canephora* strain progressively declined (Tessereau et al., 1993). Consequently, in order to determine the optimal culture conditions, production levels reached in the bioreactor need to be compared those obtained in flasks inoculated at the same time and under identical conditions of inoculation and medium renewal.

Table I : Scale-up: preliminary experiments in a 3 L. bioreactor

INITIAL (1) AGITATION (rpm)	INITIAL (1) AERATION (VVM)	OXYGEN TRAFNER COEFFICIENT K _{la} (h ⁻¹)	MAXIMUM EMBRYO YIELD (2) (X 10 ⁶ / liter)	RATIO MAXIMUM EMBRYO YIELD (2) <u>bioreactor</u> flask
50	<0.01	<2.8	0.06	<0.1
50	0.04	5.5	0.18	2.2
50	0.08	11.4	0.20	0.4
50	0.16	20.8	0.39	0.5
100	0.04	6.8	0.00	<0.1
50 (darkness)	0.16	20.8	0.08	<0.1

(1) Culture conditions day 0---day21

(2) Measured at day42 or 48

Shear stress, caused by an agitation speed of 100 rpm, had a detrimental effect on the induction of embryogenesis. Darkness also suppressed this phenomenon. Consequently, the following runs, concerning the effect of the initial aeration rate, have been initiated under residual light and with an initial agitation rate of 50 rpm.

The highest ratio, achieved when comparing bioreactor maximum embryo production with that of the flasks ("Bprod./F prod."), was obtained with an initial aeration rate of 0.04 VVM (K_{la}= 5.5 h⁻¹). The use of higher aeration rate led to a decrease in this ratio . It is possible that embryogenesis is inhibited by the removal of positive volatile compounds such as CO₂ and C₂H₄. It may be also be reduced by the increase of the hydrodynamic stress as a result of high flow rates : bubbles rising through the broth form foam in which clumps become entrapped and may be nutrient depleted. Embryogenesis was found to be strongly inhibited when the initial aeration rate was lower than 0.02 VVM. In this case, inhibition appeared as early as day 28 (figure 1): indeed, when the aeration rate was maintained at a value lower than 0.02 VVM until day 21, in order to control the DO₂ level close to 30 % of the saturation , the "Bprod./Fprod." ratio was 0.03 at day 28. In contrast , this ratio was 0.60 with a constant aeration rate of 0.08 VVM. In this case, this inhibition is most likely the result of oxygen limitation, although high concentrations of CO₂ or C₂H₄ due to inadequate ventilation may also cause inhibition. Indeed, several measurements taken at day21 during different runs shown that DO₂ crit. was higher than 40 %

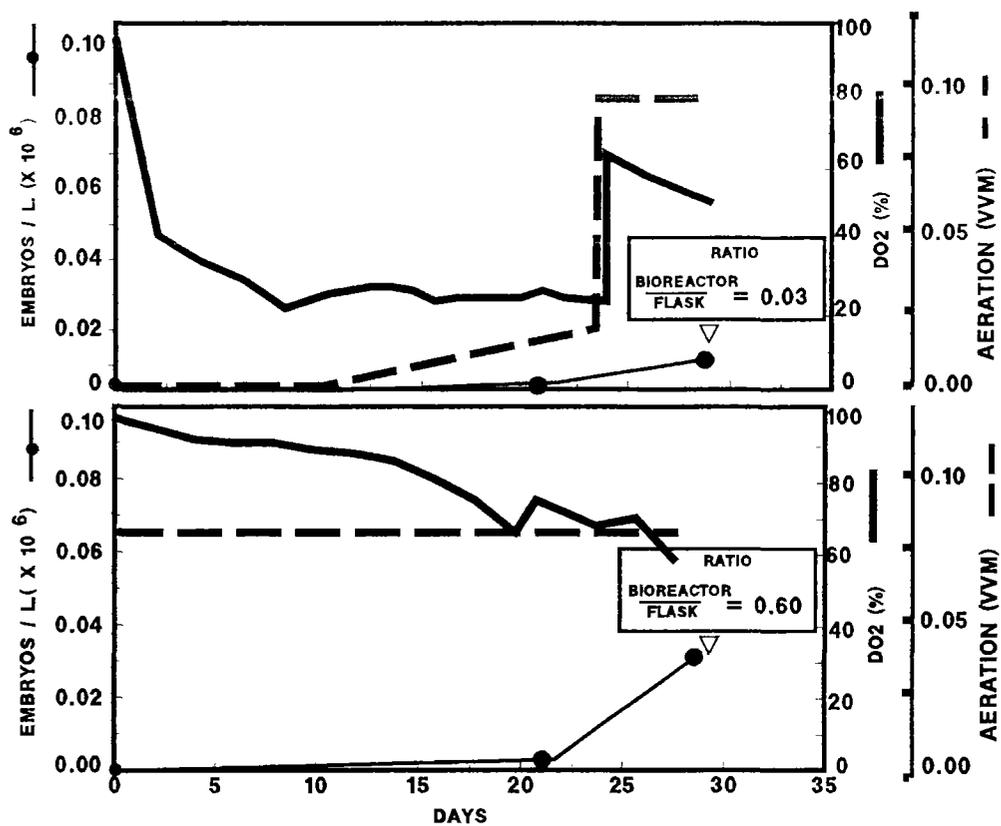


Fig 1. Production of embryos under various aeration rate and DO₂

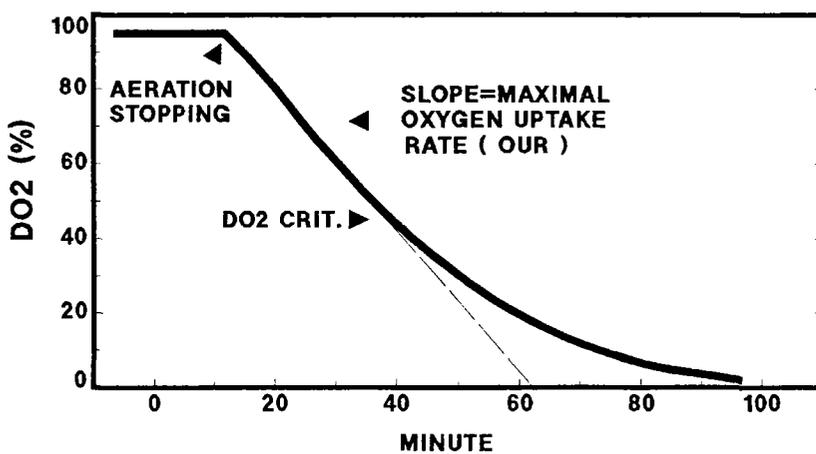


Fig. 2. Determination of DO₂ crit. at day21

figure 2). Lower DO₂ values may cause growth limitations of biomass (Pareilleux and Vinas, 1983) and, consequently, inhibition of embryogenesis. Such a high DO₂ crit. value can be explained by the large size of embryogenic tissues of coffee (0.3 to 1.5 mm): if sufficient cell aggregation occurs, the liquid film resistance to the oxygen transfer around the clumps may be significant (Taticek et al., 1991).

2. Production in a 3 L. bioreactor

Examples of the kinetics of development of C.canephora and Arabusta somatic embryos are shown in figures 3 and 4. According to previous results the following procedure was chosen:

- agitation speed was maintained at the lowest level (50 rpm) as long as mixing was sufficient (until day 21), after which it was progressively increased to 100 rpm
- air flow rate was adjusted throughout the runs at the lowest level sufficient to maintain DO₂ higher than DO₂ crit..

During these experiments, aeration rate was progressively increased from 0.04 to 0.16 VVM (figure 3b and 4b): consequently, DO₂ was maintained higher than 30 % and higher than DO₂ crit. all over cultures. It was found that DO₂ crit. decreased as a function of culture age.

In the case of C.canephora (figure 3a), a large production begun at day21; embryo concentration increased until day48 with an average production rate of about 6,500 embryos per litre and per day (maximum embryo yield $0.18 \cdot 10^6$ ebr/l). The first torpedo-shaped embryos appeared at day28, and at the end of this culture 70% of the total embryos had reached this stage. The FW and DW increased until the end of the run at day58 (220 and 18 g/l, respectively). The ratio DW/FW remained at a constant value of about 12%. The embryo-to-plant conversion rate of the produced torpedo embryos, measured on semi-solid medium, was similar to the one obtained with embryos produced in a flask (47%).

The production of Arabusta embryos reached a maximum concentration of about $0.45 \cdot 10^6$ at day42 (figure4a), that means an average appearance rate of about 16,000 ebr/l/d. The maximum FW and DW, reached at day42, were 360 g/l and 30g/l, respectively. In the case of our Arabusta strain torpedo-shaped embryos were rarely identified either in the flaskst or in the bioreactor (only 7% of the total embryos). Nevertheless, embryo-to-plant conversion of the large globular embryos produced in the bioreactor (size= 1mm) was 35%, compared to 20% per flask produced globular embryos.

3. Determination of oxygen uptake an of CO₂ and C₂H₄ production rate

Changes in CO₂ and C₂H₄ concentrations in the bioreactor outlet gas stream during an Arabusta embryo production are shown in figure 5. CO₂ concentration increased until day28 (4 ml/l) then decreased. C₂H₄ concentration progressed between 20 and 60n/l. It must be emphasized that the increases in CO₂ and C₂H₄ concentrations were limited due to the progressive increase of the aeration rate, which is in contrast to the situation found in flask..

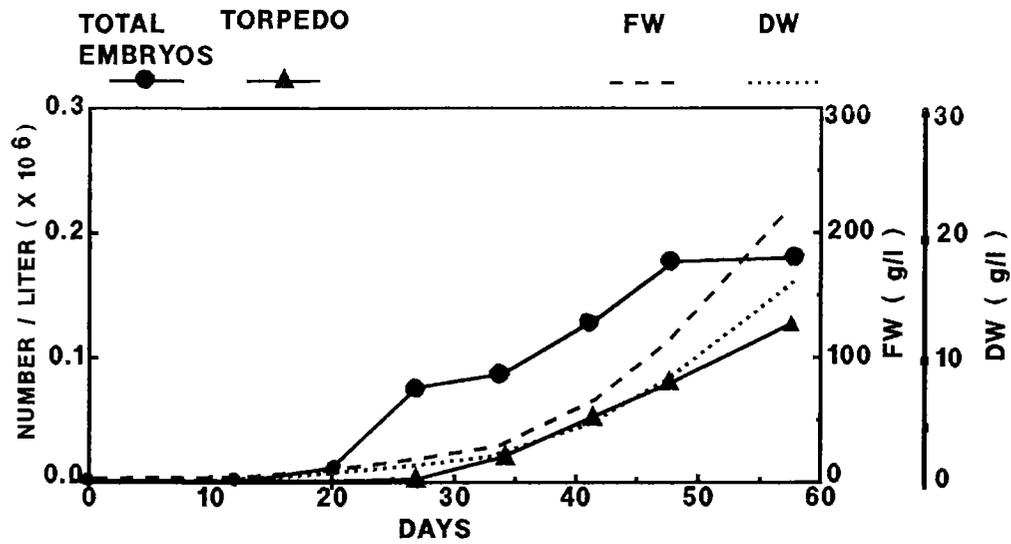
Evolution of oxygen uptake rate and of CO₂ and C₂H₄ production rate, total (on a liter suspension basis) and specific (on a gDW basis), are reported in figure 6. Total oxygen uptake rate increased during the culture from 0.2 to 2.0 mmole/h.l due to the increase of the biomass. In contrast, the specific oxygen uptake was maximum at day21, when the embryo production commenced and afterwards declined. The pattern of production of CO₂ and C₂H₄ mirrored the pattern of oxygen utilisation. Maximum total production of CO₂, reached at the end of the culture, was 1.9 mmole/h/l; maximum specific production occurred at day21 (0.2 mmole/h.gDW). In the case of C₂H₄, maximum total and specific production rate were 30 nmole/h.l and 3.8 nmole/h.gDW, respectively.

Specific oxygen uptake and specific production rate of CO₂ and C₂H₄ decrease as a function of cultivation time. Similar curves have been obtained in the case of the production of C.canephora embryos. These changes occurring with the age of embryogenesis may be possibly be due to a lower metabolic rate in the more mature embryos. Alternatively, it could be caused by a higher mass transfer resistance resulting similarly in lower of gas uptake and production.

CONCLUSION

This study has characterized the kinetics of development of coffee somatic embryos in a bioreactor. According to the chosen procedure a production of about 200 to 400.000 ebr/l is commonly achieved within two months for an inoculation density of 0.5 gFW/l. The production obtained in a bioreactor is of the same magnitude as in shake flask (Zamarripa et al., 1991 ab). It is important, from a bioprocessing perspective, to know how the growth and development of embryo populations is affected by environmental and nutritional factors. This study has also described the changes on oxygen uptake and CO₂ + C₂H₄ production rate during embryogenesis. Further studies are needed to know the effects of these gases on the embryo production rate but also on the quality of the produced embryos.

A: Kinetics development of embryos and biomass



B: Changes in DO₂, DO₂ Crit. and aeration

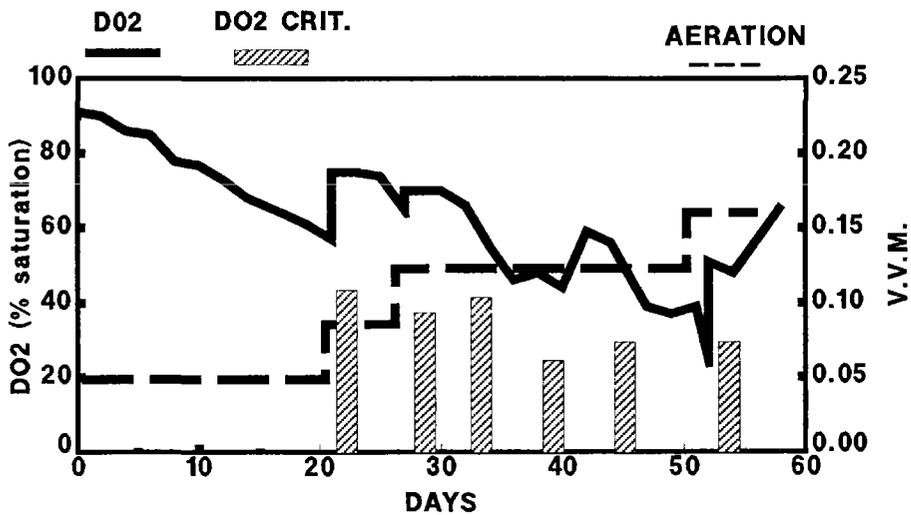
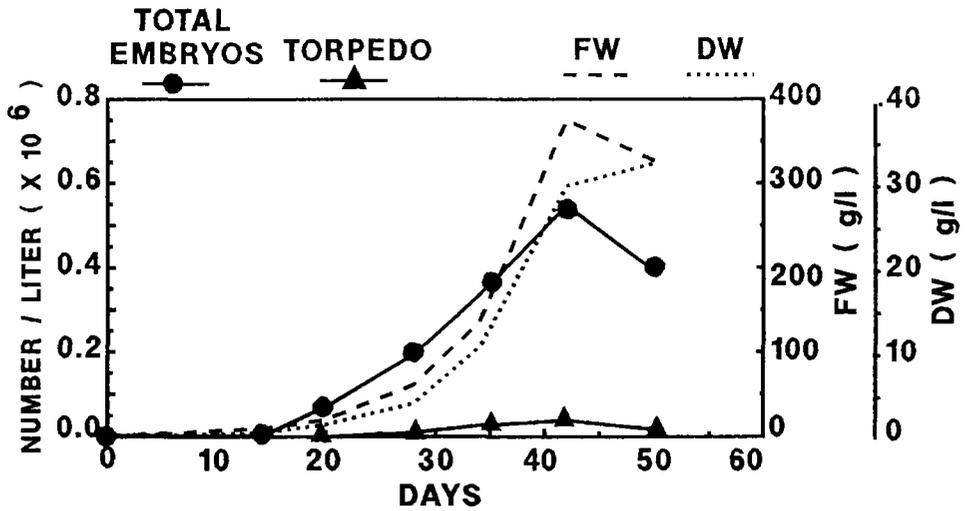


Fig. 3. Production of somatic embryos of *C.canephora* in a 3 L. bioreactor

A. Kinetics development of embryos and biomass



B. Changes in D02, D02 crit. and aeration

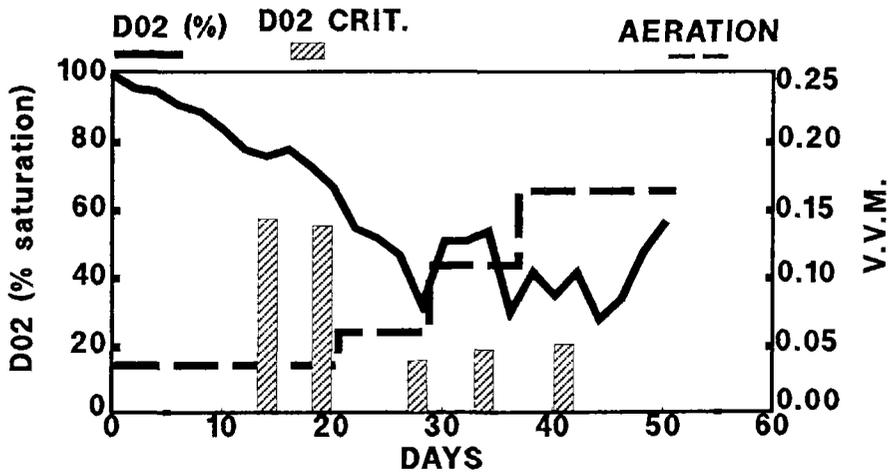


Fig. 4. Production of somatic embryos of *Arabusta* in a 3 L. bioreactor

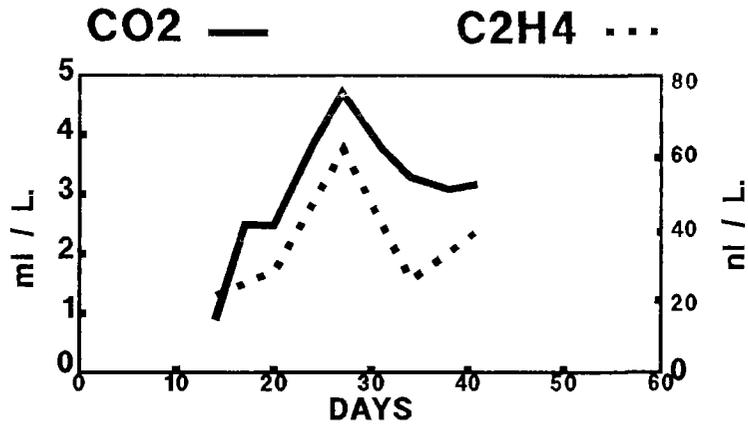


Fig. 5. Production of embryos of Arabusta: changes in CO₂ and C₂H₄ concentrations in the outlet gas stream

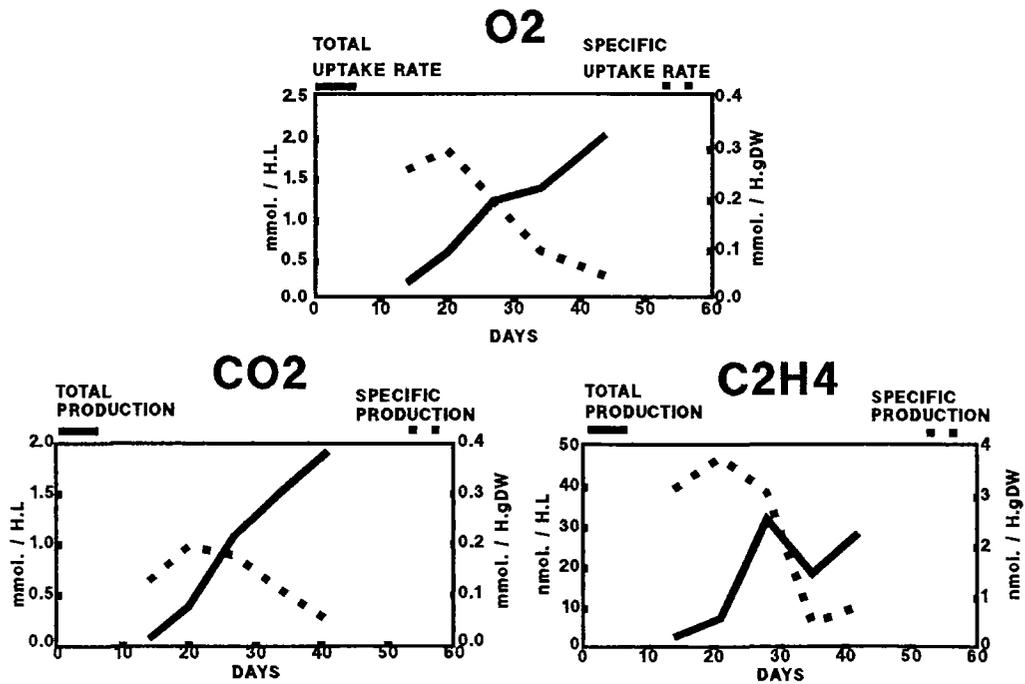


Fig. 6. Production of embryos of Arabusta: changes in oxygen uptake and production rate of CO₂ and C₂H₄

REFERENCES

Neuenschwander B. and Baumann T.W., 1992, Plant Cell Reports, 10(12):608-612.

Pareilleux A. and Vinas R., 1983, J.Ferment. Technol., 61:429-433.

Preil W. and Beck A., 1991, Acta Horticulturae, 289:179-192.

Sondahl M.R. and Noriega C., 1992. In 1992 World Congress on Cell and Tissue Culture (Arlington, 20-25 June): Journal of the Tissue Association Abstracts, p.1010.

Staritsky G. and Van Hasselt G.A.M., 1980. In 9ème colloque International sur le café (Londres , 16-20 Juin), ASIC, Paris, p. 597-602

Taticek R.A., Moo Young M. and Megge R.L., 1991, Plant Cell Tissue and Organ Culture, 24:139-158.

Tessereau H., 1993, Development of a simplified method for the cryopreservation of plant tissues and somatic embryos and study of the acquisition of freezing tolerance. PHD. Université Pierre et Marie Curie, Paris VI. 247 p.

Zamarripa A., Ducos J.P., Bollon H., Duffour M., and Petiard V., 1991a, Café Cacao Thé, 35(4):223-244

Zamarripa A., Ducos J.P., Tessereau H., Bollon H., Eskes A.B. and Petiard V., 1991b, In 14ème Colloque Scientifique International sur le café (San francisco, 14-19 Juillet) , ASIC, Paris, p. 392-402.

Zamarripa A., 1993. Study and development of somatic embryogenesis in liquid medium of coffee. PHD. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes. 191 p.

RESUME

Nous décrivons des cultures en bioréacteur d'embryons somatiques de deux génotypes de caféier : C.canephora et Arabusta . Les cultures sont réalisées à l'aide d'un cytotoculteur mécaniquement agité à l'aide d'un système "cell-lift " impeller et d'un volume utile de 3 litres (Setric SGI, modèle SET4CV). La stratégie choisie consiste à initier les cultures avec des conditions d'aération et d'agitation conduisant à un coefficient de transfert d'oxygène proche de celui mesuré en fiole d'Erlenmeyer dans les conditions optimales de culture ($Kla = 5 \text{ h}^{-1}$; 0,1 litre de milieu / fiole de 0,25 litre; 100 rpm). Puis les paramètres aération et agitation sont progressivement augmentés de façon à maintenir la concentration en oxygène dissous (DO₂) toujours supérieure à la concentration critique (DO₂ crit.) . Les concentrations maximales en embryons sont atteintes entre les 40 et 50èmes jours de cultures et sont comprises entre 200.000 et 500.000 ebr/l. Les rendements de conversion des embryons en plantules sont du même ordre que pour ceux obtenus en fiole : 47 % pour C.canephora et 35 % pour Arabusta . Les évolutions de divers paramètres de culture , tel que la consommation d'oxygène et les productions de dioxyde de carbone et d'éthylène, seront également décrites .

SUMMARY

This study describes kinetics development in bioreactor of somatics embryos of two genotypes of coffee: C.Canephora and Arabusta. A 3- liter stirred bioreactor containing an agitation system consisting of the "cell lift" impeller was used to scale-up the embryogenic phase. Culture are initiated with conditions of agitation and aeration allowing an oxygen transfer coefficient similar to the one in Erlenmeyer flask ($Kla = 5 \text{ h}^{-1}$, 0.1 liter of medium in a 0.25 liter flask, 100 rpm). Then the aeration and the agitation are increased in order to maintain the dissolved oxygen (DO₂) higher than the critical level of dissolved oxygen (DO₂ crit.) . By this way concentration of embryos ranged between 200.000 and 500.000 per liter are obtained after 40 to 50 days of culture. Embryo-to plant conversion rate for embryos from bioreactor are similar to the one for embryos from flaks : 47% for C.canephora and 35 % for Arabusta. Others parameters such oxygen uptake rate, CO₂ and C₂H₄ production will be described. These results show that the scaling-up of the embryogenic phase of the process of mass propagation of coffee by somatic embryogenesis in liquid medium can now be considered.

EFFETS DES MODIFICATIONS DE LA LUMIÈRE ET DE LA TENEUR EN CO₂ SUR LA CROISSANCE DE VITROPLANTS DE CAFÉIERS ARABICA

D. BIEYSSE *, L. CURNAC **

* CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier (France)

** CEN Cadarache, D.P.V.E., 13108 St-Paul-Lez-Durance (France)

1. INTRODUCTION

La propagation en masse de nombreuses espèces végétales tant ornementales que d'importance agronomique a pris un essor considérable depuis de nombreuses années, car la multiplication in vitro permet dans de nombreux cas une multiplication conforme et une production de plantes saines.

La situation de la multiplication in vitro du caféier n'échappe pas à cette logique, depuis l'obtention des premiers embryons somatiques obtenus avec *C. canephora* (STARITSKY, 1970) et les travaux de SONDAHL (1977) sur le microbouturage de différentes espèces de caféiers. En quelques années, les progrès sont réels et à l'heure actuelle, des unités de production semi-industrielle sont en place en Amérique Centrale ou en voie de réalisation en Ouganda (BERTHOULY, comm. pers.) et une production industrielle en milieu liquide d'embryons somatiques est envisagée avec des taux de multiplication considérables (ZAMARIPA, 1993).

Cependant, le recours à ces techniques est parfois freiné par les difficultés de multiplication, la maîtrise des techniques ou/et les coûts de production (BARBE, 1989).

L'essentiel des efforts de recherche a porté sur l'effet de la composition des milieux, l'apport en sels minéraux, en régulateurs de croissance, l'analyse des phénomènes cytologiques, afin d'améliorer la croissance des vitroplants. Cette voie a été largement explorée .

En revanche, l'intérêt porté aux conditions environnementales de la vitroculture et leur effet sur la physiologie du vitroplant a été abordé plus récemment. (KOZAI ; NAVARRO, 1990 ; CURNAC, 1992).

L'environnement gazeux paraît essentiel dans les conditions de vitro culture. Les sources de carbone disponibles pour le vitroplant proviennent du CO₂ contenu dans l'atmosphère du récipient et du saccharose du milieu. Dans ce système de mixotrophie, le carbone fixé provient en général essentiellement du saccharose (MOUSSEAU, 1986). Dans de nombreuses situations, la teneur en CO₂ atmosphérique diminue rapidement au cours du temps pour arriver à des

concentrations très faibles (KOZAI, 1991). Ce type de régime est atteint lorsque les plantes développent une aptitude photosynthétique suffisante (FUJIWARA, 1987 ; FOURNIOUX, 1987). Dans le cas contraire, on observe un deuxième type de comportement : une accumulation continue de CO₂.

De nombreux travaux (KOSAI, 1990, SOLAROVA, 1989) montrent que ces basses teneurs en CO₂ sont un facteur limitant les capacités photosynthétiques du vitroplant et il est établi que l'enrichissement en CO₂ favorise la photosynthèse. Par ailleurs, l'intensité lumineuse induit une stimulation de la photosynthèse quand la disponibilité en carbone est suffisante (DESJARDINS, 1990).

Ces études témoignent de l'intérêt d'une connaissance plus approfondie des facteurs environnementaux sur la croissance des vitroplants.

Aussi, l'objectif de ce travail est de décrire l'effet de deux paramètres environnementaux, la lumière et le CO₂, sur le développement des vitroplants de caféiers et de répondre aux questions suivantes :

- . Quelle est la variation de la teneur en CO₂ de l'atmosphère d'un flacon de culture en conditions standard ?
- . Comment les vitroplants réagissent-ils à différents niveaux d'éclairéments ?
- . Quel est l'effet d'un enrichissement en CO₂ ?
- . Peut-on favoriser la croissance in vitro des caféiers en faisant varier les paramètres bioclimatiques agissant sur la photosynthèse ?

La compréhension de ces effets pourrait apporter une meilleure réponse à certains accidents de culture, expliquer certains ralentissements ou blocages de croissance et ouvrir de nouvelles perspectives pour optimiser les rendements.

2. MATERIEL ET METHODE

Cinq microboutures de *Coffea arabica* var. *Caturra rojo* non racinées avec 3 à 4 paires de feuilles sont obtenues à partir de l'élongation de bourgeons axillaires et cultivées en phase de développement sur un milieu de culture de Murashige et Shoog, avec 40 g/l de saccharose, les vitamines de Morel, le Fer EDTA et 0,3 mg/l de BAP. Le milieu est solidifié avec 7 g/l de gélose et le pH ajusté à 5,6. En conditions standard, la photopériode est de 12H/12H avec un éclairément de 35 $\mu\text{mol}\cdot\text{photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ à une température constante de 25°C. Le volume du récipient était de 500 ml et contenait 125 ml de milieu.

Le flacon de culture est fermé par un bouchon de verre à col rodé équipé de raccords souples autoclavables comprenant des filtres Millipore 0,22 μm pour prévenir toute contamination bactérienne ou fongique. Les raccordements entre le circuit et l'appareillage sont réalisés au moyen de la visserie Swagelok, le tout conférant au montage une étanchéité de l'ordre de 1,5 % de renouvellement d'air par jour.

Le récipient de culture est balayé d'un courant d'air de 5 l/h pulsé par un compresseur. La mesure du CO₂ est réalisée par un analyseur de CO₂ à infra rouge (MAIHAK SA). L'acquisition des données est effectuée en continu, en temps réel.

Pour déterminer les modifications des échanges gazeux des vitroplants à l'augmentation de l'intensité de l'éclairément ou de la concentration en CO₂, le circuit a été couplé à un ordinateur qui régule la concentration du CO₂ du flacon par injection de volumes calibrés de CO₂ durant la phase diurne ou par piégeage du CO₂ respiratoire durant la phase nocturne et enregistre l'activité photosynthétique ou respiratoire (ANDRE, 1979).

L'expérimentation s'est déroulée en deux phases :

1) Contrôle de l'évolution de la teneur en CO₂ de l'atmosphère du flacon de culture sous deux éclairéments en conditions de CO₂ non régulé.

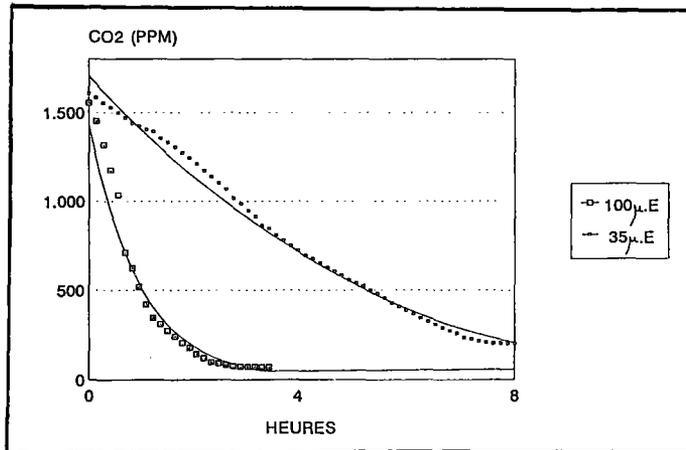
2) Effet de 4 concentrations en CO₂ régulé sous deux intensité d'éclairéments.

3. RESULTATS

3.1. Suivi de la teneur en CO₂ en flacon étanche. Réponse à la lumière.

Le CO₂ respiratoire dégagé durant la phase nocturne s'accumule pour atteindre des teneurs de 1.500 à 1.800 µl.l⁻¹. Après le début de l'éclairement à 35 µmol.photons.m⁻².s⁻¹, la décroissance du CO₂ est régulière pour atteindre une valeur de 120 µl.l⁻¹ proche du point de compensation vers la 8ème heure. (Fig. 1)

Fig. 1 : Evolution de la teneur en CO₂ dans des flacons de culture *in vitro* de *Coffea arabica* en conditions confinées sous deux éclairagements (35 et 100 *mol.photons m⁻².s⁻¹).



Sous un éclairage de 100 µmol.photons.m⁻² s⁻¹, la décroissance du CO₂ est très rapide. En quatre heures, les vitroplants sont au point de compensation à 60 µl.l⁻¹

La photosynthèse nette des vitroplants dans le bocal est calculée à partir de la dérivée de la concentration en CO₂ par rapport au temps

$$P_N = \frac{d[CO_2]}{dt} \times \text{Volume de circuit}$$

Si l'on établit la courbe de photosynthèse nette en fonction de la concentration en CO₂, selon le modèle simplifié proposé par FARQUHAR et al, 1980, (Fig. 2) la courbe de réponse de la photosynthèse nette à la concentration en CO₂, est typique des plantes en C₃.

Calcul simplifié de la P_N :

$$P_N = \frac{P_{max} ([CO_2] - \Gamma)}{K_m \text{ app.} + ([CO_2] - 2\Gamma)}$$

P_{max} : Photosynthèse nette lorsque le CO₂ est saturant, correspond à la vitesse maximum de photosynthèse sous un éclairage donné.

Γ : concentration en CO₂ au point de compensation

K_m app : concentration en CO₂ à $\frac{P_{max}}{2}$

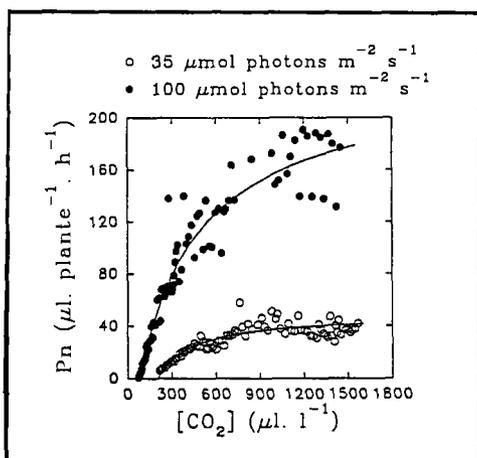


Fig. 2 : Vitesses d'échanges du CO₂ des vitroplants déduites des variations de la teneur en CO₂ dans un bocal fermé

Conclusion

Dans les conditions de culture, l'utilisation des capacités photosynthétiques des plantules est limitée par la teneur en CO₂ voisine du point de compensation durant une longue période (5 à 8 heures) pendant la phase éclairée de la culture.

La photosynthèse nette est pour une large part stimulée par l'augmentation de la teneur en CO₂ et/ou de l'éclairage. Les vitroplants de caféiers ont les mêmes caractéristiques que toutes les plantes en C₃.

3.2. Effets de la lumière et d'un enrichissement en CO₂ sur la photosynthèse

Nous avons mesuré les effets de l'éclairage et la régulation de la teneur en CO₂ sur les échanges gazeux moyens journaliers en bocal confiné. Avant l'application des traitements, les plants sont maintenus sans régulation de la concentration en CO₂ à un éclairage de 35 µmol.photons.m⁻².s⁻¹. La détermination de la photosynthèse nette moyenne dans le bocal sans régulation est calculée en divisant l'écart entre la concentration en CO₂ en début de journée et le point de compensation par la durée du jour.

3.2.1. Effets de l'éclairage

Dans cet essai, la teneur en CO₂ est régulée à 340 µl.l⁻¹ sous éclairage standard de culture fixé à 35 µmol.photons.m⁻².s⁻¹. Dans ces conditions, la photosynthèse nette atteint un niveau inférieur à la photosynthèse nette mesurée avant régulation (Fig. 3). Le passage à un éclairage de 100 µmol.photons.m⁻².s⁻¹ provoque une forte stimulation de la photosynthèse nette dans les 24 heures qui suivent l'effet pour revenir à la photosynthèse nette moyenne des vitroplants, mesurée dans le bocal sans régulation. Dans les deux conditions, le bilan journalier des échanges de CO₂ devient négatif, le rapport R/P est voisin de 1,2 à 35 µmol.photons.m⁻².s⁻¹ et de 1,5 à 100 µmol.photons.m⁻².s⁻¹.

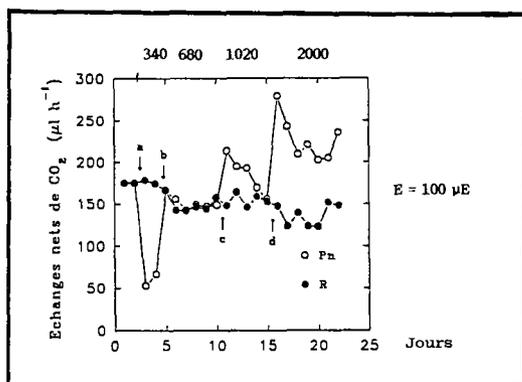


Fig. 3 : Effets de la régulation de la teneur en CO₂ à 340, 680, 1020, 2000 µl.l⁻¹

3.2.2. Effets d'un enrichissement en CO₂

L'éclairement est constant à $100 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ et la teneur en CO₂ est régulée à plusieurs concentrations : 340, 680, 1020, 2000 $\mu\text{l.l}^{-1}$

La photosynthèse nette des caféiers placés dans une atmosphère à 340 $\mu\text{l.l}^{-1}$ est inférieure à la photosynthèse nette avant régulation (Fig.4). Si la concentration est de 680 $\mu\text{l.l}^{-1}$ de CO₂, le niveau de photosynthèse nette devient égal à la photosynthèse nette moyenne des vitroplants dans le bocal sans régulation.

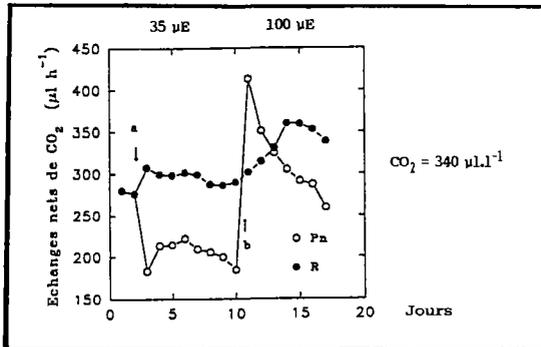


Fig. 4 : Effets de l'éclairement à 35 et 100 $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (concentration en CO₂ régulée à 340 $\mu\text{l.l}^{-1}$).

Une augmentation supplémentaire de la concentration en CO₂ à 1020 $\mu\text{l.l}^{-1}$ entraîne une nouvelle stimulation de la photosynthèse nette qui ne se maintient pas et chute dès le 2^{ème} jour pour finalement atteindre le niveau des échanges de CO₂ avant régulation.

Un nouvel enrichissement de la concentration en CO₂ à 2000 $\mu\text{l.l}^{-1}$ provoque une stimulation (P_N multipliée par $\approx 1,8$) transitoire mais le niveau d'équilibre atteint au bout de quatre jours est supérieur à celui obtenu dans le flacon non régulé.

Conclusion

L'augmentation du niveau de lumière sous CO₂ régulé à 340 $\mu\text{l.l}^{-1}$ stimule la photosynthèse nette uniquement de façon transitoire et après 24-48 h, le bilan journalier des échanges de CO₂ redevient négatif. L'augmentation de la teneur en CO₂ au delà de 680 $\mu\text{l.l}^{-1}$ (valeur seuil pour laquelle le bilan des échanges de CO₂ est nul) permet également une stimulation transitoire de la photosynthèse nette. C'est seulement à partir de 2000 $\mu\text{l.l}^{-1}$ que le bilan journalier devient positif et se maintient.

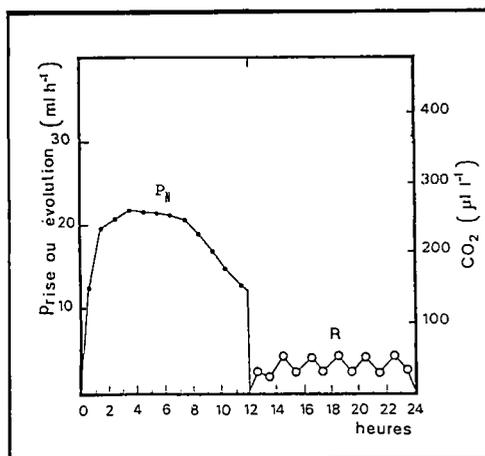
4. APPLICATIONS

Nous venons de montrer une amélioration du gain de carbone fixé chez des vitroplants de caféiers avec une concentration en CO₂ de 2000 $\mu\text{l.l}^{-1}$. En conditions de vitroculture, cette opération n'est pas toujours réalisable car elle demande un équipement adapté. Or, nous avons mis en évidence que dans les conditions de culture en bocal confiné durant la première partie de la phase diurne, la teneur en CO₂ était de l'ordre de 1.800 $\mu\text{l.l}^{-1}$, parfois supérieure.

Par ailleurs, l'étude de l'activité photosynthétique du caféier (BERRY et al, 1989) a décrit sur plante entière un cycle de prise de CO₂ caractérisé par une consommation forte durant 6 à 7 heures après illumination pour décroître progressivement et arriver à 50 % de la photosynthèse initiale à la fin de la période lumineuse (fig 5). Cela signifie que l'optimum photosynthétique est situé durant les 7 premières heures d'éclairement.

Pour bénéficier à la fois de la période brève en présence de fort CO₂ et de l'optimum d'activité photosynthétique observé en début de phase lumineuse, il nous est apparu intéressant de modifier les conditions de photopériode en limitant l'exposition à la lumière, et de déterminer l'incidence sur un cycle de culture.

Fig. 5 : Evolution des échanges gazeux pendant 24 heures d'un caféier arabica agé de deux ans (P_N : Photosynthèse nette, R : respiration)



4.1. Matériel et méthode

Un lot de vitroplants de deux variétés de caféiers, *Caturra rojo* et KF6.3 cultivé en conditions de multiplication avec 1 mg/l de BAP et en conditions d'endurcissement avec 0,3 mg/l de BAP sur milieu gélifié solide de Murashige et Skoog identique à celui décrit précédemment dans des flacons de culture en verre de 125 ml à bouchon vissant a été utilisé dans cette expérimentation. Pour chaque variété, une moitié du lot a été soumise à une photopériode témoin de 12 H/12 H, l'autre moitié à un cycle de 8H/8H. Pour chaque traitement, on dispose de 40 microboutures non racinées avec 3 à 4 paires de feuilles réparties dans 10 flacons. La culture a duré 5 mois et une mesure du poids de matière fraîche à la mise en culture et en fin d'expérimentation a été réalisée, donnant ainsi le gain de poids de matière fraîche.

4.2. Résultats

Les gains de matière fraîche de l'ensemble des traitements sont présentés sur la figure 6.

Pour les deux variétés et quelque soit le traitement en multiplication (BAP : 1mg/l) ou en allongement (BAP : 0,3 mg/l), le traitement photopériode fait ressortir une différence significative (Tableau 1). Le lot placé sous une photopériode de 8 H/8 H favorise une augmentation de masse de l'ordre de 10 %. Les observations visuelles ont tendance à montrer un raccourcissement des entrenoeuds avec la photopériode 8 H/ 8 H en endurcissement tout particulièrement avec le clone KF6.3 qui possède des entre noeuds longs.

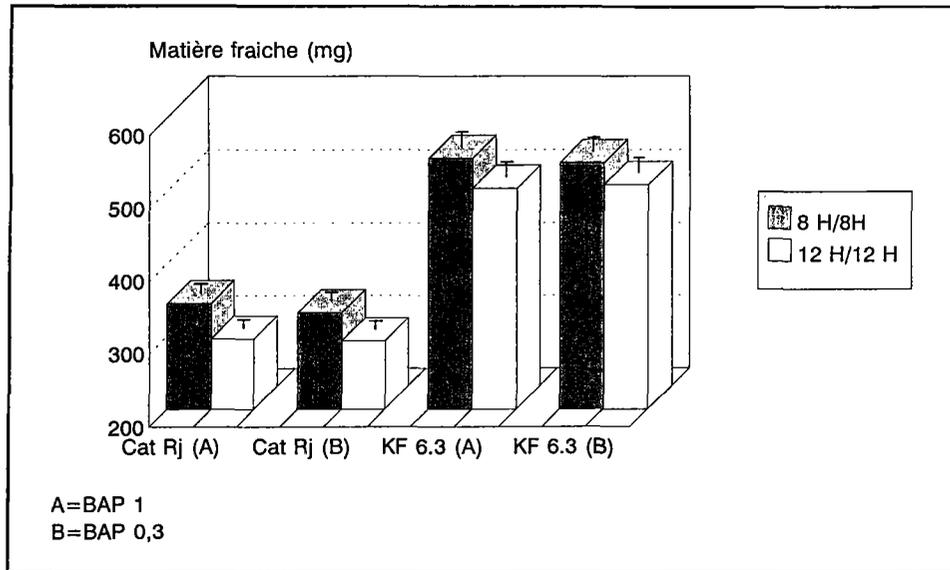
Tableau n°1 : Gain de matière fraîche (en mg) par vitroplant obtenu après 20 semaines de culture

PHOTOPERIODE	Caturra		KF 6.3	
	BAP 0,3	BAP 1	BAP 0,3	BAP 1
8 H/8 H	345 a	332 a	544 a	538 a
12 H/12 H	296 b	293 b	503 b	508 b

4.3. Conclusions

La photopériode 8 H/ 8 H a une incidence favorable sur l'augmentation de la biomasse en stimulant vraisemblablement l'utilisation du carbone car les vitroplants sont placés dans des conditions de forte teneur en CO₂ et en période optimale de photosynthèse.

Fig. 6 : Effet de la photopériode sur le gain de matière fraîche des vitroplants de caféiers Caturra et KF 6.3



5. CONCLUSIONS - DISCUSSION

Le suivi en continu de la teneur en CO_2 des flacons de culture permet d'observer les variations très importantes de sa teneur au cours de 24 H de culture, et d'appréhender la physiologie du vitroplant de caféier dans ces conditions de mixotrophie.

L'accumulation de CO_2 durant la phase nocturne puis sa consommation rapide dans les premières heures d'éclairage pour atteindre une teneur proche du point de compensation, montre clairement que les plantules développent leur système photosynthétique mais son utilisation est limitée par les faibles teneurs en CO_2 . La photosynthèse nette réagit aux variations de CO_2 et de lumière, ceci indique que les vitroplants de caféiers possèdent à ce point de vue des potentialités identiques aux plantes entières.

Le suivi des échanges de CO_2 lors de l'enrichissement de l'atmosphère des cultures avec du CO_2 ou lors de l'augmentation des niveaux de lumière a montré que le taux de photosynthèse d'un vitroplant peut être stimulée. Cependant, nous n'avons observé chez le caféier de stimulation durable que dans des conditions de fortes concentrations en CO_2 .

Toutefois, il semblerait qu'un facteur limitant bloque le niveau moyen de fixation diurne de CO_2 à un seuil peu différent de celui atteint en régime confiné dans le bocal. Le fait que les caféiers soient non enracinés laisse supposer qu'il s'agit là d'une limitation de la disponibilité en nutriments.

Les éléments dont nous disposons ne permettent pas de déterminer quelle est la part de carbone fixé par le vitroplant due aux sucres du milieu ou à l'enrichissement en CO_2 .

L'application de ces résultats expérimentaux aux conditions de culture standard montre qu'il est possible d'accroître significativement la productivité des vitroplants en modifiant seulement la photopériode.

Eu égard aux stimulations observées, les potentialités d'utilisation des capacités photosynthétiques du caféier paraissent très grandes et les gains de croissance à attendre sont encore largement améliorables.

BIBLIOGRAPHIE

- ANDRE A., DAGUENET A., MASSIMINO D., VIVOLI J., RICHAUD C. : Le laboratoire "C23A". Un outil au service de la physiologie de la plante entière I. Les chambres de culture et les systèmes de mesures associés. Annales agronomiques, 30. (2) : 135-151, 1979.
- BARBE JP., MAZIERE Y. : Micropropagation industrielle de plantes horticoles - Colloque INRA Cinquantenaire de la culture in vitro - Versailles - France 1989.
- BERRY D., BIEYSSE D., ANDRE M., MULLER R. : Photosynthèse et photorespiration du caféier (*Coffea arabica*) : effets d'une attaque de rouille 12ème conférence de l'ASIC, Montreux, 1987.
- COURNAC L., DIMON B., CARRIER P., LOHOU A., CHAGVARDIEFF P. : Growth and photosynthetic characteristics of *Solanum tuberosum* plantlets cultivated in vitro in different conditions of aeration, sucrose supply and CO₂ enrichment Plant Physiol 97, 112-117, 1991.
- DESJARDINS Y., GOSSELIN A., LAMARRE M. : Growth of transplants and in vitro cultured clones of *Asparagus* in response to CO₂ enrichment and supplemental lighting. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115 (3) : 364-368, 1990.
- FARQUHAR GD., VON CAEMMERER S., BERRY J.A. : A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. Planta 149:78-80, 1980.
- FOURNIOUX JC., BESSIS R. : Influence de la teneur en CO₂ sur la morphogénèse de la vigne en culture in vitro. Can. J. Bot. 64. 2608-2616, 1985.
- FUJIWARA K., KOZAI T., WATANABE I. : Fundamental studies on environments in Plant tissue Culture Vessels. J. Agr. Met 43(1):21-30, 1987.
- KOZAI T., IWANAMI Y. : Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under High Photon fluxes on plantlet growth of carnation (*Dianthus caryophyllus*) in tissue culture during the preparation stage J. Japan Soc. Hort. 57(2) : 279-288, 1988.
- KOZAI T., OKI H., FUJIWARA K. : Photosynthetic characteristics of *Cymbidium* plantlets in vitro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 22:205-211, 1990.
- KOZAI T. : Photoautotrophic micropropagation - In vitro cell - Div. Biol. 27:47-51, 1991.
- KOZAI T., IWABUCHI K., WATANABE K., WATANABE I. : Photoautotrophic and photomixotrophic growth of strawberry plantlets in vitro and changes in nutrient composition of the medium. Plant cell, Tissue and Organ Culture 25:107-115, 1991.
- MOUSSEAU M. : CO₂ enrichment in vitro. Effect on autotrophic and hétérotrophic cultures of *Nicotiana tabacum* (var. Sam sun) Photosynth. Res. 8:187-191, 1986.
- NAVARRO L. : Effet de l'intensité lumineuse, de l'aération et de l'enrichissement en CO₂ au cours de la micropropagation du bananier (*Musa acuminata* cv Petite naine) sur le développement des plants in vitro et en phase d'acclimatation in vivo . Thèse 3ème cycle USTL - Montpellier, 1990.
- SOLAROVA J., POSPISILOVA J., CATSKY J., SANTRUCEK J. : Photosynthesis and growth of tobacco plantlets in dependence on carbon supply. Photosynthetica 23(4):629-637, 1989.
- SONDAHL MR., SHARP WR. : High frequency induction of somatic embryos cultured leaf explants of *Coffea arabica* Z. Pflanzenphysiol. 81(5):395-408, 1977.
- STARITSKY G. : Embryoid formation in callus tissues of coffee. Acta Botanica Neerlandica. 19 (4) : 509-514, 1970.

RESUME

EFFETS DES MODIFICATIONS DE LA LUMIERE ET DE LA TENEUR EN CO₂ SUR LA CROISSANCE DE VITROPLANTS DE CAFEIERS ARABICA

Des microboutures de caféiers arabica var. Caturra rojo sont cultivées sur milieu de développement Murashige et Skoog, 40 g/l de saccharose, BAP 0,3 mg/l dans des flacons en verre. L'évolution de la teneur en CO₂ de l'atmosphère des flacons de culture étanche est mesurée en continu dans les conditions standard d'élevage à 25°C avec une photopériode de 12h/12h et un éclairage de 35 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Le passage à une teneur en CO₂ constante à 340 ppm sous 35 μE provoque une diminution de la photosynthèse nette (P_N) et la respiration augmente légèrement. Le bilan photosynthétique devient négatif. L'augmentation du niveau de lumière à 100 μE stimule momentanément la photosynthèse et plus durablement la respiration. Le bilan photosynthétique reste négatif.

L'augmentation de la concentration en CO₂ à 680 puis à 2000 ppm provoque une stimulation de P_N et la respiration diminue légèrement. Le bilan journalier des échanges photosynthétiques et respiratoires est nul à 680 ppm et devient positif à 2000 ppm de CO₂.

Les implications de ces résultats sur l'influence de ces facteurs environnementaux sur le développement des vitroplants est discutée.

CONSERVATION À LONG TERME DES RESSOURCES GÉNÉTIQUES DE CAFÉIER PAR CRYOCONSERVATION D'EMBRYONS ZYGOTIQUES ET SOMATIQUES ET DE CULTURES EMBRYOGÈNES

B. FLORIN, H. TESSERAU, V. PÉTIARD

FRANCERECO, 101, Avenue Gustave Eiffel, 37390 Notre-Dame-D'Oé, France

INTRODUCTION

Les caféiers sauvages sont une composante de la flore forestière africaine, aujourd'hui menacée de disparition en raison de la déforestation active de ces régions (Le Pierres *et al* , 1989). Ils regroupent un vaste ensemble de plus de 80 espèces (Anthony, 1992). Parmi les espèces cultivées, deux d'entre elles *Coffea arabica* et *Coffea canephora* couvrent la quasi totalité de la production mondiale de café.

Le caféier est classé comme espèce récalcitrante. Ces semences sont sensibles à la dessiccation et aux températures inférieures à +10°C. A température ambiante, elles ne peuvent être conservées qu'entre deux à six mois et sont donc inutilisables pour la conservation de germplasm. Selon des travaux récents (Ellis *et al*, 1990) le comportement des semences de caféier serait intermédiaire, proche des espèces à semences orthodoxes pour leur tolérance à des teneurs en eau relativement faibles, mais restant récalcitrantes par leur sensibilité au froid. Toutefois, aucune des méthodes de stockage expérimentées ne permet une conservation à long terme du germplasm. Par ailleurs, pour les espèces cultivées, *C. arabica* est autogame ce qui assure une homogénéité de la descendance contrairement à *C. canephora*, espèce allogame qui peut être maintenue par exemple, par multiplication clonale. Toutefois, le bouturage engendre aussi des contraintes de conservation et de superficie.

La conservation des ressources génétiques des caféiers se fait sous forme de collection au champ bien que cette pratique soit couteuse et expose le matériel végétal aux risques climatiques, phytosanitaires et parfois politiques. Des efforts importants ont été consacrés à la prospection et à la mise en collection au champ et en vitrothèque (Bertrand-Desbrunais et Charrier, 1989).

La multiplication *in vitro* des espèces cultivées de caféier par microbouturage ou par embryogenèse somatique offre une alternative aux voies traditionnelles de propagation de génotypes "élites". La production en masse d'embryons somatiques de caféier a été récemment décrite (Zamarripa *et al* 1991). L'embryogenèse somatique se prête aussi à la conservation de germplasm en offrant la possibilité de créer à la fois une banque de base sous forme de cultures embryogènes conservées dans l'azote liquide et une banque active d'embryons somatiques déshydratés et/ou congelés, facilitant la diffusion du germplasm. La conservation des cultures embryogènes s'avère indispensable en raison de la

diminution progressive et/ou la perte des capacités embryogènes au cours des repiquages successifs, déjà décrite dans le cas du caféier (Pétiard *et al.*, 1993). Ainsi, les cultures embryogènes cryoconservées pourraient constituer un inoculum de base, stable et reproductible pour le renouvellement des productions d'embryons en limitant les risques de non-conformité après expression de l'embryogenèse.

La cryoconservation (ou stockage dans l'azote liquide) constitue jusqu'à présent l'unique moyen de préserver la stabilité génétique du matériel végétal pour des durées théoriquement illimitées. Le fait qu'aujourd'hui un bon nombre d'espèces ont pu être cryoconservées sous différentes formes de types cellulaires accroît l'intérêt pour ces méthodes et leurs avantages tels que la sécurité génétique et sanitaire, le gain en coût et en temps par rapport au repiquage régulier, ou encore la simplification des échanges internationaux de germplasm.

Toutefois, deux contraintes subsistent; d'une part aucun protocole de congélation à portée générale n'existe et d'autre part, les méthodes de congélation sont parfois compliquées et ne peuvent être mise en oeuvre en routine. Alors, différentes stratégies pour la conservation à long terme des ressources génétiques de caféier ont été envisagées. Elles comprennent:

- La cryoconservation d'embryons zygotiques,
- La congélation d'embryons somatiques et de cultures embryogènes,
- La dessiccation d'embryons somatiques.

I - MATERIEL VEGETAL

Origine et préparation des semences et des embryons zygotiques

Les essais de congélation ont été réalisés à partir de semences mures de *Coffea arabica* récoltées en Equateur et fournies par Latinereco (Nestlé). La capacité germinative des lots de semences est contrôlée à la réception des lots et à chaque expérimentation. Les semences sont déparchées puis stérilisées par trempage 10 min dans un bain d'alcool à 70° puis 30 min dans une solution aqueuse d'hypochlorite de Sodium à 40g/l. Elles sont ensuite rincées trois fois à l'eau stérile puis sont incubées pendant 14 à 20 h dans de l'eau stérile et sous faible agitation. Les embryons zygotiques sont dégagés des semences par incisions de l'albumen corné puis déposés dans une boîte stérile.

Enfin, les embryons zygotiques mures sont mis à développer sur un milieu de Gamborg (1968) dépourvu d'hormones de croissance (Bertrand-Desbrunais et Charrier, 1989).

Les souches embryogènes et les embryons somatiques

Des souches embryogènes de différentes espèces de caféier (*Coffea canephora*, *Coffea arabica*, l'hybride arabusta) initiées et maintenues en milieu liquide selon une procédure déjà décrite (Zamarripa *et al.*, 1991) ont été utilisées. Les embryons somatiques sont obtenus par la méthode décrite par ces auteurs.

Pour les traitements, des embryons de stade torpille mesurant de 1,5 à 3 mm sont sélectionnés dans les cultures.

II - LES METHODES DE CONGELATION

Trois types de méthodes sont développées pour la cryoconservation de tissus et d'embryons de caféier:

- La méthode dite "conventionnelle", référencée MC comprend un traitement par des cryoprotecteurs et une congélation dans une solution cryoprotectrice afin de réduire l'eau intracellulaire et d'augmenter la concentration de soluté. La congélation est réalisée dans un congélateur programmé à la vitesse de 0,5°C/min jusqu'à -40°C avant le transfert dans l'azote liquide.

- La méthode simplifiée référencée MS est basée sur une induction de la tolérance à la congélation lors d'une phase de prétraitement sans autre addition de cryoprotecteur exogène (Tessereau, 1993a). Les échantillons sont prérefroidis pendant 20 h dans un congélateur à -20°C avant leur transfert dans l'azote liquide.

- La méthode de "dessiccation-congélation" comprend une déshydratation partielle des tissus sous humidité relative contrôlée avant leur transfert dans l'azote liquide.

Par ailleurs, le développement de procédure de dessiccation sous basse humidité relative ouvre l'opportunité de congeler les tissus sans autre traitement mimant le comportement des semences orthodoxes. Des essais de dessiccation d'embryons somatiques de caféier ont été entrepris.

III - CRYOCONSERVATION D'EMBRYONS ZYGOTIQUES

A notre connaissance, la survie de semences de caféier à des températures basses négatives a été rapportée une seule fois (Becwar *et al*, 1983). Des expériences préliminaires de congélation de semences mûres dans l'azote liquide sans ou avec séchage préalable ont conduit à des résultats négatifs. Les semences perdent leur faculté germinative au-dessous d'un seuil de teneur en eau d'environ 12g d'eau/100g de matière sèche, atteint d'autant plus rapidement que la température de stockage est élevée (résultat non illustré). Toutefois, après refroidissement à -20°C , des taux de germination d'environ 15 à 30% sont parfois obtenus avec des lots de semences témoin ayant une humidité relative de l'ordre de 85% ou partiellement séchés à 75% d'humidité relative (HR).

Pour le palmier à huile, Grout *et al* (1983) ont montré que l'embryon extrait de la semence pouvait tolérer la congélation contrairement au comportement de récalcitrance de la semence entière. La même étude a été menée pour le caféier. Des embryons zygotiques isolés de semences mûres de caféier ont été cryoconservés dans l'azote liquide selon une procédure décrite ci-dessous (Fig. 1).

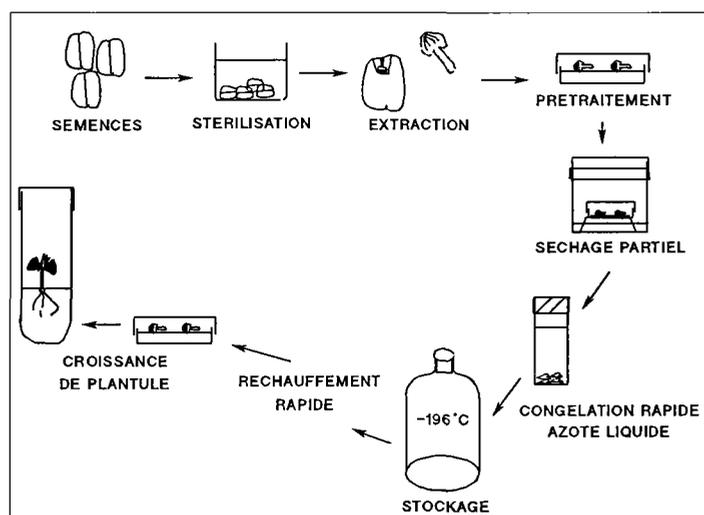


Fig. 1. Protocole pour la cryoconservation d'embryons zygotiques de *Coffea arabica*.

À la suite des étapes de stérilisation et d'isolement, les embryons zygotiques sont placés sur un papier filtre déposé soit directement dans une boîte de Pétri stérile, ou sur un milieu supplémenté en saccharose. Après une incubation de 7 jours à l'obscurité, les embryons sont partiellement déshydratés par transfert dans une enceinte dont l'humidité relative est contrôlée à 43% par une solution sursaturée de sel de carbonate de potassium (K_2CO_3) et à 18°C . Cinq jours plus tard, les embryons sont transférés dans des cryotubes et congelés directement dans l'azote liquide.

La période de stérilisation et d'imbibition indispensable pour l'extraction des embryons, entraîne inévitablement des modifications de la teneur en eau à la fois des semences et des embryons (Tableau 1). Ces modifications ne sont pas préjudiciables pour la résistance des embryons à la congélation.

Le seuil de tolérance d'embryons zygotiques à une déshydratation a été estimé. La figure 2 montre qu'au-dessous d'un seuil de 7g d'eau/100g de MS atteint par une exposition de 5 jours sous 43% d'HR à 18°C , les embryons ne survivent plus.

Après une phase de prétraitement soit sans milieu dans une boîte de Pétri, soit en présence de saccharose, les embryons déshydratés 5 jours sous 43% d'HR à 18°C survivent à une congélation directe à -196°C . Les meilleurs taux de survie obtenus sont d'environ 78% après une phase de culture sur un milieu supplémenté de 0,6M de saccharose (Tableau 2). Sans incubation sur milieu avec saccharose, les embryons survivent également à la congélation avec des taux légèrement plus faibles. La reprise de croissance des embryons est observée quelques jours après décongélation. Le développement des embryons est comparable à celui d'embryons zygotiques témoins et conduit à des plantules similaires.

Les embryons zygotiques isolés de semences matures sont donc capables de tolérer la congélation dans l'azote liquide suite à une déshydratation partielle. Cette propriété a également été montrée récemment par Abdelnour-Esquivel *et al* (1992) pour des embryons isolés de fruits immatures et de fruits rouges. Cette technique constitue donc un outil pour la conservation à long terme du germplasm de caféier. L'aseptie complète des lots d'embryons zygotiques isolés reste néanmoins difficile à atteindre et en ce sens, la phase de prétraitement sur milieu contenant du saccharose permet de l'évaluer avant stockage à -196°C .

Tableau I. Evolution de la teneur en eau des semences et des embryons zygotiques au cours des phases d'imbibition et de stérilisation.

Temps	Teneur en eau ($\text{gH}_2\text{O}/100\text{g MS}$)	
	Semences matures	Embryons zygotiques
T_0	15	ND
1 h	31	ND
Fin de stérilisation		
14 h	107	117
24 h	132	129

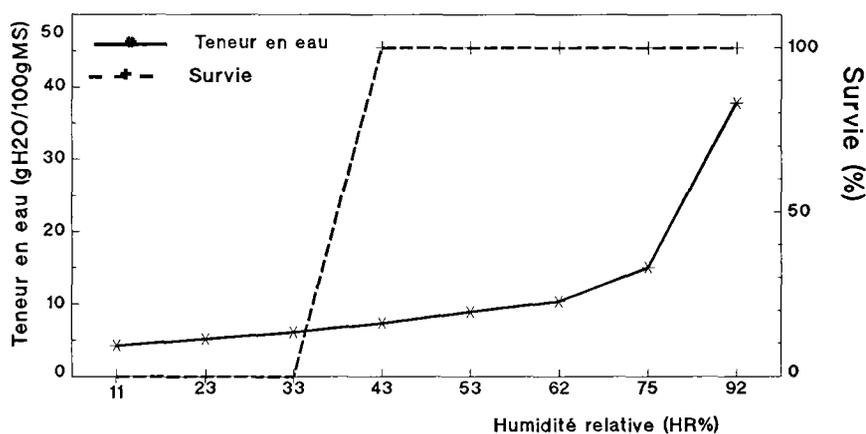


Fig. 2. Survie d'embryons zygotiques de caféier sous différentes humidités relatives à 18°C
* La survie est estimée après une période de séchage de 5 jours.

Tableau II. Survie d'embryons zygotiques matures de caféier après congélation à -196°C

Saccharose (Moles)	% Survie	% Développement
Témoin non congelé	100	86
sans milieu	100	54
0,6	100	78

III - CRYOCONSERVATION DES SOUCHES EMBRYOGENES

La tolérance à la congélation simplifiée de suspensions cellulaires embryogènes de caféier est induite par un prétraitement en présence de 1M de saccharose (Tessereau, 1993b). Les taux de viabilité après congélation estimés par le test de réduction du chlorure de tétrazolium (TTC) sont peu élevés (Tableau 3). L'utilisation d'une méthode de congélation programmée et d'un mélange de cryoprotecteurs contenant du saccharose du DMSO et du glycérol est possible mais ne conduit pas à de meilleurs résultats (Tableau 3).

Des cultures embryogènes de plusieurs espèces de caféier ont été cryoconservées dans l'azote liquide. Après des durées de conservation variables, la viabilité et les caractéristiques embryogènes de ces cultures ont été retrouvées (Tableau 4).

Tableau 3. Viabilité (% du témoin) et croissance d'une souche embryogène de *Coffea canephora* en fonction de la cryoprotection et de la méthode de congélation.

Méthode de congélation	Cryoprotecteurs	Cryoprotégées		Congelées	
		Viabilité	Croissance	Viabilité	Croissance
Simplifiée ^{a/} (MS)	1,0 M Saccharose	75	++	26	++
	{ 1,0 M Saccharose + 0,5 M DMSO + 0,5 M Glycerol	60	++	0	-
Conventionnelle ^{b/} (MC)	1,0 M Saccharose	75	++	22	++
	{ 1,0 M Saccharose + 0,5 M DMSO + 0,5 M Glycerol	60	++	26	++

a/ Précongélation dans un congélateur à -20°C puis immersion dans N2L

b/ Refroidissement programmé de 0,5°C/min jusqu'à -40°C puis immersion dans N2L

Tableau 4. Stockage prolongé dans l'azote liquide de différentes espèces de caféier

Espèces	Durée de stockage (Mois)	Potentiel embryogène	
		Témoin	Cryoconservées
<i>C. canephora</i>	24	+++	+++
<i>C. arabica</i>			
cvs. catuai	24	+	+
cvs. caturra	36	++	++
Hybride Arabusta	9	+	+

IV - CRYOCONSERVATION D'EMBRYONS SOMATIQUES

Un prétraitement unique avec du saccharose induit un niveau adéquat de protection des embryons somatiques de caféier congelés selon la méthode simplifiée. Les conditions optimales pour la congélation sont décrites dans le tableau 5. Après congélation simplifiée, des taux de survie de 90 à 100% sont obtenus de façon reproductible. La reprise de croissance se fait essentiellement via une production d'embryons secondaires à partir des tissus de l'embryon congelé après une phase de latence d'environ 3 à 5 semaines. Les embryons secondaires se développent en plantules comparables à celles obtenues d'embryons non congelés avec un rendement de conversion similaire (Tableau 6).

Comme pour les cellules embryogènes, dans nos conditions expérimentales, l'utilisation d'un mélange cryoprotecteur plus complexe contenant du DMSO et d'un refroidissement programmé conduisent à des résultats similaires pour les formes de survie mais à des taux inférieurs (Tessereau, 1993a) à ceux obtenus avec la congélation simplifiée. En fait, la cryoconservation d'embryons somatiques de caféier par les voies, conventionnelle (Bertrand-Desbrunais *et al*, 1988) ou simplifiée conduisent à des résultats similaires, en l'occurrence une survie par embryogenèse secondaire. La voie simplifiée, très reproductible, basée sur un prétraitement inducteur est plus simple à mettre en oeuvre dans le cas d'une conservation de germplasm et de sa distribution.

Le tableau 6 montre que des réponses de survie sont aussi obtenues avec la méthode de congélation établie pour les embryons zygotiques (utilisant une déshydratation partielle des embryons) mais avec une faible fréquence et une expression de l'embryogenèse secondaire beaucoup plus limitée.

Toutefois, en vu d'un stockage et d'une diffusion de plants sélectionnés auprès de l'utilisateur, le redémarrage direct de l'embryon stoppé dans son développement par la congélation, serait souhaitable.

Tableau 5. Principales étapes de la congélation simplifiée d'embryons somatiques de caféier dans l'azote liquide

ETAPES	CONDITIONS
Stade de développement	Torpilles de 1 à 5 mm
Prétraitement	
- Phase 1	Saccharose (0,5 - 0,75 M) 7 Jours, Milieu semi-solide
- Phase 2	Saccharose (0,85 M) 4 Jours, Milieu liquide
Précongélation	20 h dans congélateur -20°C
Stockage	Azote liquide
Réchauffement	2-3 min bain-marie à +40°C
Post-traitement	Dilution graduelle du contenu en sucre
Croissance	Conditions standard

Tableau 6. Survie d'embryons somatiques de caféier après cryoconservation en fonction de la méthode de congélation

	Méthode simplifiée ^{a)} (MS)		Méthode de ^{b)} "dessiccation-congélation"
	Survie (%)	Conversion (%)	Survie (%)
Témoin	95	71	95
Prétraités	92	50	95
Déshydratés	-	-	6
Congelés	88	67 *	35

* Taux de conversion des embryons secondaires

a) Précongélation dans un congélateur à -20°C puis immersion dans N2L

b) Déshydratation partielle sous 43% de HR puis immersion dans N2L

V - DESSICCATION ET CONGELATION D' EMBRYONS SOMATIQUES

Récemment, Mycock *et al* (1993) ont obtenu la reprise de croissance directe d'embryons somatiques de caféier congelés suite à une incubation dans du DMSO et du glycérol suivie d'un séchage partiel. Une autre approche a été développée, basée sur une amélioration de la tolérance à la dessiccation des embryons somatiques de caféier. Elle est plus adaptée à la diffusion commerciale notamment car elle évitent l'ajout de cryoprotecteurs toxiques. Le tableau 6 montre clairement que les embryons somatiques ne tolèrent pas la dessiccation (6% de survie par embryogenèse secondaire) contrairement aux embryons zygotiques matures.

Une étude préliminaire montre qu'en manipulant les conditions de cultures, en particulier le milieu de maturation des embryons par apport de sucres, d'ABA, et/ou de glutamine, il était possible de maintenir la viabilité et l'aptitude au développement d'embryons déshydratés pendant 7 jours sous 75 % de HR à 24°C (perte de 93% de la quantité d'eau initiale). De plus, environ 50% de ces embryons ainsi déshydratés survivent à un passage dans l'azote liquide soit par callogenèse ou par croissance d'une partie bien préservée de l'embryon.

VI - CONCLUSION

La conservation à long terme du germplasm de caféier sous forme de banques d'embryons zygotiques et de cultures embryogènes congelés dans l'azote liquide s'avère possible. Les procédures de congélation sont simples et par conséquent facilement applicables. Elles sont basées essentiellement sur l'emploi de saccharose - composé naturellement présent dans les tissus et non toxique.

Des études de conformités des plantes obtenues après traitement de cryoconservation sont maintenant envisagées. Une banque de souches embryogènes congelées est en cours d'établissement. En effet, la préservation de ces souches à l'état jeune, s'avère indispensable pour le maintien des capacités de production d'embryons tant pour une diffusion de génotypes sélectionnés que pour des recherches expérimentales ou encore lors de l'évaluation de la conformité de plants sélectionnés avant leur diffusion.

L'utilisation d'embryons somatiques déshydratés apparaît aujourd'hui comme un mode pratique de conservation de germplasm et de diffusion de plantes sélectionnées. Les résultats préliminaires obtenus pour le caféier sont prometteurs. Enfin, un effort important dans la recherche des meilleures conditions de maturation des embryons somatiques de caféier devrait conduire à la production d'embryons tolérants à la dessiccation et par voie de fait, à la congélation, mimant le comportement des embryons zygotiques matures.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABDELNOUR-ESQUIVEL A., VILLALOBOS V., ENGELMANN F., 1992. Cryopreservation of zygotic embryos of *Coffea* spp. *Cryo-Lett.*, 13: 297-302.
- ANTHONY, 1992. Les ressources génétiques des caféiers. ORSTOM Ed., 301p.
- BECWAR M.R., STANWOOD P.C., LEONHARDT K.W., 1983. Dehydration effects on freezing characteristics and survival in liquid nitrogen of desiccation-tolerant and desiccation-sensitive seeds. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 108: 613-618.
- BERTRAND-DESBRUNAIS A., FABRE J., ENGELMANN F., DEREUDDRE J., CHARRIER A., 1988. - Reprise de l'embryogenèse adventive à partir d'embryons somatiques de caféier (*Coffea arabica* L.) après leur congélation dans l'azote liquide. *C.R. Acad. Sci. Paris, Série III*, 307, 795-801.
- BERTRAND-DESBRUNAIS A., CHARRIER A., 1989. Conservation des ressources génétiques caféières en vitrothèque. ASIC, 13^e Colloque, Paipa, 438-447.
- ELLIS R.H., HONG T.D., ROBERTS E.H., 1990. An intermediate category of seed storage behaviour? *J. Exp. Bot.* 41: 1167-1174.
- GROUTH B.W.W., SHELTON K., PRITCHARD H.W., 1983. Orthodox behaviour of oil palm seed and cryopreservation of the excised embryos for genetic conservation. *Ann. Bot.*, 52 : 381 - 385.
- LE PIERRES D., CHARMETANT P., YAPO A., LEROY T., COUTURON E., BONTEMS S., TEHE H., 1989. Les caféiers sauvages de côte d'ivoire et de guinée: bilan des missions de prospection effectuées de 1984 à 1987. ASIC, 13^e Colloque, Paipa, 420-428.
- MYCOCK D.J., BERJAK P., 1993. Cryostorage of somatic embryos of coffee. In Fourth international workshop on seeds, Basis and applied aspects of seed biology, Angers 1992, D. Côme and F. Corbineau Eds., ASFIS, Paris, 879-884.
- PETIARD V., DUCOS J.P., FLORIN B., LECOUTEUX C., TESSERAU H., ZAMARRIPA A., 1993. - Mass somatic embryogenesis: a possible tool for large-scale propagation of selected plants. In Fourth international workshop on seeds, Basis and applied aspects of seed biology, Angers 1992, D. Côme and F. Corbineau Eds., ASFIS, Paris, 178-191.
- TESSERAU H., 1993a. Development of a simplified method for the cryopreservation of plant tissues and somatic embryos and study of the acquisition of freezing tolerance. PHD Thesis, Univ. Paris VI, 247pp.
- TESSERAU H., FLORIN B., LECOUTEUX C. and PETIARD V., 1993b. Cryopreservation of coffee embryogenic cell suspensions and subsequent plant regeneration (submitted)
- ZAMARRIPA A., DUCOS J.P., BOLLON H., DUFOUR M., and PETIARD V., 1991. Production of somatic embryos of coffee in liquid medium: effects of inoculation and renewal of the medium. *Café, Cacao, Thé*, 35 : 233-244.

RESUME

CONSERVATION A LONG TERME DES RESSOURCES GENETIQUES DE CAFEIER PAR CRYOCONSERVATION D'EMBRYONS ZYGOTIQUES ET SOMATIQUES ET DE CULTURES EMBRYOGENES.

Bruno FLORIN, Hervé TESSERAU et Vincent PETIARD

La sauvegarde des ressources génétiques de caféier est réalisée au champs en raison de la courte durée de vie des graines et leur sensibilité aux méthodes conventionnelles de stockage. La cryoconservation dans l'azote liquide (-196°C) est donc une alternative pour assurer la stabilité et la conservation à long terme du matériel génétique de façon saine, économique et éliminant les problèmes liés aux aléas climatiques, aux maladies et aux insectes. L'aptitude d'embryons zygotiques (*C. arabica*) et somatiques (*C. canephora*) à résister à la température de l'azote liquide a été évaluée en développant deux techniques de congélation. Contrairement à la graine entière, l'embryon zygotique mature excisé peut être cryoconservé consécutivement à un séchage contrôlé sous 43% d'humidité relative à 18°C. Les embryons zygotiques reprennent leur développement bipolaire après réchauffement (70%), contrairement aux embryons somatiques. Pour ces derniers, la survie après cryoconservation suite à un traitement de déshydratation par séchage ou encore par imprégnation dans une solution enrichie en saccharose et un prérefroidissement à -20°C s'exprime par embryogenèse secondaire (100%). Des plantes de caféier ont été obtenues à partir des embryons zygotiques congelés et des embryons issus d'embryons somatiques et de lignées embryogènes de *C. arabica* (cvs. catuai et caturra), *C. canephora* et d'hybride arabusta (*C. arabica x C. robusta*) congelés. Par leur simplicité, la mise en oeuvre de ces techniques devrait favoriser la mise en place de collection de génotypes d'espèces autogame et allogame dans l'azote liquide en vue de la conservation à long terme des ressources génétiques ainsi que faciliter les échanges internationaux de germplasm de caféier.

SUMMARY

LONG-TERM STORAGE OF COFFEE GERMPASM BY CRYOPRESERVATION OF ZYGOTIC AND SOMATIC EMBRYOS AND EMBRYOGENIC STRAINS.

Bruno FLORIN, Hervé TESSERAU, Vincent PETIARD

Coffee germplasm is maintained in field genebanks because of the short life of seeds and their sensitivity to conventional seed storage methods. Cryopreservation or storage in liquid nitrogen (-196°C) provides a unique alternative for maintaining genetic stability for virtually indefinite periods of time. This method offers the possibility of safe and genetically stable long-term preservation of germplasm avoiding drawbacks such as high cost, pests, diseases and adverse environments. The ability of zygotic (*C. arabica*) and somatic (*C. canephora*) embryos to withstand the temperature of liquid nitrogen was evaluated using several freezing methods. Contrary to seeds, mature zygotic embryos can be cryopreserved after a controlled drying under 43% relative humidity at 18°C. After thawing, direct regrowth of zygotic embryos was observed. With this same method or with a simple method based on a sucrose pretreatment followed by prefreezing at -20°C, the regrowth of somatic embryos was expressed by secondary embryogenesis. Coffee plants have been obtained from frozen zygotic embryos and embryos formed from frozen somatic embryos or embryogenic strains of various coffee species (*C. arabica* cvs. catuai and caturra, *C. canephora* and arabusta hybrid). The simplicity of these methods could stimulate the establishment of liquid nitrogen genebanks for long-term preservation and exchanges of coffee germplasm.

DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE DE TRANSFORMATION APPLIQUÉE À DIFFÉRENTES ESPÈCES DE CAFÉIER ET RÉGÉNÉRATION DE PLANTULES TRANSGÉNIQUES

J. SPIRAL, V. PÉTIARD

FRANCERECO S.A., 101, Avenue Gustave Eiffel, 37390 Notre-Dame-D'Océ, France

INTRODUCTION

L'amélioration génétique des espèces ligneuses par l'introgression de nouveaux caractères de nature agronomique (résistance aux maladies ou aux insectes) ou technologique (composition et qualité de l'extrait) est un processus long, à cause du cycle biologique de ces espèces pérennes, autogames ou allogames selon le cas.

L'utilisation de la transformation génétique pour la création de nouvelles variétés améliorées de caféier constituerait donc un progrès décisif dans la sélection.

Les publications de transformation de plantes ligneuses restent encore limitées et pour le caféier, les premières tentatives ont été rapportées par Barton *et al.* (1) concernant l'obtention d'embryons somatiques transformés à partir de protoplastes de *Coffea arabica* traités par électroporation mais ils n'ont pas réussi, semble-t-il, à développer des plantules à partir de ces embryons. Devant ces résultats préliminaires décevants, il nous a paru intéressant de rechercher une autre voie de transformation pour le caféier.

L'utilisation de souches cellulaires a potentiel embryogène déjà décrit dans la littérature par Parrot *et al* (2) comme favorable à la régénération de plantes transgéniques semblait un matériel intéressant et ceci nous a déjà permis de régénérer des plantules transformées de *C.canephora* (3).

Nous décrivons ci dessous l'obtention de plantules de *Coffea canephora* (Robusta), de *Coffea arabica* cv. Caturra et d'hybrides interspécifiques "Arabusta" toutes transformées par néoformation d'embryons secondaires sur des embryons somatiques infectés par une souche d'*Agrobacterium rhizogenes* .

MATERIEL ET METHODES

- **Matériel végétal** : Les génotypes de caféier utilisés ont été fournis par l'IRCC/CIRAD; ils sont établis en culture *in vitro* soit à partir de graines pour le génotype de *Coffea canephora* (Robusta) originaire du Cameroun, soit à partir de boutures pour les génotypes de *Coffea arabica* cv. Caturra Rojo de Colombie et pour l "Arabusta" 1307. Les microboutures sont conservées par repiquage toutes les 5 semaines sur le milieu MS (4) contenant 1 mg/l de BAP et 30 g/l de saccharose. Les embryons somatiques néoformés à la base des microboutures ont été utilisés pour les expériences de transformation.

- **Vecteur de transformation** : Le vecteur de transformation est une souche A4 virulente d'*Agrobacterium rhizogenes* contenant, d'une part, le plasmide Ri sauvage et, d'autre part, le plasmide binaire p 35S-GUS-INT (5). Cette souche a été fournie par L. Jouanin (Laboratoire de Biologie Cellulaire - INRA Versailles) et est cultivée sur le milieu MYA (6) contenant 50 mg/l de kanamycine et de rifampicine.

L'ADN-T binaire comprend entre ses bordures droite et gauche le gène rapporteur GUS et le gène marqueur de sélection NPTII respectivement sous promoteur 35S (CaMV) et NOS. La présence de l'intron PIV2 dans la phase codante du gène GUS permet d'éviter d'éventuelles expressions indésirables dues aux bactéries.

- **Protocole de transformation** : Les embryons somatiques récoltés au stade torpille sont blessés au scalpel puis incubés pendant une heure dans une culture bactérienne âgée de 20 heures. Ils sont ensuite cultivés à 26°C sous un éclairage de 75 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de 16h/24h, sur le milieu M2 (7) solidifié par 3 g/l de gelrite. Après 11 jours dans ces conditions, les embryons sont repiqués sur le même milieu contenant 200 mg/l de céfaloridine (céporine, Laboratoire Glaxo) pour arrêter la multiplication bactérienne.

- **Test histochimique GUS** : Le test d'activité de la β -glucuronidase est effectué selon le protocole de Jefferson (8): 5 mg de X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronic acid, Biosynth AG - Switzerland) sont dissous dans 10 ml de tampon Na_2HPO_4 , $2\text{H}_2\text{O}$, 50 mM et Triton X100, 0,1 % v/v, pH 7 ajusté avec KOH 3N.

Les échantillons à tester sont placés en présence de 80 μl de la solution précédente dans les puits de plaques Microwell 96, puis incubés de 2 à 24 h à 37°C. Une coloration bleue caractéristique de l'activité glucuronidase apparaît si l'échantillon est transformé.

- **Analyse moléculaire** : L'ADN des échantillons à tester est extrait à partir d'un cotylédon (2-5 mg de matériel frais) selon la méthode de Edwards *et al.* (9) modifiée par l'addition de bisulfite de sodium au tampon d'extraction pour atteindre une concentration finale de 100 mM.

Les réactions PCR ("Polymerase Chain Reaction") de 100 μl sont initiées avec environ 1ng d'ADN, 200 μM de chaque dNTP, 0,6 μM des amorces spécifiques du gène GUS et NPT II plus 2 unités de Taq polymérase (Stratagene).

La réaction est réalisée dans un appareil Biomed au cours de 30 cycles comprenant les phases suivantes : 1 minute à 94°C, 1 minute à 45°C (amorces GUS) ou 55°C (amorces NPTII), 2 minutes à 72°C. Les produits ainsi obtenus sont visualisés par coloration au bromure d'éthidium après migration sur gel d'agarose à 1,4% (p/v).

L'analyse de l'intégration du gène GUS dans le génome de *C.canephora* par "southern blot " est réalisée en digérant l'ADN extrait de 400 mg de feuilles, par les enzymes de restriction EcoR I et Hind III . Après migration sur gel d'agarose à 0,8% (p/v) , l'ADN est transféré sur membrane nylon puis hybridé avec une sonde radioactive du gène GUS obtenue par amplification PCR.

RESULTATS

Trois semaines après la fin de la coculture (transfert sur céporine) on peut observer sur les embryons traités l'apparition de cals, d'embryons somatiques directement ou de racines (Figure 1). Six semaines plus tard, les racines néoformées, sont repiquées individuellement sur milieu M2 (7) alors qu'une partie aliquote est soumise au test histochimique GUS. De même, les embryons somatiques secondaires apparus sur les embryons infectés sont isolés et leur pointe racinaire est individuellement soumise au test GUS (Figure 2). Les résultats des différentes expériences de transformation réalisées sur les trois génotypes sont résumés dans la Figure 5.

Lors de la première expérience de coculture d'embryons somatiques de *C. canephora* avec *Agrobacterium rhizogenes*, nous n'avons pas obtenu de racines transformées (3) mais uniquement des cals transformés (6.4% de test GUS positifs) qui ont régénéré par la suite des embryons somatiques puis des plantules transformées (Figure 4).

Les expériences de transformations suivantes, (avec deux répétitions), ont toutes présenté une réponse morphogénétique rhizogène. Ces racines ont été éprouvées au test d'activité de la β -glucuronidase et 10% de racines GUS positives ont été obtenues pour *C. canephora* et entre 30 et 40 % pour *C. arabica* et "Arabusta". Les racines ayant présenté une réaction GUS positive sont repiquées sur milieu M4 (7). Après 4 semaines, on observe la régénération d'embryons directs avec une fréquence de 13 à 35% suivant le génotype (Figure 3). Deux mois plus tard, leur développement en plantule permet le prélèvement d'un cotylédon afin de vérifier l'intégration dans leur génome des gènes GUS et NPT II.

L'électrophorégramme des produits d'amplification par PCR du gène GUS obtenus à partir de l'ADN extrait des plantules testées est présenté dans la Figure 6.

Seul l'ADN des plantules ayant présenté une activité GUS positive contient le fragment de 892 pb correspondant à la séquence amplifiable du gène GUS. Par ailleurs, le fragment de la séquence amplifiable du gène GUS sans intron cloné dans le plasmide pBI 221 migre au niveau attendu correspondant à 703 pb (892 pb - 189 pb de l'intron). Ce résultat d'analyse par PCR a été confirmé sur une plantule de *C. canephora* par "southern blot" où l'on observe une hybridation spécifique de la sonde radioactive du gène GUS avec l'ADN de la plantule GUS positive et non chez le témoin (Figure 7).

Ainsi, il apparaît clairement que les plantules testées pour chacune des trois espèces de caféier, et ayant préalablement présenté une réaction GUS positive ont effectivement intégré l'ADN-T porté par le plasmide p35S GUS-INT utilisé lors de la coculture.

Il est à noter que les tissus transformés n'ont pas été sélectionnés sur kanamycine. Ceci parce que tous les embryons somatiques de caféier testés dans le cadre d'expérimentations préalables se sont révélés tolérants à de fortes concentrations (400 mg/l) de ce composé. De même, des expériences avec d'autres antibiotiques généticine ou hygromycine ont donné des résultats similaires. La croissance sur un milieu contenant de la kanamycine n'aurait pas été un indice de transformation par le gène NPTII. Les plantules transformées ont poursuivi normalement leur développement sur le milieu M4 dépourvu de BAP (M5) (7). Certaines sont actuellement au stade de huit feuilles et peuvent être transférées en serre. Le contrôle de l'homogénéité de la transformation de différents tissus d'une même plante confirmerait l'origine unicellulaire des embryons néoformés sur les cals.

CONCLUSION

Les résultats de ces expériences, confirment que cette technique de coculture d'embryons somatiques de caféier avec *Agrobacterium rhizogenes* permet d'intégrer un gène marqueur (GUS) avec une fréquence élevée d'événements de transformation supérieure à 10% pour les trois génotypes utilisés. Le test d'activité de la β -glucuronidase a montré l'expression du gène GUS et les analyses par PCR et "southern blot" son intégration. Il semble que plusieurs copies du gène se soient intégrées dans le génome mais ceci reste à confirmer de même que sa transmission dans la descendance.



Figure 1 : Régénération de racines et d'embryons somatiques sur un embryon somatique infecté par *Agrobacterium rhizogenes*.



Figure 2 : Test d'activité de la β -glucuronidase sur racines.

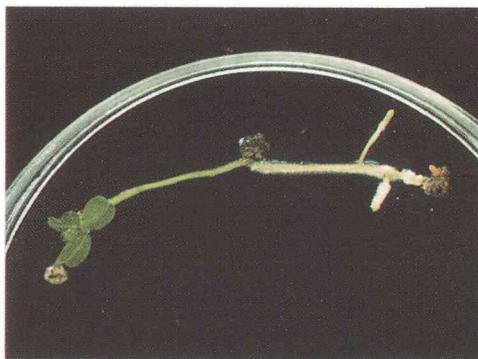
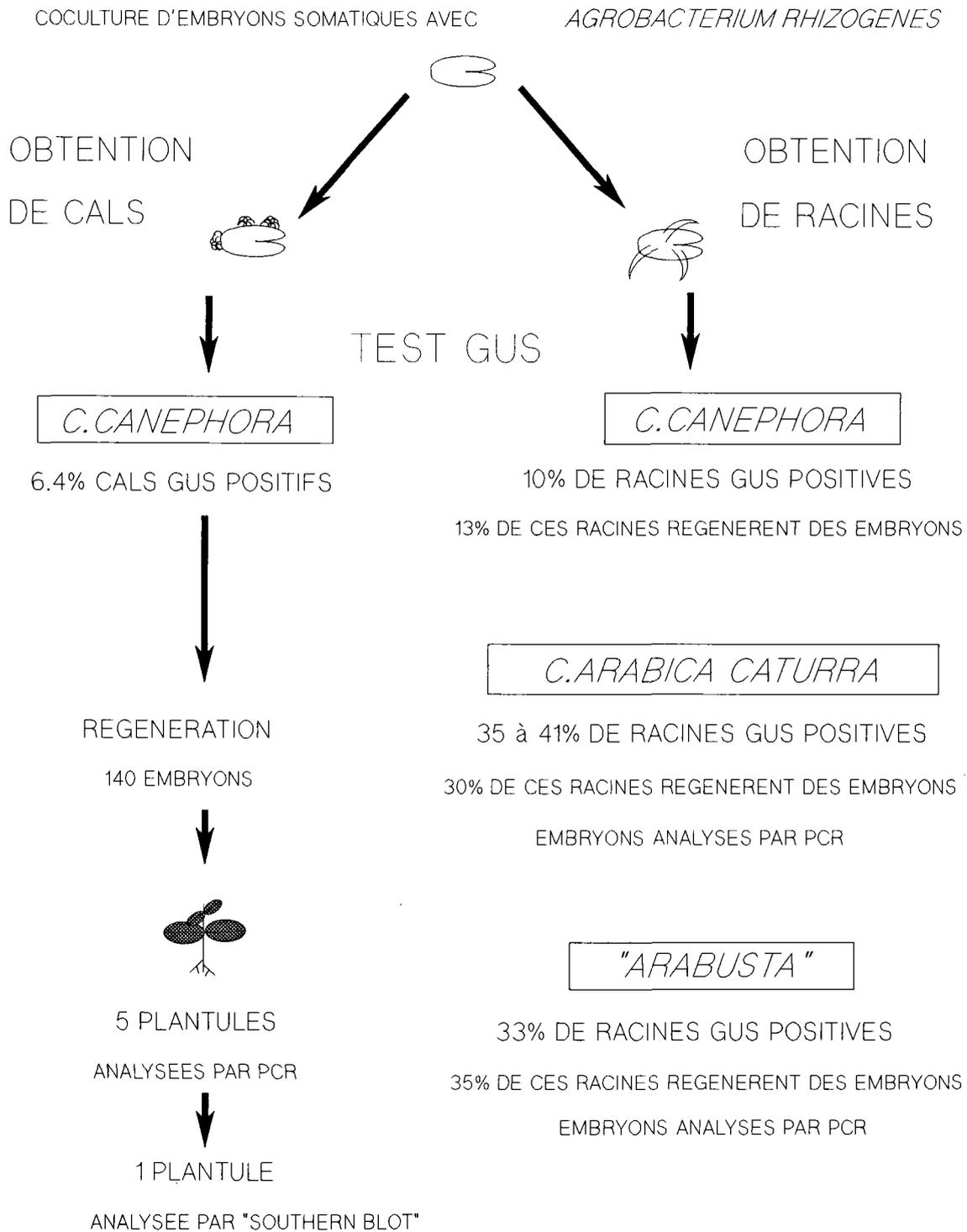


Figure 3 : Régénération d'embryons somatiques sur racine transformée.



Figure 4 : Plantule de *Coffea canephora* régénérée après transformation.

Figure 5: Schéma récapitulatif des expériences de transformation



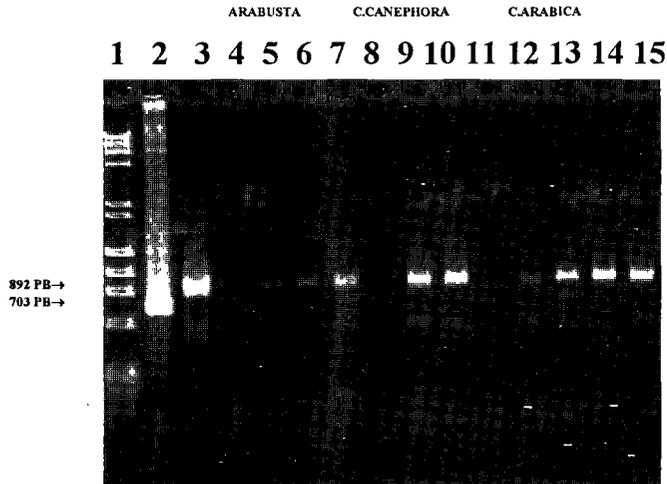


Figure 6 : Amplification du gène GUS par PCR

Electrophorégramme obtenu par migration des séquences amplifiées par PCR, à partir d'ADN de différentes origines, avec deux oligonucléotides situés dans le gène GUS.

Puits 1 : marqueur de poids moléculaire λ Hind III/ ϕ X 174 / Hae III.

Puits 2 : plasmide pBI 221, contenant un gène GUS sans intron.

Puits 3 : ADN du vecteur de transformation A4p35SGUS-INT.

Puits 4 : ADN du témoin de transformation "Arabusta".

Puits 5 à 7 : ADN de 3 plantules d'"Arabusta" présentant une activité GUS.

Puits 8 : ADN du témoin de transformation *C. canephora*.

Puits 9 et 10 : ADN de 2 plantules de *C. canephora* présentant une activité GUS.

Puits 11 : ADN du témoin de transformation *C. arabica*.

Puits 12 à 15 : ADN de 4 plantules de *C. arabica* présentant une activité GUS.

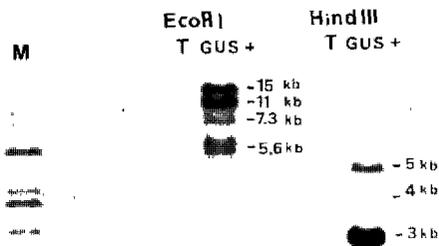


Figure 7 : Analyse par "Southern blot " d'une plantule transformée de *C. canephora*

Puits M : marqueur de poids moléculaire.

Puits T : Témoin sans transformation : pas d'hybridation avec la sonde du gène GUS

Puits GUS+ : plantule transformée hybridée avec la sonde du gène GUS

REMERCIEMENTS

Nous remercions L. JOUANIN pour la fourniture de la souche d'*Agrobacterium* et ses conseils techniques ainsi que le personnel technique de Francereco S.A.

Liste des abréviations

NPTII :	néomycine phosphotransférase
GUS :	β -glucuronidase
PCR :	polymerase chain reaction
BAP :	benzyl-6-aminopurine
CaMV	cauliflower mosaic virus (virus de la mosaïque du chou fleur)
NOS :	nopaline synthase
dNTP :	désoxyribonucléotides triphosphates
pb :	paires de base

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) BARTON, C.R., ADAMS, T.L. et ZARWITZ, M.A.,
Stable transformation of foreign DNA into *Coffea arabica* plants.
dans ASIC : 14ème colloque scientifique sur le café, San Francisco, 14-19 Juillet 1991, p. 460-464.
- (2) PARROT, W.A., MERKLE, S.A. et WILLIAMS, E.G.,
Somatic embryogenesis : Potential for use in propagation and gene transfer systems.
dans "Advanced methods in plant breeding and biotechnology" Edited by David R. Murray , Biotechnology in Agriculture No. 4, 1991
p. 158-200.
- (3) SPIRAL, J., THIERRY, C., PAILLARD, M. et PETIARD, V.,
Obtention de plantules de *Coffea canephora* Pierre (Robusta) transformées par *Agrobacterium rhizogenes* .
C.R. Acad. Sci. Paris, t. 316, Série III, 1993, p. 1-6.
- (4) MURASHIGE, T. et SKOOG, F.,
A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures.
Physiol. Plant., 15, 1962, p. 473-497.
- (5) VANCANNEYT, G., SCHIMDT, R., O'CONNOR-SANCHEZ, A., WILLMITZER, L. et ROCHA-SOSA, M.,
Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in
Agrobacterium-mediated plant transformation.
Mol. Gen. Genet., 220, 1990, p. 245-250.
- (6) TEPFER, M. et CASSE-DELBART, F.,
Agrobacterium rhizogenes as a vector for transforming higher plants.
Microbiol. Sci., 24, 1987, p. 24-28
- (7) ZAMARRIPA, A., DUCOS, J.P., BOLLON, H., DUFOUR, M. et PETIARD, V.,
Production d'embryons somatiques de caféier en milieu liquide : effets densité d'inoculation et renouvellement du milieu.
Café, Cacao, Thé, Vol. XXXV, n°4 oct.déc. 1991, p. 233-244.
- (8) JEFFERSON, R.A.,
Assaying chimeric genes in plants : the GUS gene fusion system.
Plant Molecular Biology Reporter, Vol. 5, n° 4, 1987, p. 387-405.
- (9) EDWARDS, K., JOHNSTONE, C. et THOMPSON, C.,
A simple method for the PCR analysis.
Nucleic Acid Reseach, 19, 1991, p 1349.

RESUME

Des embryons somatiques de différentes espèces de caféier (*Coffea canephora*, *Coffea arabica* cv. Caturra et d'un hybride interspécifique "Arabusta") infectés par *Agrobacterium rhizogenes* développent soit directement des cals régénérant des embryons somatiques secondaires, soit des racines. Le test histochimique d'activité de la β -glucuronidase permet de mettre en évidence des événements de transformation à la fois sur les embryons régénérés secondairement et sur les racines produites qui peuvent régénérer ensuite en plantules transformées. L'intégration des gènes NPTII et GUS a été vérifiée chez les plantules régénérées par PCR et par "southern blot " pour une plante régénérée.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF A TRANSFORMATION METHOD APPLY TO DIFFERENT SPECIES OF COFFEE AND REGENERATION OF TRANSGENIC PLANTLETS

Somatic embryos of different coffee species (*Coffea canephora* , *Coffea arabica* cv. Caturra and one interspecific hybrid "Arabusta") infected with *Agrobacterium rhizogenes* are able to develop either calli with direct secondary somatic embryos or roots. Regenerated transformed plantlets are detected by the histochemical β -glucuronidase assay. Integration of NPTII and GUS genes have been demonstrated by PCR and "southern blot" analysis on transformed plantlet.

IN VITRO SELECTION OF COFFEA ARABICA CALLUS AND CELL SUSPENSIONS FOR RESISTANCE TO PHYTOTOXIC CULTURE FILTRATES FROM COLLETOTRICHUM COFFEANUM

N. E. NYANGE ¹, R. J. McNICOL ², B. WILLIAMSON ², G. D. LYON ²

¹ Agricultural Research & Training Institute, Lyamungu, PO Box 3004, Moshi, Tanzania

² Scottish Crop Research Institute, Invergowrie, Dundee DD2 5DA, Scotland, UK

INTRODUCTION

Coffee berry disease (CBD), caused by the fungus *Colletotrichum coffeanum* Noack *sensu* Hindorf is restricted to a few African countries, mainly in Ethiopia, Uganda, Kenya, Tanzania, Malawi, Cameroon, Angola, Zimbabwe and Mauritius. The disease may cause losses of more than 50% if not controlled by intensive fungicide spray programmes (Griffiths *et al.* 1971; Waller 1985). In Tanzania, the soaring cost of fungicides and the low profitability of diseased coffee plants has led the Lyamungu Research Centre to give high priority in the coffee improvement programmes to breeding and selection for resistance to CBD and other diseases. Production of disease resistant genotypes through conventional breeding methods is a process requiring more than 20 years. Therefore, alternative methods to shorten the breeding cycle are being examined in many countries, including the use of micropropagation, embryo rescue, cell selection, somaclonal variation, somatic hybridization, anther culture and transformation. *In vitro* selection offers the possibility of obtaining cell lines with important agronomic traits from the natural variability present in somatic cells and the variability induced by tissue culture.

Cell culture systems have been used successfully to identify disease-resistant plants by selection of cell and callus cultures resistant or tolerant to phytotoxic fungal culture filtrates, partially purified extracts or purified toxins produced by pathogens (Wenzel 1985; Daub 1986; van den Bulk 1991). Several of these systems established a correlation between toxin resistance *in vitro* and resistance to the pathogen (Behnke 1980; Hartman *et al.* 1984; Sacristan 1982; Thanutong *et al.* 1983; Hammerschlag 1988,1990).

There have been few reports of the extraction of phytotoxins from culture filtrates of *Colletotrichum* spp. The phytotoxins from *C. nicotianae* and *C. capsici* inhibited the growth of seedlings, and when applied to wounded leaves of host plants produced effects similar to the symptoms produced by the pathogens (Gohbara *et al.* 1977,1978; Duke *et al.* 1992). Griffiths & Anderson (1987) found that culture filtrates of race *B* of *C. lindemuthianum* caused a rapid death of protoplasts from hypocotyls of *Phaseolus vulgaris*, even at low concentrations, compared to the culture filtrate of the *A* race.

In this paper we describe the effects of partially-purified culture filtrates prepared from *C. coffeanum* on growth of calli and cell suspension cultures of *Coffea arabica*. The paper also describes techniques for quantitative measurement of growth and viability of

calli and cell cultures and discusses the usefulness of this system to select and regenerate CBD-resistant plants.

MATERIALS AND METHODS

1. *Plant material*

Two *Coffea arabica* genotypes were used in this study: N39 (Bourbon type), which is highly susceptible to CBD and Hybrid de Timor (a natural spontaneous cross between *C. arabica* and *C. canephora*) which is resistant to CBD. Seeds were supplied by the Director of the Agricultural Research and Training Institute, Tanzania. Plants were maintained in a glasshouse at a minimum of 24°C under supplementary lighting supplied by 350 W mercury vapour lamps.

2. *Preparation of partially-purified phytotoxic culture filtrates*

Colletotrichum coffeanum isolates 5/1, 6/1 and 90/9, supplied by F.S. Ngulu of A.R.T.I. Lyamungu, were cultured on malt extract agar at 20°C under black light (Philips TL/A0 W/08 max. emission 350 nm) for a 12 h photoperiod for 3 weeks. Mycelial plugs (5 mm in diameter) were grown in the undefined broth described by Anderson & Albersheim (1975), in 250 ml flasks each containing 125 ml broth. The cultures were grown in an orbital shaker at 120 rpm at 23°C for 21 days. The contents of the flasks were homogenised in an MSE blender, passed through a double layer of cheese cloth, and vacuum filtered through Whatman no. 54 filter paper. The culture filtrates were centrifuged at 1100 x g for 10 min, and the supernatant was successively filtered through Whatman cellulose nitrate membrane filters of pore size 3.0, 0.8 and 0.2 µm and then frozen at -40°C and subsequently freeze dried. The toxin was extracted from the freeze dried filtrate with methanol (redistilled Analar grade BDH), filtered through Whatman no. 1 filter paper and evaporated in a rotary evaporator (Rotavapor, Buchi, Switzerland). The methanol-soluble material was weighed and redissolved in sterile distilled water at 1/80 of the original volume of the culture filtrate and the pH adjusted to 5.5 with 0.1 N KOH. The extract was filter-sterilized (Flowpure membrane filter, pore size 0.2 µm) and stored at -40°C. The phytotoxicity of the partially-purified culture filtrate was confirmed by injection into leaves of 3-month-old seedlings in the glasshouse (Fig. 1), and excised hypocotyls with cotyledonary leaves attached.

3. *Preparation of callus and cell suspensions*

Callus cultures were initiated from 8 to 10 week old hypocotyl segments induced by the method described by Sondahl *et al.* (1984). The calli which developed were transferred to MS medium (Murashige & Skoog 1962) containing 30 g l⁻¹ sucrose, B5 vitamins (Gamborg *et al.* 1968), caseine hydrolysate 250 mg l⁻¹, kinetin 0.5 mg l⁻¹ and 2,4-D 0.5 mg l⁻¹ and incubated in darkness at 26°C. The callus was subcultured monthly and callus of 4 to 8 weeks old was sampled.

The suspension-cultured cells were obtained by growing calli in liquid callus maintenance medium (MS medium lacking agar), but with 0.5 mg l⁻¹ of kinetin, 2,4-D and NAA. The cell suspension cultures were incubated at 26°C on an orbital shaker at 110 rpm and maintained by diluting three-fold into fresh medium weekly.

4. *Production of toxic media*

C. coffeanum isolate 90/9 was the most aggressive isolate tested and was therefore chosen for further work on the toxin. Media for selecting cultures were prepared by adding filter-sterilized volumes of phytotoxic culture filtrates to the autoclaved liquid medium to provide various concentrations (1,5,10,25 and 35; and 10,25,35,50,60,75% v/v in 50 ml media for Experiments 1 & 2 respectively). Two controls were also included in the experiments, one lacking toxin and another with broth added at 50% v/v. In order to bring as many cells as possible into contact with the toxin, the calli were crushed into pieces c. 2 mm in size with a spatula and inoculated into the toxic media contained in 100 ml flasks with screw caps.

Cell suspensions were collected when 3 to 5 days old in 50 µm stainless steel sieves and inoculated on to the toxic media. The cultures were shaken in the incubator for 1 to 7 days. After the treatment, calli and cell suspensions were collected, washed with fresh toxin-free liquid medium to remove traces of toxin and transferred to toxin-free medium for subculture and regeneration through somatic embryogenesis as described by Sondahl & Sharp (1977).

5. *Measurement of the effect of culture filtrate on callus growth*

Treated calli were grown on a solid toxin-free medium in 30 mm Petri dishes for 4 weeks at 26°C. The growth of calli was measured non-destructively using automated image analysis which determined the size of individual calli in the dishes. Petri dishes with sealed lids were placed on a Whatman light box below a television camera (Panasonic MS70) fitted on a tripod stand. The camera output was sent to an Elonex computer PC386B/25 MHz containing an image capture card (Microeye TC with 24 bit full colour frame store) supplied by Digithurst Ltd, Herts, UK. Images were edited and analysed to determine the area of each callus by using a Windows-based software (Microscale) also supplied by Digithurst. Output from the computer was sent to a Sony Trinitron monitor PVM-1442QM and recorded to a video tape. The measurements were downloaded into a Works spreadsheet.

6. *Measurement of cell growth and viability*

The response of cell suspensions to culture filtrates was measured by determining the packed cell volume (PCV) and cell viability was measured by fluorescein diacetate (FDA) staining (Widholm 1972) and by MTT-colorimetric assay (Mosmann 1983) at day 1, 2, 5 and 7. The MTT-colorimetric assay is based on the reduction of tetrazolium salt, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), to dark-blue formazan in active mitochondria as demonstrated in living mammalian cells (Mosmann 1983). Cell suspensions (500 µl) were mixed with 50 µl of 5 mg/ml MTT solution (Sigma) and incubated at 30°C for 2 h. The suspension was then mixed with 500 µl of isopropanol containing 0.04 N HCl. The mixture was vigorously vortexed to extract MTT formazan from cells and then centrifuged at 1500 x g for 5 min. The absorbance of the supernatant was measured at 570 nm by a Uvikon 930 spectrophotometer (Kontron Instruments).

7. *Toxicity of culture filtrates (LD₅₀)*

The areas of calli and PCV and viability determinations for the cell cultures were used to determine the dose response curves. The concentration on which the growth of the calli and cells of the susceptible genotype was reduced to 50% of the control (LD₅₀) was determined and used for subsequent experiments to select tolerant/resistant variants.

RESULTS

1. *Effects of partially-purified culture filtrates (PPCF) of C. coffeanum on callus growth*

The growth of calli was evaluated after 4 weeks on toxin-free medium using automated image analysis. A differential effect was observed in both experiments when calli of N39 and cv. Hybrid de Timor were treated with a range of concentrations of the phytotoxic culture filtrate. Inhibition of growth ($P < 0.001$) relative to the controls was found in both genotypes; growth reduction and browning of calli of the susceptible genotype, N39, was evident after 7 days' incubation (Figs 2 & 3). When the concentration of the PPCF was increased to >50% calli from both genotypes were completely inhibited (Fig. 4).

2. *Effect of PPCF on cell growth and viability*

The growth of cells measured as packed cell volume (PCV) of cell suspension cultures exposed to different PPCF concentrations was inhibited significantly ($P < 0.001$) compared to the control cultures after day 7 (Fig. 5). The viability of cells as evaluated by FDA staining showed that cells of N39 were more sensitive at all concentrations above 10%, compared to cv. Hybrid de Timor (Fig. 6). In N39 the cells became brown with increase in PPCF concentrations and prolonged incubation, but adverse changes of the cell structure were not observed by light microscopy. Cells of N39 were less efficient ($P < 0.001$) than those of Hybrid de Timor in

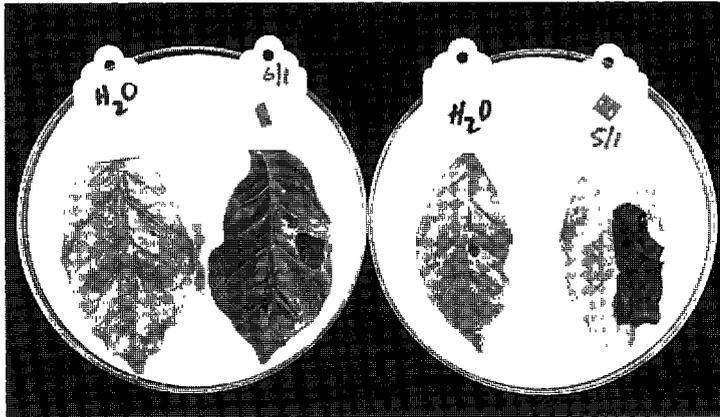
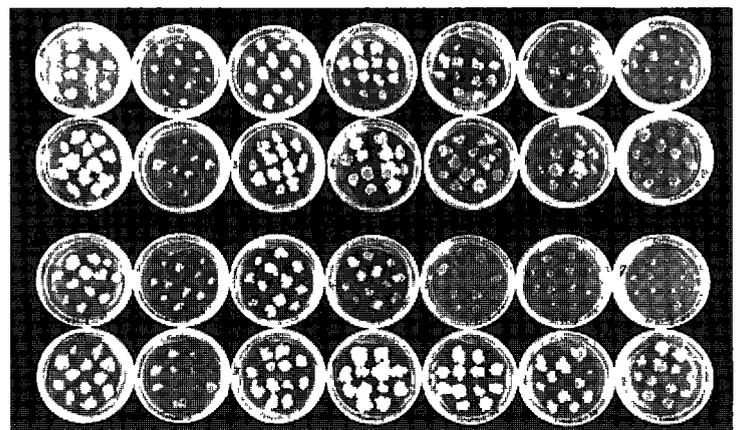


Fig. 1. Leaves of *C. arabica* N39 injected with PPCF of *C. coffeanum* isolate 6/1 or isolate 5/1 compared with controls.

Fig. 2. Effect of various concentrations of *C. coffeanum* PPCF on the growth of calli. N39 (top row) and Hybrido de Timor (second row), exposed to PPCF for 5 days prior to plating on agar. Bottom two rows are N39 and Hybrido de Timor exposed for 7 days to PPCF prior to plating on agar.



Control Broth 1% 5% 10% 25% 35%

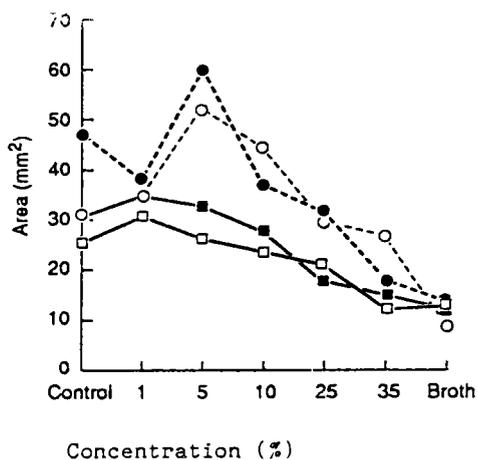


Fig. 3. Effect of various concentrations of *C. coffeanum* culture filtrates on the growth of calli from: N39 (susceptible) exposed for 5 days □, 7 days ○, Hybrido de Timor (resistant) exposed for 5 days ■, or 7 days ●.

Fig. 4

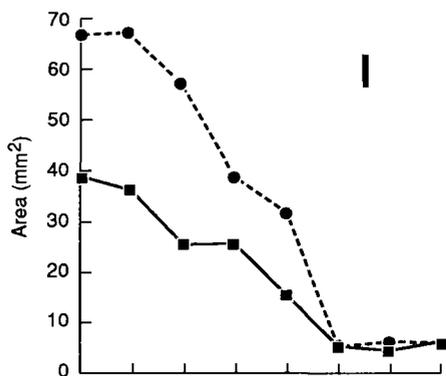


Fig. 5

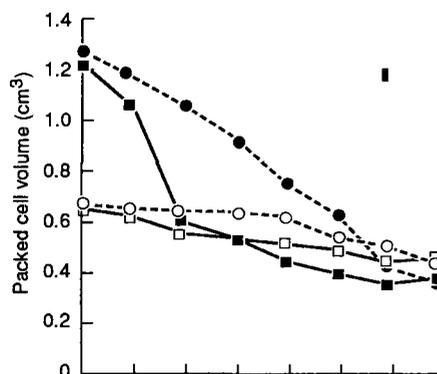


Fig. 6

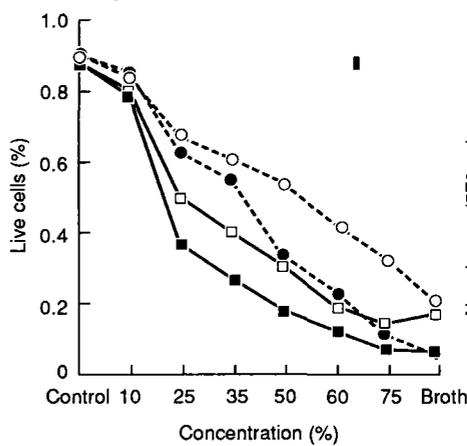
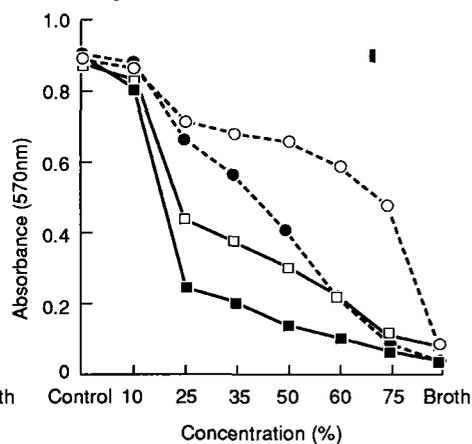


Fig. 7



Figs 4-7. Effect of various concentrations of *C. coffeanum* PPCF on the growth of calli (Fig. 4) and cell suspension cultures (Fig. 5), and the viability of cell suspension cultures using fluorescein diacetate (Fig. 6) and MTT (Fig. 7). Calli from: N39 exposed for 5 days □, 7 days ■; Hybrido de Timor exposed for 5 days ○, or 7 days ●. The vertical bars represent the SEDs.

Figs 8-10. Plant regeneration from toxin-selected callus and cell suspension cultures through somatic embryogenesis.



Fig. 8. Selected callus of N39 developing embryos (x2.5).

Fig. 9. Hybrido de Timor somatic embryos from calli of cell suspension cultures treated with 25% PPCF for 5 days.

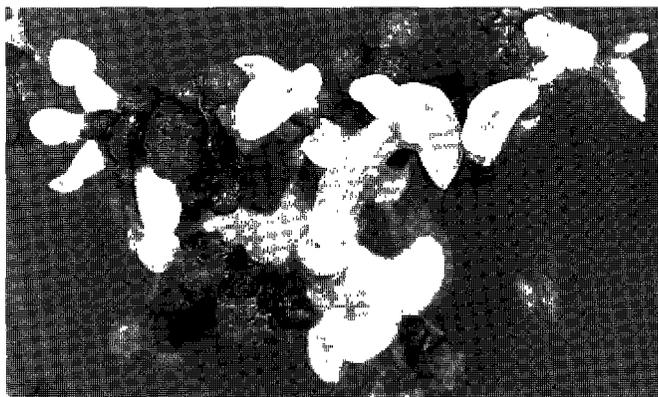


Fig. 10.. Plantlets obtained from somatic embryos.

producing the dark blue formazan in the MTT-colorimetric assay and depended on the concentration and period of exposure to PPCF (Fig. 7).

After selection, resistant calli and cells were grown on maintenance medium and subsequently on callus conditioning and embryo induction media. Figs 8-10 show the regeneration of plants from the selected cultures. Plants were transferred to soil and grown under glasshouse conditions, and will be evaluated for resistance to partially purified toxin and infection by the pathogen.

DISCUSSION

The high genetic variability found *in vitro* and the correlation often observed between responses of a host to a challenging pathogen *in vitro* and *in vivo* supports the use of *in vitro* selection techniques in resistance breeding (van den Bulk 1991). The results of the present study with partially-purified phytotoxic culture filtrates of *C. coffeanum* on calli and cell suspensions of *Coffea arabica* show that the filtrates induced stress and inhibition of growth and viability of cells. The use of automated image analysis facilitated the efficient determination of the growth rate of hundreds of toxin-treated calli, and removed entirely the risk of microbial contamination encountered with other methods.

The use of LD₅₀ allowed the recovery of more tolerant/resistant variants from the susceptible and resistant genotypes. The inoculation of crushed calli into the liquid selection media was more effective than adding toxin into the agar media, because it brought the entire callus surface into contact with the toxin. Callus cultures lack xylem bundles and little is known about the diffusion of toxin into callus. On solid media, therefore, only the cells at the base of the callus in contact with the toxin-treated agar have the opportunity to respond to the treatment.

Previous methods used for the quantitative determination of the effect of toxin on plant cultured cells are based on the measurement of weight or volume as indicators of proliferation, and the plating efficiency as a survival indicator (Fuson & Pratt 1988; Witsenboer *et al.* 1988; Frame *et al.* 1991). Vital staining with FDA has also been used for detecting viable cells (Widholm 1972). These methods are laborious and require large numbers of cells. The use of the MTT-colorimetric assay in this work proved an efficient and reliable alternative method. The tetrazolium salts are converted in living cells to dark blue formazan by mitochondrial dehydrogenase activity (Mosmann, 1983) and dissociation of mitochondrial function and resultant cell death could be detected by the MTT-assay. Kodama *et al.* (1991) reported the effectiveness of this assay for determination of the toxicity of the AL-toxin produced by *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici* to cultured cells of tomato.

Our study indicated that bioassays using *C. arabica* cells are reliable and sensitive for determining host-pathogen interactions with culture filtrates from *C. coffeanum* and for screening new germplasm for disease resistance and identification of resistant variants *in vitro*.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Mr D Prior for advice and use of automated image analysis system, Dr C. Hackett of the Scottish Agricultural Statistical Service, the late Mr D.L. Kessy, Director of the Agricultural Research and Training Institute, Lyamungu, Tanzania, for seeds and F.S. Ngulu of A.R.T.I., Lyamungu, for fungal isolates used in this work.

This project is supported by a grant to N.E. Nyange from the EEC, Tanzania ASSP (Coffee Production and Marketing Project No. 6100.39.50.005) and administered by the British Council and also in part by the Scottish Office Agriculture and Fisheries Department.

REFERENCES

- ANDERSON, A.J. AND ALBERSHEIM, P. (1975). Host-pathogen interactions. VII. Isolation of a pathogen-synthesized fraction rich in glucan that elicits a defense response in the pathogen's host. *Plant Physiology* 56: 286-291.
- BEHNKE, M. (1980). General resistance to late blight of *Solanum tuberosum* plants regenerated from callus resistant to culture filtrates of *Phytophthora infestans*. *Theoretical and Applied Genetics* 56: 151-152.
- DAUB, M.E. (1986). Tissue culture and selection of resistance to pathogens. *Annual Review Phytopathology* 24: 159-186.
- DUKE, S.O., GOHBARA, M., PAUL, R.N. and DUKE, M.V. (1992). Colletotrichin causes rapid membrane damage to plant cells. *Journal of Phytopathology* 134: 289-305.
- FRAME, B., KANG-FU, YU., CHRISTIE, B.R. and PAULS, K.P. (1991). *In vitro* selection for resistance to *Verticillium* wilt in alfalfa (*Medicago sativa* L.) using a fungal culture filtrate. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39: 325-340.
- FUSON, G.B. and PRATT, D. (1988). Effects of the host-selective toxins of *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici* on suspension-cultured tomato cells. *Phytopathology* 78: 1641-1648.
- GAMBORG, O.L., MILLER, R.A. and OJIMA, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 151-158.
- GOHBARA, M., KOSUGE, Y., SUZUKI, A., TAMURA, S., OHASHI, Y. and SASADA, Y. (1977). Colletotrichin monohydrate methanol solvate. *Acta Crystal B33*: 1276-1278.
- GOHBARA, M., KOSUGE, Y., YAMASAKI, S., KIMURA, Y., SUZUKI, A. and TAMURA, S. (1978). Isolation, structures and biological activities of Colletotrichins, phytotoxic substances from *Colletotrichum nicotianae*. *Agricultural Biological Chemistry* 42: 1037-1043.
- GRIFFITHS, E., GIBBS, I.N. and WALLER, J.M. (1971). Control of coffee berry disease. *Annals of Applied Biology* 67: 45-54.
- GRIFFITHS, H.M. and ANDERSON, A.J. (1987). Response of *Phaseolus vulgaris* protoplasts to chemical components of fungal origin. *Canadian Journal of Botany* 65: 63-68.
- HAMMERSCHLAG, F.A. (1988). Selection of peach cells for insensitivity to culture filtrate of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* and regeneration of resistant plants. *Theoretical and Applied Genetics* 76: 865-869.
- HAMMERSCHLAG, F.A. (1990). Resistance response of plants regenerated from peach callus to *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 115: 1034-1037.
- HARTMAN, C.L., McCOY, T.J. and KNOUS, T.R. (1984). Selection of alfalfa (*Medicago sativa*) cell lines and regeneration of plants resistant to the toxin(s) produced by *Fusarium oxysporum* f.sp. *medicaginis*. *Plant Science Letters* 34: 183-194.
- KODAMA, M., YOSHIDA, T., OTAM, H., KOHMOTO, K. and NISHIMURA, S. (1991). Effect of AL-toxin produced by *Alternaria alternata* tomato pathotype on viability of cultured tomato cells determined by MTT-colorimetric assay. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 57: 663-670.
- MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-479.

- SACRISTAN, M.D. (1982). Resistance response to *Phoma lingam* of plants regenerated from selected cell and embryogenic cultures of haploid *Brassica napus*. *Theoretical and Applied Genetics* 61: 193-200.
- SONDAHL, M.R. and SHARP, W.R. (1977). High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologische* 81: 395-408.
- SONDAHL, M.R., NAKAMURA, T., MEDINA-FILHO, H.P., CARVALHO, A., FAZUOLI, L.C. and COSTA, W.M. (1984). Coffee. In P.V. Ammiranto, D.A. Evans, W.R. Sharp & Y. Yamada (eds). *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol. 3, pp.565-590, MacMillan, New York.
- THANUTONG, P., FURUSAWA, I. and YAMAMOTO, M. (1983). Resistant tobacco plants from protoplast-derived calluses selected for their resistance to *Pseudomonas* and *Alternata* toxins. *Theoretical and Applied Genetics* 66: 209-215.
- VAN DEN BULK, R.W. (1991). Application of cell and tissue culture and *in vitro* selection for disease resistance breeding - a review. *Euphytica* 56: 269-285.
- WALLER, J.M. (1985). Control of coffee berry disease. In M.N. Clifford and K. Willson (eds). *Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverages* pp.219-228, Croom Helm, London.
- WENZEL, G. (1985). Strategies in unconventional breeding for disease resistance. *Annual Review Phytopathology* 23: 149-172.
- WIDHOLM, J.M. (1972). The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technology* 47: 189-194.
- WITSENBOER, H.M.A., VAN SCHAIK, C.E., BINO, R.J., LOFFLER, H.J.M., NIJKAMP, H.J.J. and HILLE, J. (1988). Effects of *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici* toxins at different levels of tomato plant cell development. *Plant Science* 56: 253-260.

SUMMARY

Resistance to the fungal pathogen *Colletotrichum coffeanum* which causes coffee berry disease in *Coffea arabica* is an important trait for cultivars grown in East and Central Africa. Calli and cell suspension cultures derived from hypocotyl explants of both susceptible and resistant cultivars 'N39' and Hybrid de Timor respectively, were selected for their resistance to partially-purified phytotoxic culture filtrates produced by the fungus. Growth of calli was measured non-destructively by automated image analysis to determine callus size. For quantitative measurements of the phytotoxin-treated cells, fluorescein diacetate (FDA) staining and a colorimetric assay utilising a tetrazolium salt, MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] were employed. Differential responses of calli and cells ranged from necrosis and reduced growth to no necrosis and normal growth. Growth and viability of cells of the susceptible cultivar was significantly reduced. Results demonstrate that selection of toxin-resistant calli and cells can be achieved using the method. Several somatic embryos and shoots have been regenerated from the selected calli and cells, and will be tested subsequently to confirm the stability of the resistance.

RÉSUMÉ

La résistance au champignon pathogène *Colletotrichum coffeanum* responsable du coffee berry disease chez le *Coffea arabica* est un caractère important pour les variétés cultivées en Afrique de l'Est et Centrale. Les cals et les suspensions de cellules obtenus de segments d'hypocotyle de N39 et Hybrid de Timor, variétés susceptibles et résistantes respectivement ont été sélectionnés pour leur résistance à des filtrats de culture phytotoxiques partiellement purifiés du champignon. La croissance des cals a été déterminée d'une manière non-destructive

par la méthode 'automated image analysis' en mesurant la taille des cals. La détermination quantitative de l'effet du traitement des cellules avec la phytotoxine a été faite en teignant avec 'fluorescein diacetate (FDA)' et un test colorimétrique avec un sel de tetrazolium, MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]. Les réactions varient d'une nécrose et une pousse ralentie à une absence de nécrose et une pousse normale. La pousse et la viabilité des cellules de la variété susceptible ont été considérablement réduites. Les résultats ont démontré que la sélection des cals et cellules résistants à la toxine peut se faire par cette méthode. Plusieurs embryons somatiques ont été régénérés des cals et cellules sélectionnés et seront examinés afin de confirmer la stabilité de la résistance.

INDUCTION OF DOUBLE HAPLOIDS ON *COFFEA ARABICA* CULTIVARS VIA ANther OR ISOLATED MICROspORES CULTURE

M. F. CARNEIRO

Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, Quinta do Marquês, 2780 Oeiras, Portugal

Abstract

The importance of haploid plant production in coffee breeding programme is a fact. In spite of the progress of *in vitro* coffee tissue culture, the introduction in coffee breeding of new cultivars obtained by androgenesis is far from being achieved. In this communication we reported the induction of embryogenesis and plant regeneration in cvs. Catuai and Catimor by culturing isolated microspores and whole anthers in Murashige & Skoog (1962) and Nitsch (1974) liquid and solidified media, supplemented with different combinations of growth regulators, vitamins and amino acids.

INTERDEPENDENCE OF CAFFEINE AND CHLOROGENIC ACID (5-CQA) METABOLISM IN COFFEE

T. W. BAUMANN, S.-S. MÖSLI, B. H. SCHULTHESS, R. J. AERTS

Institute of Plant Biology, University of Zurich,
Zollikerstr. 107, CH-8008 Zurich, Switzerland

Introduction

Extensive chemical analyses of seeds of different coffee species have revealed a very consistent parallelism between caffeine and chlorogenic acid (5-CQA) contents, e.g. wild species found in Madagascar or East Africa are low in both caffeine and 5-CQA, whereas the cultivated coffee species rich in caffeine have likewise high 5-CQA contents (Chassevent, 1972; Carelli et al., 1974; Clifford et al., 1989). Such a correlation has been also observed during leaf and fruit development in *Coffea arabica* (El Hamidi and Wanner, 1964) and points to the physiological role of 5-CQA having been described as forming not only in crystals (Gorter, 1907; Martin et al., 1987) but also in aqueous solution (Sondheimer et al., 1961; Horman and Viani, 1972; Kappeler et al., 1987) and in plant tissue (Baumann and Röhrig, 1989; Baumann et al., 1991) a 1:1 complex with caffeine and other purine alkaloids.

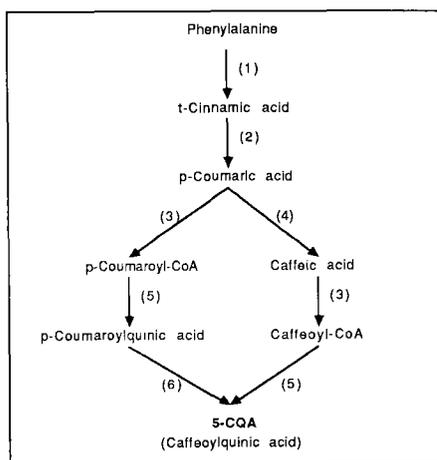


Fig. 1. Scheme of 5-CQA biosynthesis as elucidated by several authors (e.g. Zucker, 1965; Gamborg, 1967; Steck, 1968; Kojima and Uritani, 1973; Stöckigt and Zenk, 1974, Ulbrich and Amrhein, 1978; Ulbrich and Zenk, 1979)

- (1) Phenylalanine ammonia-lyase
- (2) Cinnamic acid 4-hydroxylase
- (3) Hydroxycinnamoyl-CoA-ligase
- (4) Coumaric acid hydroxylase
- (5) Hydroxycinnamoyl-CoA:quinic acid hydroxycinnamoyltransferase
- (6) Coumaroylquinic acid hydroxylase

Since regulation of 5-CQA biosynthesis is well investigated (Fig. 1), it was a fascinating task to

study its coherence to caffeine formation. We report here on the induction of PAL and of 5-CQA synthesis in suspension-cultured cells by exogenous stimuli such as light and methyl jasmonate, and on the concomitant changes in caffeine formation. Moreover, we followed the levels of both 5-CQA and caffeine during seed germination as well as during leaf development.

Results and Discussion

Suspension-cultured cells

In Fig. 2 the results obtained with a caffeine-producing cell line are shown. When cells are grown in the dark (Fig. 2A) the activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) is low (av. of about 4 pkat.g⁻¹ FW) during the entire period of cultivation. The activity of PAL determines the extent to

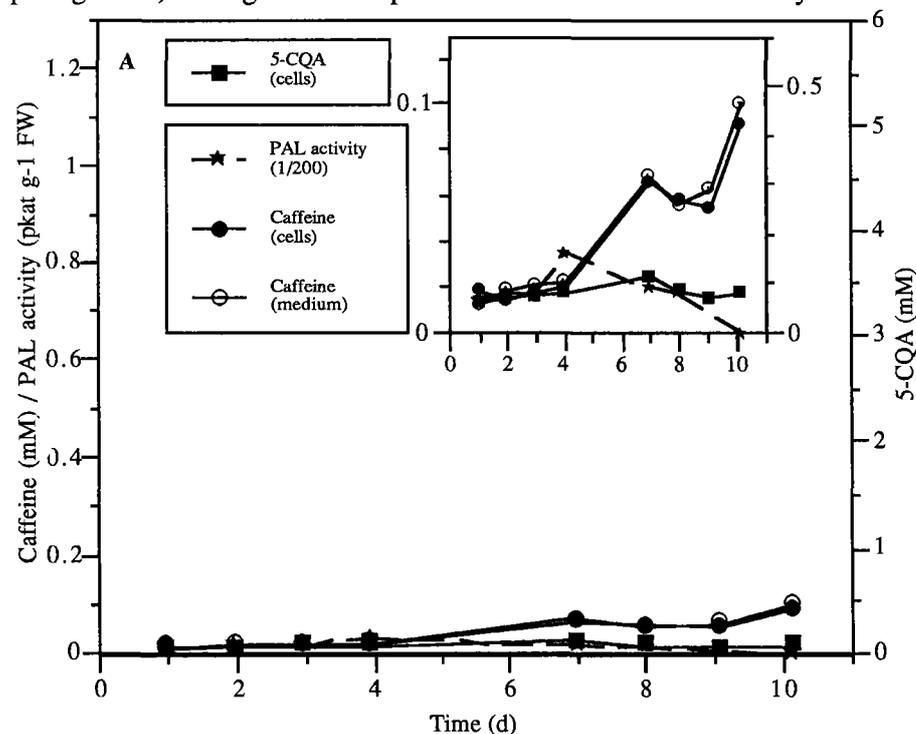


Fig. 2: PAL activity, 5-CQA, and caffeine in cell suspension cultures of *Coffea arabica* grown either in the dark (A) or exposed to light at day 1 (B; see opposite page)

which L-phenylalanine from primary metabolism is directed into the phenolic pathway eventually leading to 5-CQA. Not surprisingly, 5-CQA remains on a low and constant level and caffeine slightly accumulates and finally reaches only a concentration of about 0.1 mM. It should be noted that caffeine concentration within the cells is equal to that in the medium. In contrast, when the cell culture is put into light (Fig. 2B) PAL activity drastically increases and reaches a maximum (> 200 pkat.g⁻¹ FW) after about 24 h of exposure. As one would expect, 5-CQA formation is also triggered resulting in a maximum intracellular concentration of about 5 mM. No extracellular 5-CQA could be detected. With a delay of 3 days synthesis of caffeine is induced and still rapid at the end of the experiment. Intracellular caffeine concentration is about 5 times higher than in the dark. It is obvious (Fig. 2B) that under conditions of light caffeine is being intracellularly compartmented most presumably by 5-CQA complexation resulting in a distribution factor cell to medium of about 2. Conclusively, induction of PAL activity by light leads to a massive 5-CQA formation followed in a coupled manner by synthesis and compartmentation of caffeine.

Exogenously applied jasmonates are known to elicit the accumulation of secondary compounds and to induce PAL in cell suspension cultures (Gundlach et al., 1992). To test the hypothesis of a metabolic link between 5-CQA and caffeine, we studied their formation in cells growing in the

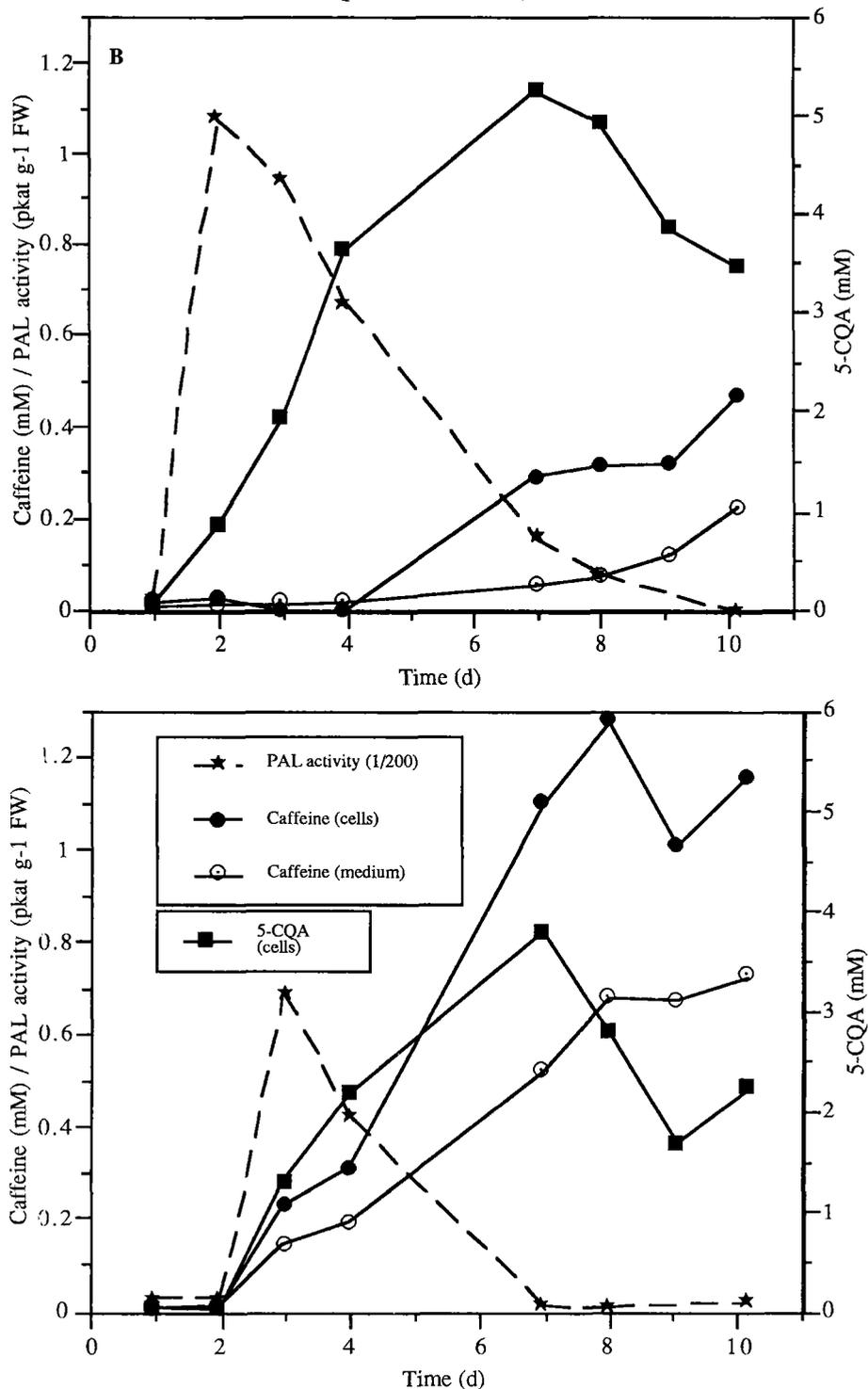


Fig. 3: PAL activity, 5-CQA, and caffeine in cell suspension cultures of *Coffea arabica* grown in the dark and treated with methyl jasmonate at day 0.

dark and with methyl jasmonate added (Fig. 3). Compared to Fig. 2B (induction by light) the maximum of PAL activity is lower and delayed by two days. 5-CQA as well as caffeine readily increase shortly after triggering of PAL. As a consequence of immediate induction final caffeine accumulation is twice as much as under light conditions. Again caffeine is compartmented by a factor of about 2. Also in this experiment using methyl jasmonate the interdependence between 5-CQA and caffeine metabolism is evident, though the induction pattern is distinctly different from that obtained by the light stimulus.

Finally, we studied light-induced secondary metabolism in a mutant coffee cell line devoid of caffeine and with very little 5-CQA when cultured in the dark. Fig. 4 shows that PAL is

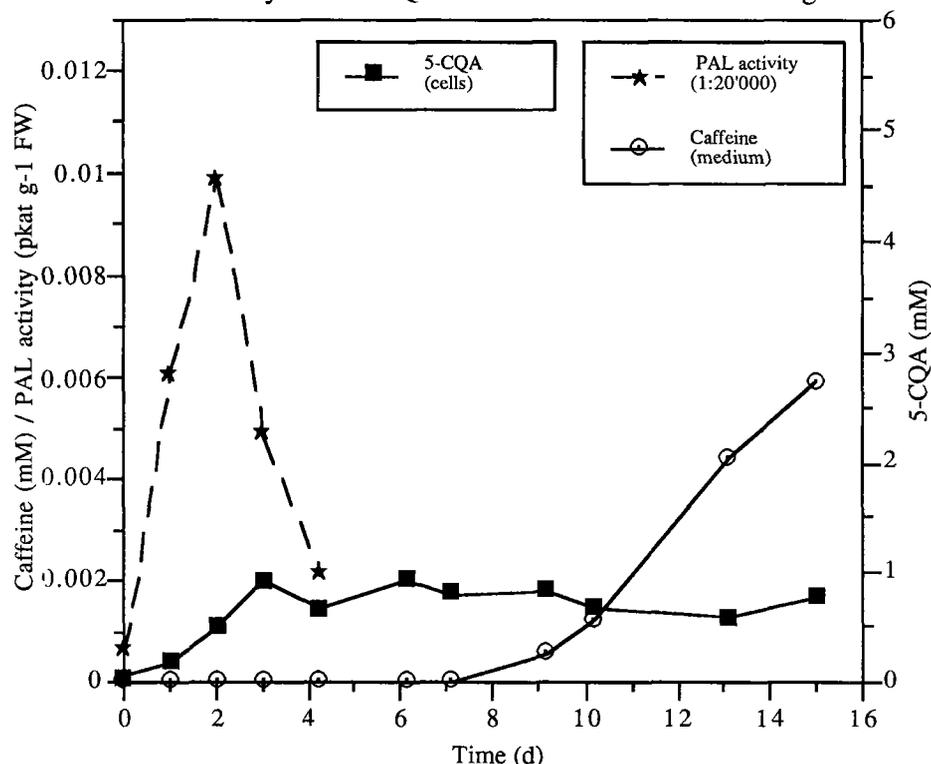


Fig. 4: PAL activity, 5-CQA, and caffeine in a mutant cell line of *Coffea arabica* exposed to light at day 0.

immediately induced by light to a value similar to the "normal" cell line (see Fig. 2B). However, 5-CQA, although readily formed thereafter, reaches only a low level. Hence, in this mutant cell line regulation of 5-CQA synthesis is altered at a step after PAL. Interestingly, caffeine is also induced, however, rather late and to a extremely small extent. Nevertheless, the link of formation between the two components is clearly seen.

Leaf development

The same parameters (PAL, 5-CQA, caffeine) were determined in leaves of three developmental stages along a side branch (Table 1).

Table 1. PAL activity, 5-CQA, and caffeine during development of foliage leaves of coffee plants (n=2-5). Same environmental conditions as for suspension-cultured cells grown in the light.

FW (mg)	PAL (pkat)		5-CQA		caffeine	
	per leaf	per g FW	$\mu\text{mol per leaf}$	mM	$\mu\text{mol per leaf}$	mM
63	41.5	659	5.5	87	4.1	65
160	19.0	119	10.6	66	6.2	39
1340	0.3	0.2	27.9	20	21.9	16

PAL activity is highest in the youngest leaf and decreases sharply during leaf expansion. Quite comparable to the cell culture system, absolute amounts of 5-CQA and caffeine increase during growth, but because of rapid biomass formation during leaf development the concentrations are much lower in the fully expanded than in the growing leaf. Like in suspension-cultured cells the concentration of 5-CQA is always higher than that of caffeine, and most strikingly they run in parallel, signifying again a mutual regulation.

Seed germination

The ungerminated coffee seed is characterized by a high concentration of 5-CQA, i.e. about 150 mM at a seed water content of 50 %. Considering the complex formation mentioned above we must assume that most of the seed caffeine (at a concentration of about 60 mM) as well as a large fraction of 5-CQA is trapped in the 5-CQA-caffeine complex. It is to be expected that by the water uptake during germination the concentrations of both 5-CQA and caffeine will drop resulting in a decrease of the complex concentration. This ultimately means increased "mobility" of the complex partners. Caffeine is known to be excreted by the primary root of the seedling (Baumann and Gabriel, 1984). To our knowledge neither PAL nor 5-CQA has been determined during this crucial period of coffee plant development. We measured these parameters as well as caffeine under various conditions of germination and in the different organs of the seedling. In the context of this report we shall concentrate on seedlings germinated in the light and especially on the cotyledons (Fig. 5) in which about 80-95% of the secondary compounds of the seedling are present. The concentration as well as the total amount (not shown) of 5-CQA starts to fall steeply after 5 weeks of germination and attains after a total of 7 weeks a value much lower than caffeine. This inverse situation appears to be unusual and may be explained by the extremely low PAL activity (less than 2 pkat.g⁻¹ FW; not shown) pointing to a minimized synthesis of phenyl propanes and 5-CQA. However, cinnamic acid derivatives are strongly demanded for cell wall "impregnation" and lignification during unfolding and mechanical stabilisation of the cotyledons. Therefore, we followed the time course of formation of cell wall-bound phenolics and found an inverse correlation to the 5-CQA content (not shown) suggesting the use of the latter for the synthesis of the former. The presence of considerable amounts of the lignin precursor ferulic acid (Fig. 5), possibly resulting of 5-CQA degradation, supports this view. In conclusion, the metabolic parallelism between 5-CQA and caffeine having been conserved in the seeds is disrupted during germination in favour of improved "mobility" of the complex partners, and this resulting in

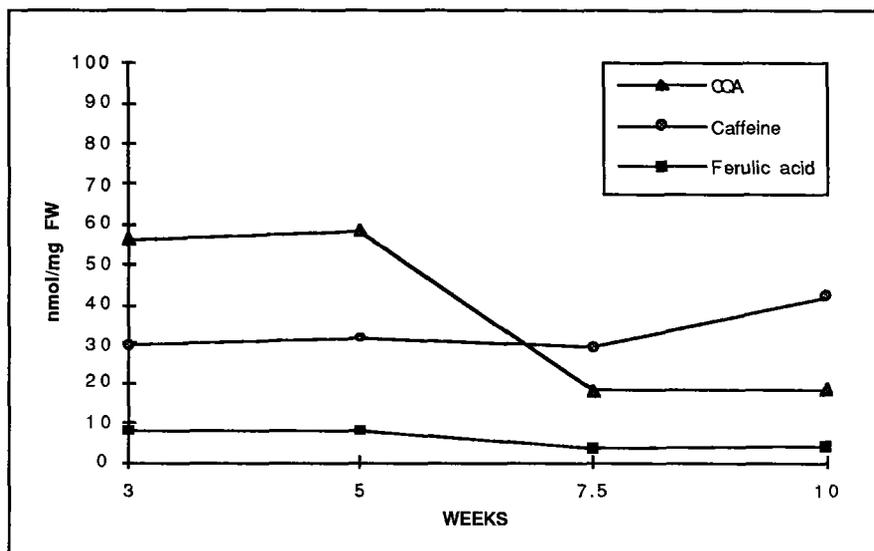


Fig. 5: Changes in secondary compounds in cotyledons of coffee seedlings during germination under photoperiod. The concentrations of 5-CQA, caffeine and ferulic acid in the cotyledons are shown.

facilitated transport of caffeine (e.g. excretion through the primary root) and in conversion of 5-CQA into cell wall phenolics.

Finally, a third kind of interdependence between caffeine and 5-CQA metabolism is known and effected by ethylene. Ethephon, an ethylene-generating compound, inhibits 5-CQA formation as well as caffeine accumulation in suspension-cultured cells (Schulthess et al., 1991). In place of caffeine the precursors theobromine and 7-methylxanthine are massively formed and accumulated. We speculate that this pattern of metabolic interdependence is also "realized" in situ, most likely in the pericarp of the ripening coffee berry known to be low in caffeine (Keller et al., 1972) as well as in 5-CQA (Clifford and Ramirez-Martinez, 1991), and to export caffeine (Baumann and Wanner, 1972) and presumably other purine alkaloids into the seed endosperm.

Material and Methods

Suspension-cultured cells. They grew in commercially available Murashige and Skoog medium (4.71 g/L; Flow Laboratories), supplement with (mg/L) sucrose (30,000), L-cysteine (10), thiamine (1), 2,4-D (1) and kinetin (0.2). The pH was adjusted to 5.7-5.8 with 1 N KOH. Cells (10 g) were usually subcultured at 2-week intervals in 60 ml medium and kept in a 250 ml Erlenmeyer on a gyratory shaker (90 rpm) at 26°C in the dark.

For the experiment, 3 g cells ready to subculture were mixed with 3 ml of medium in a 25 ml Erlenmeyer. Methyl jasmonate was added as a 10 % (v/v) solution in EtOH (30 µl). Control cultures received 30 µl EtOH. Then, all cultures were kept in the dark for 24 h. After this short precultivation one half of the cultures, consisting of either jasmonate-treated or control cells, were put into the light (9 h of photoperiod; 350 µE.m⁻².s⁻¹; 24°C) and the other half remained in the dark at 26°C. At intervals of 1 d cultures were harvested and analyzed for growth, PAL, 5-CQA and caffeine.

Growth of seedlings. Coffee seeds (*Coffea arabica* var. Catuai) were shortly sterilized with hypochloric acid and allowed to imbibe water for 5 days. Subsequently, the seeds were placed on

agar (0.8 %) in large test-tubes, and grown up to 10 weeks at 26°C and 30 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (13/11h L/D). At intervals, samples were taken and analyzed for PAL, 5-CQA and caffeine.

Extractions. Caffeine and 5-CQA were extracted by sonicating samples in 0.1 N HCl at 40-50°C for the appropriate time, i. e. 30 min for cell cultures and 4-6 h for cotyledons.

PAL, 5-CQA and caffeine determinations. Caffeine and 5-CQA were determined on a HPLC system consisting of a Hypersil ODS 5 μm column (100 x 2.1 mm, Hewlett Packard) and a Gynkotek diode array detector. The eluent system was 25 mM citric acid, pH 2.4 (1% tetrahydrofurane), with after 5 min a rise in methanol (1% tetrahydrofurane) from 0-65% over 22 min. PAL activity determinations were according to Schopfer and Mohr (1972). Cinnamic acid production was measured either by following changes in absorbance at 290 nm or by HPLC (6% acetic acid and 1.25 % acetonitrile, with a rise over 6 min to 20% acetic acid and 25% acetonitrile).

References

- Baumann TW, Wanner H (1972) *Planta* **108**,11.
Baumann TW, Gabriel H (1984) *Plant Cell Physiol.* **25**,1431.
Baumann TW, Röhrig L (1989) **28**,2667.
Baumann TW, Rodriguez MF, Kappeler AW (1991) *ASIC* **14**,465.
Carelli MLC, Lopes CR, Monaco LC (1974) *Turrialba* **24**,398.
Chassevent F (1972) *Café Cacao Thé* **26**,161.
Clifford MN, Williams T, Bridson D (1989) *Phytochemistry* **28**,829.
Clifford MN, Ramirez-Martinez JR (1991) *Food Chemistry* **40**,35.
El Hamidi A, Wanner H (1964) *Planta* **61**,90.
Gamborg OL (1967) *Can. J. Biochem.* **45**,1451.
Gorter K (1907) *Justus Liebig's Ann. Chem.* **358**,327.
Gundlach H, Müller MJ, Kutchan TM, Zenk MH (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**,2389
Horman I, Viani R (1972) *J. Food Sci.* **37**,925.
Kappeler AW, Baumann TW, Greutert H (1987) *ASIC* **12**,247.
Keller H, Wanner H, Baumann TW (1972) *Planta* **108**,339.
Kojima M, Uritani I (1973) *Plant Physiol.* **51**,768.
Martin R, Lilley TH, Falshaw CP, Haslam E, Begley MJ, Magnolato D (1987) *Phytochemistry* **26**,273.
Schopfer P, Mohr H (1972) *Plant Physiol.* **49**,8.
Schulthess BH, Wyss GS, Baumann TW (1991) *ASIC* **14**,601.
Sondheimer E, Covitz F, Marquisee MJ (1961) *Arch. Biochem. Biophys.* **93**,63.
Stöck W (1968) *Phytochemistry* **7**,1711.
Stöckigt J, Zenk MH (1974) *FEBS Letters* **42**,131.
Ulrich B, Amrhein N (1978) *Planta* **138**,69.
Ulrich B, Zenk MH (1979) *Phytochemistry* **18**,929.

Summary

PAL activity as well as 5-CQA and caffeine concentrations were measured in suspension-cultured cells, leaves, and seedlings of *Coffea arabica*. High PAL activity is associated with an increase in 5-CQA synthesis rapidly followed by caffeine accumulation in light- and methyl jasmonate-stimulated cell cultures. A similar interdependence was observed in young developing leaves. In contrast, cell suspensions grown in the dark exhibit low levels of all parameters measured. Moreover, during germination PAL activity of the cotyledons is almost not detectable, the concentration of 5-CQA drastically falls, and the level of caffeine remains more or less unchanged. In conclusion, the results show that caffeine formation is governed by the extent of 5-CQA accumulation.

UPDATED REVIEW OF PURINE AND PURINE ALKALOID METABOLISM IN *COFFEA* AND *CAMELLIA* PLANTS

G. R. WALLER¹, H. ASHIHARA², T. SUZUKI³

¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Oklahoma Agricultural Experiment Station, Oklahoma State University, Stillwater, OK 74078, U.S.A., ² Department of Biology, Faculty of Science, Ochanomizu University, Otsuka, Tokyo 112, Japan, and ³ Department of Applied Biology, Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Kyoto 606, Japan

INTRODUCTION

The occurrence of purine alkaloids, caffeine and other methylxanthines such as theobromine and theophylline (Fig. 1) in a variety of plants has played a major role in the long-standing popularity of products which contain caffeine; this is seen especially in non-alcoholic beverages and foods such as coffee, tea, soft drinks, cocoa, and chocolate products. According to Kihlman (1977), more than 60 plant species throughout the world contain caffeine; the most common are from the genera *Coffea*, *Camellia*, *Cola*, *Paullinia*, *Ilex*, and *Theobroma*.

This review is on the metabolism of purine alkaloids in coffee (*Coffea arabica*), and tea (*Camellia sinensis*), and supplements the reviews of Suzuki and Waller (1988) Waller *et al.* (1991) and Suzuki *et al.* (1992). Purine nucleotide metabolism in plants, including coffee, tea and maté (Ashihara, 1993) (Fig. 2), have caused substantial modification of our views on caffeine biosynthesis (Fig. 3).

DISTRIBUTION OF PURINE ALKALOIDS IN PLANTS

In leaves of *Camellia sinensis* and *C. taliensis* the caffeine content exceeds 2% dry wt. and theobromine content is below 0.2%, where *C. japonica* and *C. sasanqua* contain little or no purine alkaloids in the leaves. The major purine alkaloid in leaves of *C. irrawadiensis*, and *Ilex argentina* is theobromine (>0.5% dry wt), and little or no caffeine is present. Interspecific cross compatibility between *C. sinensis* and its 26 allied species in the genus *Camellia* and caffeine content in the hybrids have been reported.

The purine alkaloids in leaves of *Coffea arabica* and *Ilex paraguariensis* (maté) are similar to those in tea leaves. Tea flowers and *C. arabica* unripe fruits (pericarp and seeds) showed a similar alkaloid pattern, but a small amount of theophylline (<0.04% fresh wt) was also present in the pericarp of ripe *C. arabica* fruit. Even in the dry fruit of tea, the pericarp contains the most alkaloids (caffeine, 1-2% fresh wt; theobromine 0.05-

0.1%). There are also considerable amounts of purine alkaloids in the seed coat of tea and, to a lesser extent, the fruit stalk and the seed, although the seed traditionally has been viewed as caffeine-free.

	Trivial name	R ¹	R ³	R ⁷ or R
1	Xanthine	H	H	H
2	7-Methylxanthine	H	H	Me
3	1,3-Dimethylxanthine	Me	Me	H
4	3,7-Dimethylxanthine	H	Me	Me
5	1,7-Dimethylxanthine	Me	H	Me
6	1,3,7-Trimethylxanthine	Me	Me	Me
7	1,3,9-Tetramethyluric acid	-	-	-
8	0 ² ,1,9-Trimethyluric acid	-	-	H
9	0 ² ,1,7,9-Tetramethyluric acid	-	-	Me

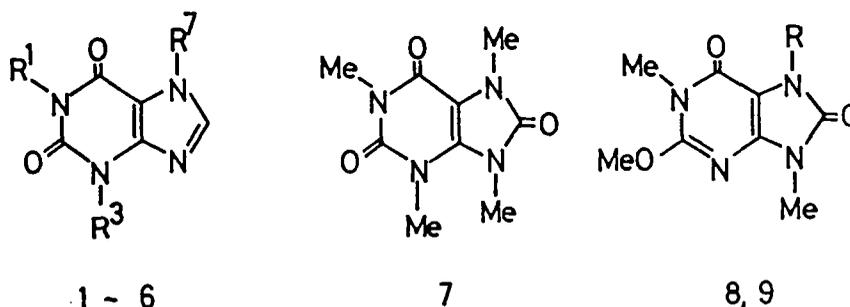


Figure 1 Structures of purine alkaloids in plants.

The seeds (beans) and leaves of *Coffea* species have been extensively analyzed and are known to contain large, and differing, amounts of chlorogenic acids, caffeine, and other compounds. Caffeine and chlorogenic acids have been reported as possible taxonomic criteria in seeds of the genera *Coffea* and *Psilanthus*, covering 20 species, within the tribe Coffeae. There are also significant quantities of caffeine (0.55-0.81% dry matter basis) in the beans of population A213 of *C. kianjavatensis*, one taxon of the *Mascarocoffea* and *C. lanciola* originally thought to be caffeine-free (Rakotomalala *et al.*, 1992). The same authors reported the absence of three populations of caffeine in *C. homoles* (A574, A743 and S2108) which indicates the biochemical diversity of those four taxa.

Besides theobromine, discovered in cacao beans in 1842, and theophylline, isolated from tea leaves in 1888, the third dimethylxanthine, paraxanthine (Fig. 1), was found in *Coffea arabica* seedlings in 1980. and in

in vitro cultures in 1982. The list of purine alkaloids has been extended by the discovery of three methyluric acids (Fig. 1) in the genus *Coffea* leaves and seeds (Kappler and Baumann, 1986), although 1,3,7,9-tetramethyluric acid was first reported in extracts of tea leaves in 1937 (Johnson, 1937). A monomethylxanthine called heteroxanthine and identified as 7-methylxanthine (Fig. 1) was also discovered in the sap of *Beta vulgaris* earlier (Bresler, 1904).

An alternative route to obtain natural coffee with a lower caffeine content might be the hybridization of *C. arabica* with other species that possess lower caffeine content (Mazzaferro and Carvalho, 1991).

• CAFFEINE BIOSYNTHESIS AND ONE-CARBON METABOLISM

Anderson and Gibbs (1962), Inoue and Adachi (1962) and Nazario and Lovatt (1991 and 1993) showed that the methyl group of methionine and other C₁ compounds such as formate, bicarbonate, formate and HCHO can serve as methyl group donors for caffeine biosynthesis. L-[Methyl-¹⁴C]methionine has been repeatedly employed as the most effective methyl donor for caffeine biosynthesis (Suzuki and Takahashi, 1977). The synthesis of *S*-adenosylmethionine (SAM) from methionine and its participation in caffeine synthesis in tea leaves were reported by Suzuki (1972). Enzymic introduction of the caffeine methyl group from SAM has now been well established in tea and *C. arabica* (Suzuki and Takahashi, 1975; Roberts and Waller, 1979; Negeishi *et al.* 1985a and 1985b) as well as in *in vitro* cultures of *C. arabica* (Baumann *et al.*, 1983 and Waller *et al.*, 1980, 1983) (Fig. 3).

CAFFEINE BIOSYNTHESIS AND PURINE METABOLISM

Although purine metabolism in higher plants essentially resembles that in microorganisms and animals (Suzuki and Takahashi, 1977; Ross, 1981; Wasternack, 1982; Wagner and Backer 1992), its regulation and mechanism in tea and coffee plants may differ from those in other organisms. In tea and *Coffea arabica*, *Ilex paraguariensis* (maté) caffeine is synthesized from xanthosine via 7-methylxanthosine, 7-methylxanthine and theobromine, and SAM is the source of the methyl groups (Fig. 2) (Negeishi *et al.*, 1985c, 1988, 1992; Suzuki and Waller, 1988; Suzuki *et al.*, 1992).

Purine and nucleic acid metabolism in caffeine biosynthesis in tea has been reported, the following compounds being used: L-[Methyl-¹⁴C]methionine and precursors of purine biosynthesis *de novo*, such as ¹⁴CO₂, and [1-¹⁴C]glycine, [¹⁴C]-methylamine and glutamic acid γ -[¹⁴C]-methylamide (which is considered to be metabolized as a C₁ compound via methylamine and HCHO) are also effective precursors of the biosynthesis of RNA purines and of purine alkaloids in tea leaves. Purine bases, such as [8-¹⁴C]hypoxanthine, [8-¹⁴C]adenine and [8-¹⁴C]guanine, and the nucleosides can serve as precursors of caffeine.

Caffeine biosynthesis from adenine nucleotides in tea

The purine ring of caffeine in tea leaves is synthesized by the same pathway as in purine biosynthesis *de novo*; this was initially shown by Preusser and Serenkov (1963). Among exogenously administered purine bases, adenine is the most effective precursor for the biosynthesis of caffeine, and in plant cells, levels of adenine nucleotides are usually much higher than those of guanine nucleotides. Among free purine derivatives, AMP is the major component in green tea products followed by ADP and GMP, these data may in part reflect those obtained from fresh leaves. Compared with guanine nucleotides, adenine nucleotides are more effective precursors for the synthesis of caffeine (Figs. 2 and 3).

Caffeine biosynthesis from guanine nucleotides in tea

In bacteria and mammals, GMP is converted to IMP by the action of GMP reductase, but there appears to be no evidence for the presence of a GMP reductase in plants (see Fig. 2). In tea shoot tips, exclusive incorporation of exogenously administered [8-¹⁴C]guanine into the GMP of RNA have been obtained, thus, the conversion of GMP into IMP catalysed by GMP reductase is not an important reaction in tea and xanthosine is not likely derived from GMP via IMP and XMP for caffeine biosynthesis (Fig. 2). The biosynthesis from administered [8-¹⁴C]guanosine in tea leaves has been shown (Fig. 3) and the activity of guanosine deaminase was detected in the leaves.

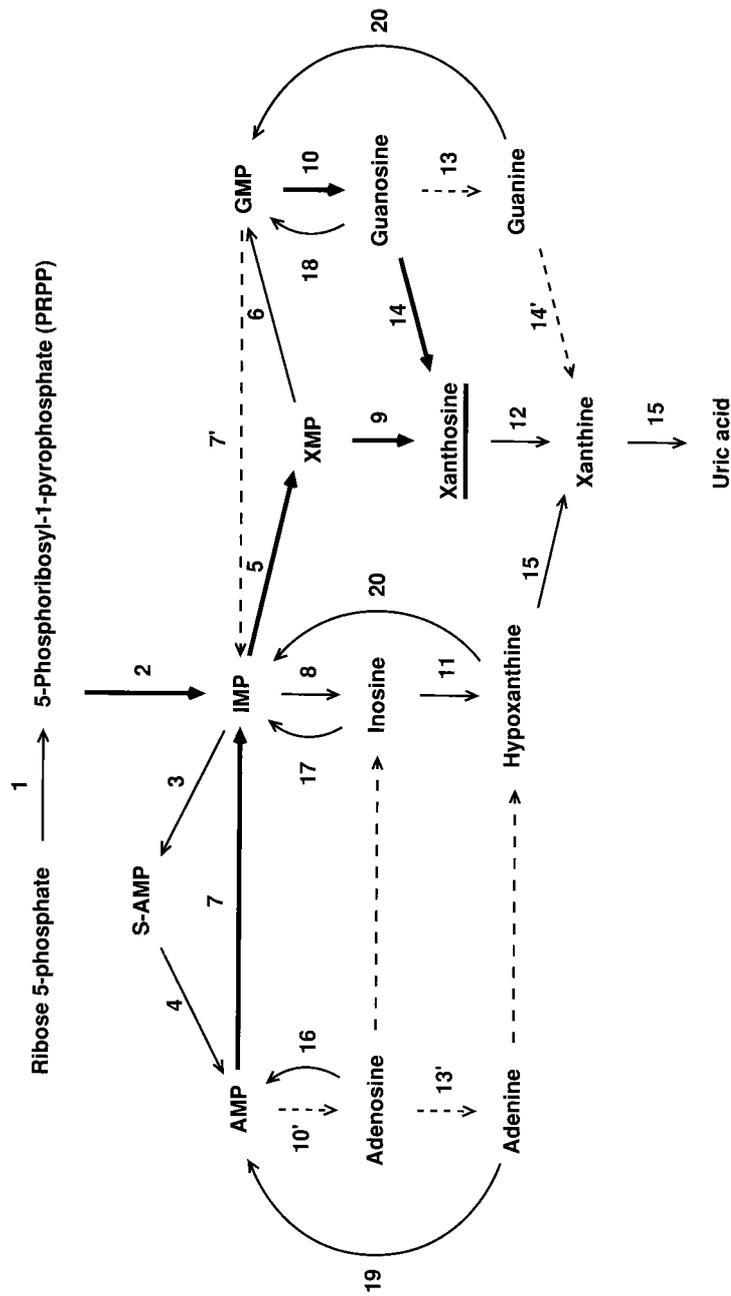


Figure 2. Suggested pathways of Purine Metabolism in Coffee (*C. arabica*) and Tea (*Camellia sp.*).

The numbers refer to the following enzymes or sequences of enzymes. 1, 2: PRPP synthetase and enzymes of purine biosynthesis *de novo*. 3: S-AMP synthetase. 4: S-AMP lyase. 5: IMP dehydrogenase. 6: GMP synthetase. 7: AMP deaminase. 7: GMP reductase. 8, 9, 10, 10': 5'-Nucleotidase. 11, 12, 13: Purine nucleosidase. 13': Adenosine nucleosidase and/or purine nucleosidase. 14: Guanosine deaminase. 14': Guanine deaminase. 15: Xanthine dehydrogenase. 16: Adenosine kinase. 17, 18: Inosine-guanosine kinase. 19: Adenine phosphoribosyltransferase. 20: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase.

Caffeine biosynthesis from guanine nucleotides in coffee

The biosynthesis of caffeine and purine metabolism in coffee are fewer, compared with those in tea, and relate largely to *Coffea arabica* (Fig. 3). As in tea, the purine ring of caffeine in coffee is synthesized by the same pathway as in purine biosynthesis *de novo*, which was shown in *C. arabica*, leaves by Anderson and Gibbs in 1962. In *C. arabica* fruits, exogenously administered adenine and guanine are effective precursors for caffeine biosynthesis; they may be converted into purine nucleotides (AMP and GMP) by reactions catalysed by adenine phosphoribosyltransferase and hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, as in tea leaves (Fig. 2). However, the pathway leading to the formation of xanthosine from these purine nucleotides remains to be characterized in *C. arabica*. By contrast, xanthine cannot serve effectively as the direct precursor for the caffeine purine ring, and is catabolized by the conventional purine degradation pathway via uric acid in tea and *C. arabica* (Fig. 3), although evidence by Nazario and Lovatt (1991 and 1993) shows xanthine to be a precursor of caffeine in coffee leaves.

Although the methylation of xanthosine to 7-methyl-xanthosine is the first step of a series of methylations in the pathway for caffeine biosynthesis, xanthosine is also catabolised by a purine degradation pathway via xanthine (Fig. 3). Nazario and Lovatt (1991, 1993) proposed that caffeine, theophylline, and theobromine are end products of two separate pathways in leaves of *Coffea arabica*.

Xanthosine metabolism for caffeine biosynthesis

In higher plants, several lines of evidence suggest the presence of purine biosynthesis *de novo* and salvage pathways (Suzuki *et al.*, 1992). Most plants possess activity of several purine salvage enzymes; generally, activities of adenine phosphoribosyltransferase and adenosine kinase are higher than those of other salvage enzymes such as hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase and inosine-guanosine kinase (Fig. 1). Therefore, plant cells readily synthesize purine nucleotides when purine nucleosides and bases, especially adenosine and adenine, are supplied exogenously. This is probably why, among exogenously administered purine bases, adenine is the most effective precursor for the biosynthesis of caffeine in tea and *C. arabica*. There is also evidence that purine biosynthesis *de novo* and salvage reactions are compartmentalized separately in tea shoot tips. Although the two compartment model of metabolism was described by Waller *et al.*, (1991) some studies have indicated that some of the critical enzymes of purine salvage [adenine phosphoribosyltransferase, adenosine kinase and phosphoribosylpyrophosphate (PRPP) synthetase] are in the mitochondria and in chloroplasts.

Salvage pathways may not actually function within the cells of tea and coffee plants, because of the lack of data on whether or not adenine and adenosine are products of degradation of adenine nucleotides by the cells. Although xanthosine production is due to turnover of purines during normal metabolism of nucleotides and nucleic acids, one must also consider that the purine rings of caffeine are produced directly by the pathway of purine biosynthesis *de novo* via IMP and XMP (Fig. 3). Xanthosine is utilized as the precursor for caffeine biosynthesis, but it is also catabolized by the purine degradation pathway via xanthine in tea and *Coffea arabica* (Fig. 3).

Among 11 enzymes that participate in the conversion of ribose-5-phosphate to IMP in the purine biosynthesis *de novo*, a few have been isolated and characterized in normal plant tissues and in nitrogen-fixing nodules, producing ureides (Suzuki *et al.*, 1992). In species forming caffeine, only PRPP synthetase has been detected in leaves and flowers of tea plants. From both enzymic and metabolic studies, possible control steps of the pathway of purine biosynthesis *de novo* in plants are reactions catalysed by PRPP synthetase and/or PRPP amidotransferase and (Fujimori *et al.*, 1991). Inhibition of PRPP amidotransferase by AMP is likely to be of importance.

There are no reports on the localization of purine biosynthesis and purine alkaloid biosynthesis in tea and coffee plants. The regulatory mechanism of the pathway of purine nucleotide synthesis *de novo*, and regulation of IMP partitioning into adenine and guanine nucleotides and into caffeine (via XMP and xanthosine), and of xanthosine partitioning into caffeine (i.e. 7-methylxanthosine biosynthesis) and into xanthine (purine degradation) remain to be elucidated (Fig. 3).

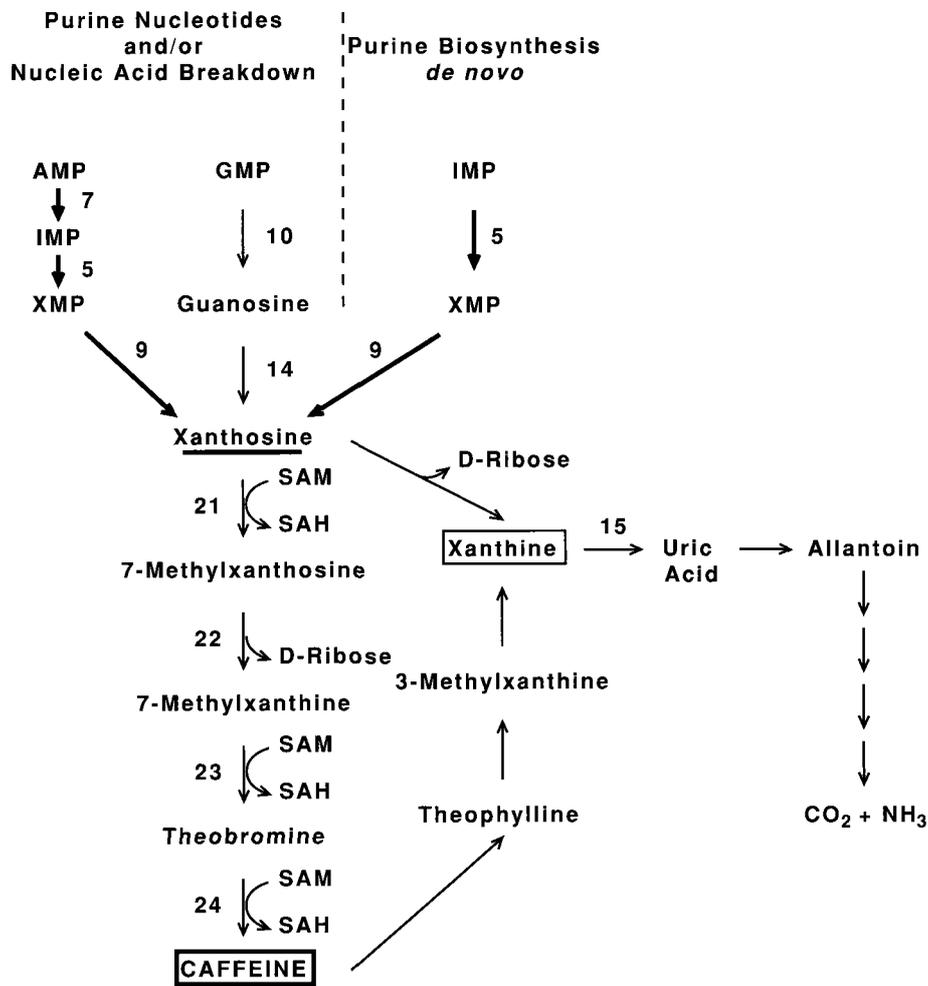


Figure 3. Probable Main pathways for the Metabolism of Caffeine in *Coffea arabica*, (coffee), *Camellia* species (tea) and *Ilex paraguariensis* (maté) through Purines and Purine Nucleotides.

The numbers shown for enzymes are the same as those for Figure 2 and the following enzymes are added: 21: SAM: xanthosine *N*-methyltransferase. 22: *N*-Methylxanthosine nucleosidase. 23: SAM: 7-methylxanthine *N*-methyltransferase. 24: SAM: theobromine *N*-methyltransferase. Abbreviations: S-AMP: S-Adenosylsuccinic acid. SAM: S-Adenosylmethionine. SAH: S-Adenosylhomocystine.

CAFFEINE BIOSYNTHESIS *IN VITRO*

Methyl groups are transferred from SAM to xanthosine, yielding 7-methylxanthosine, which undergoes further methylations via 7-methylxanthine and theobromine to caffeine (Fig. 3). Separation of the *N*-methyltransferases involved in caffeine biosynthesis has not yet been successful (Fujimori *et al.*, 1991). The products formed from 7-methylxanthosine were first identified as theobromine, and then D-ribose and 7-methylxanthine when 7-methylxanthosine was incubated with extracts of unripe *C. arabica* fruit; thus confirming the formation of 7-methylxanthosine through the action of nucleosidase (nucleoside ribohydrolase), but not or purine nucleoside phosphorylase.

Negishi *et al.*, (1988) detected *N*-methylnucleoside ribohydrolase (*N*-ribosyl-*N*-methylpurine nucleosidase), which catalyses hydrolysis of 7-methylxanthosine to produce 7-methylxanthine, in tea leaf extracts and separated it from adenosine nucleosidase by DEAE-cellulose column chromatography. Among purine and *N*-methylpurine nucleosides, 3- and 7-methylpurine nucleosides were hydrolysed preferentially by *N*-methylnucleoside ribohydrolase. Adenosine nucleosidase could not catalyse the hydrolysis of 7-methylxanthosine, although the enzyme showed high activity towards 7-methylxanthosine. Negishi *et al.* (1988) suggested that *N*-methylnucleoside ribohydrolase catalyses the hydrolysis of 7-methylxanthosine in the pathway of caffeine biosynthesis, whereas adenosine nucleosidase is not directly concerned with it.

Paraxanthine or theophylline may be able to serve as effective precursors of caffeine if the reduction of *N*-methyltransferases for the normal pathway through theobromine occurs in *C. arabica* (Fig. 3). The contrast between normal and alternative pathways are shown in Fig. 4 (Roberts and Waller, 1979 and Waller *et al.*, 1980). The routes from xanthosine $\xrightarrow[\text{SAM}]{\text{SAH}}$ 1-methylxanthosine $\xrightarrow{\text{Ribose}}$ 1-methylxanthine which serve as precursors for paraxanthine and theophylline have not yet been elucidated.

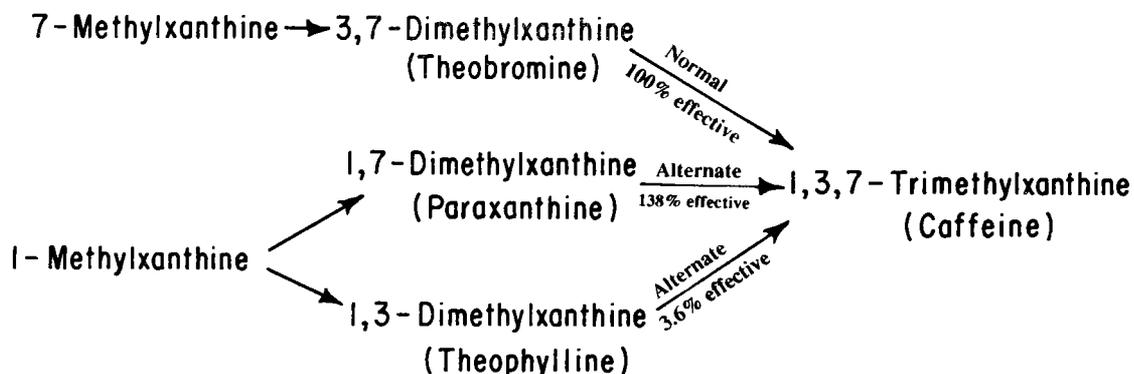


Fig. 4 Alternative pathways for biosynthesis of caffeine in *C. arabica* (Roberts and Waller, 1979).

CAFFEINE METABOLISM IN *COFFEA*

Biodegradation of caffeine to xanthine, which is further metabolized by the purine degradation pathway via uric acid, was first shown to occur slowly in ageing leaves of *Coffea arabica* by Kalberer (1965); theophylline and theobromine have been identified as the first degradation products in immature and mature *C. arabica*

fruits. For [8-¹⁴C]theophylline, the biodegradation products are 3-methylxanthine, allantoin, allantoic acid, urea, and an unknown compound, but not 1-methylxanthine (Fig. 3). Although the catabolism of caffeine has not been studied enzymatically, we postulate that the breakdown of caffeine may go through the oxidation of the methyl groups, but it is unlikely to go through demethylation.

Further, the appearance of theophylline in the pericarp of ripe fruit may be due to a slow down of catabolism of this alkaloid at the mature fruit stage. These results indicate that: (a) active synthesis of caffeine occurs mainly during the green stage of *C. arabica* fruit development through methylation of 7-methylxanthine and theobromine, and (b) slow degradation of caffeine occurs primarily through the demethylation of theophylline, which accumulates after the fruit is full size and proceeds to ripen. Ludovic de Romero and Waller (1988) recovered *N*-formyl-2-oxo-4-imidazolidinyl carboxamide or C₅H₇N₃O₃ from [8-¹⁴C] theophylline isolated from leaves, stems, and fruit of coffee trees; it was proposed that an alternative degradation pathway of theophylline and caffeine, or that a new ureide could be formed from theophylline (Fig. 5).

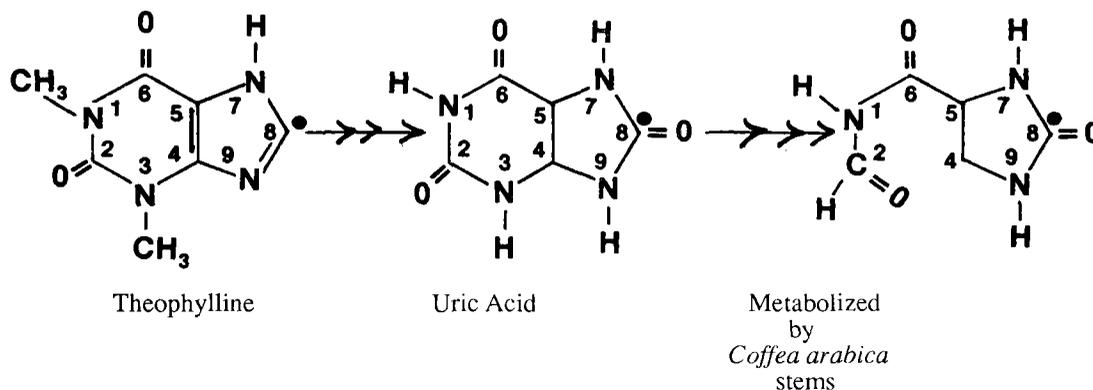


Fig. 5. Suggested Pathway Producing C₅H₇N₃O₃ from Theophylline through Uric Acid.

• - Shows the radioactive carbon.

Caffeine biodegradation to xanthine also takes place in immature fruits of other *Coffea* spp. (Mazzafero *et al.*, 1991) [8-³H]Caffeine was metabolized relatively slowly by immature endosperm of *C. arabica* and *C. canephora*. In contrast, *C. dewevrei*, *C. eugenioides*, *C. stenophylla*, *C. salvatrix* and *C. bengalensis* all degraded [8-³H]-caffeine more rapidly, since the percentage recovery of the label was much lower and there was more extensive incorporation of radioactivity into theobromine, theophylline, 3-methylxanthine, and two unidentified polar metabolites. These metabolic data as well as the endogenous caffeine concentrations indicate that the rate of turnover of caffeine in the various species of *Coffea* may differ markedly.

As in *C. arabica* fruits, metabolism of theobromine and caffeine in its leaves appears to be closely associated with leaf development and ageing. In buds and developing leaflets of *C. arabica*, production and accumulation of the alkaloids were most active, and then the alkaloid contents decreased in the fully expanded leaves. In ageing leaves caffeine breakdown increased, leading to alkaloid-free leaves at the time of leaf-fall. In agreement with these results, tracer experiments using [8-¹⁴C]adenine have indicated that active synthesis of the alkaloids from [8-¹⁴C]adenine occurs in *C. arabica* only in developing leaves (Ashihara and Fujimori, 1993).

A very interesting report at the 15th Int. Scient. Colloq on Coffee was made by Baumann *et al.*, (1993) who proposed that a metabolic relationship between chlorogenic acid and caffeine might exist. Of course, the two compounds have biosynthetic pathways which are quite different, with the amino acid phenylalanine serving as the precursor of chlorogenic acid. The authors found that formation of caffeine and chlorogenic acid parallels each other during seed germination, leaf development, and growth of suspension culture cells, and

indicated that the coffee plant vacuoles contain the bulk of the two compounds. The formation and accumulation of chlorogenic acid was found to be a prerequisite for sustained caffeine biosynthesis. Inhibition of chlorogenic acid biosynthesis blocks caffeine biosynthesis when an early caffeine precursor was present whereas induction of chlorogenic acid biosynthesis triggers caffeine formation. We wait for this remarkable finding to be confirmed and extended.

In a recent article by Ashihara and Fujimori (1993) found that the biosynthesis of caffeine from adenine occurs only at the very early stages of development. One of the most likely limiting factors in the biosynthesis is the activity of the *N*-methyltransferases.

In contrast, caffeine, theobromine, and theophylline were proposed as end products of two separate pathways in leaves of *C. arabica*. Of interest was the detailed report by Nazario and Lovatt (1993) at the *15th Int. Scient. Colloq. on Coffee* on the biosynthesis of theophylline, theobromine, and caffeine in leaves of *C. arabica* plants from Puerto Rico explaining just how the route was different from the pathway presented in Fig. 3. The reader of this article is encouraged to read the paper presented in this treatise for more information on the conflicting pathways.

CAFFEINE AND PURINE METABOLISM IN *CAMELLIA*

The seasonal fluctuations in the caffeine content of tea leaves under Kenyan conditions (Owuor, 1991; Owuor and Charanji, 1986) were not as large as those observed in Malawi (Cloughley, 1982). This is primarily because the seasonal mean temperature variations are not large under Kenya tea-growing conditions. By contrast, the purine alkaloid levels in tea leaves decreased markedly in August and in October and November in Japan, while total nitrogen increased appreciably in November and December. These results suggest metabolism and/or translocation of the alkaloids in autumn, which remains to be characterized, and the absence of any role for the alkaloids in the storage of nitrogen in winter.

The marked fluctuation in purine and purine alkaloid metabolism occurring throughout the year has been observed. Seasonal variations in the metabolic fate of adenine nucleotides prelabelled with [8-¹⁴C]-adenine were examined in leaf disks prepared at one-month intervals, over the course of one year, from the shoots of tea shrubs growing under natural field conditions. Incorporation of radioactivity into nucleic acids and catabolites of purine nucleotides was found throughout the experimental period, but incorporation into theobromine and caffeine was found only in the young leaves harvested from April to June. While significant activity of all three relevant *N*-methyltransferases was found in cell-free preparations from the leaves harvested in April and May

Table 1. Seasonal changes in the levels of activity of *N*-methyltransferases involved in the biosynthesis of caffeine and of 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP) synthetase in tea leaves (Fujimori *et al.*, 1991).

Sampling time	<i>N</i> -Methyltransferase activity (pkat g ⁻¹ fr. wt)			PRPP synthetase activity (pkat g ⁻¹ fr. wt)
	Xanthosine	7-Methylxanthine	Theobromine	
April	18 ± 2	288 ± 3	30 ± 2	1115 ± 45
May	13 ± 3	195 ± 13	20 ± 3	763 ± 72
June	<1	15 ± 2	<1	67 ± 3
July	nd	<1	nd	73 ± 27
August	nd	nd	nd	42 ± 10

The enzymatic activities are expressed as pkat g⁻¹ fr. wt. Samples were harvested on the first day of every month. The average values and s.d. were obtained from more than six assays using two different samples. nd: not detected.

(Table 1), these activities disappeared completely from the leaves in July and August. In contrast, the activity of PRPP synthetase was still detectable in July and August. These results show that the biosynthesis of caffeine occurs in young leaves during the early stages of shoot development (April to June) and that one of the most important limiting factors for the synthesis of caffeine is the activity of various *N*-methyltransferases. Therefore, during the growing season, induction and repression of these enzymes may be presumed to provide the primary mechanism for control of the biosynthesis of caffeine in tea leaves (Fujimori *et al.* 1991). In contrast, during the resting period, the pathways for purine metabolism in tea leaves are generally similar to those in other plant organs (Fig. 2), as described in part by Ashihara and Kubota (1987) and Suzuki *et al.* (1992).

Metabolism of purine alkaloids also appears to be closely associated with leaf development and ageing in tea seedlings. An analysis for purine alkaloids in different parts of four-month-old tea seedlings showed that more than 99% of the caffeine detected was in the leaves, with the amount expressed per gram of fresh weight being higher in older leaves. Theobromine was found only in younger leaves, and theophylline in zero or only trace amounts in the seedlings. Tracer experiments using [8-¹⁴C]adenine indicated that: (a) active synthesis of theobromine and caffeine from [8-¹⁴C]adenine occurs only in younger leaves and caffeine accumulates there, (b) salvage of [8-¹⁴C]adenine for nucleic acid synthesis takes place in all parts of the seedlings, and (c) considerable degradation of [8-¹⁴C]adenine by conventional purine degradation pathway via uric acid occurs in roots and lower parts of stem tissue.

In *Coffea arabica* caffeine is synthesized in the pericarp, transported to the seeds, and accumulated there during fruit development, and even transport from leaf to leaf has been demonstrated by application of doubly labelled caffeine (Baumann and Wanner, 1972). By contrast, flower buds of new shoots of tea bushes appear in August, and their fresh weight increases until October when the bush is in blossom. The amounts of caffeine in the flowers increased substantially until October while that of theobromine changed only slightly. Tracer experiments using [8-¹⁴C]adenine showed that caffeine is synthesized and accumulated in stamens and petals, and the potential for biosynthesis is somewhat higher in the flower buds than it is in flowers. These results indicate that the decrease in the alkaloids in tea leaves in autumn is probably not due to translocation of the alkaloids to the flowers.

Nishimura and Ashihara (1993) isolated IMP dehydrogenase (Fig. 2 and 3) from tea leaves of *Catharanthus roseus* cells and found that purine nucleotides, especially GMP, inhibit the activity of the enzyme but metabolites, hypoxanthine, xanthosine, and caffeine related to the biosynthesis of caffeine had little effect on the activity of the enzyme from either source.

The patterns of distribution of purine alkaloids in flowers of the various *Camellia* species are the same as those in the leaves of such plants. These results indicate that *Camellia* plants can be classified into three types with respect to the accumulation of purine alkaloids: (i) caffeine-accumulating plants (e.g. *C. sinensis*); (ii) theobromine-accumulating plants (e.g. *C. irrawadiensis*); and (iii) plants that do not accumulate purine alkaloids (*C. japonica* and *C. sasanqua*). The metabolism of [8-¹⁴C]adenine in isolated stamens and petals from the flower buds of four different species of *Camellia* revealed that the pathway from theobromine to caffeine does not operate in flowers of *C. irrawadiensis*, while the entire biosynthetic pathway for purine alkaloids is not functional in flowers of *C. japonica* and *C. sasanqua*, as it is in leaves of these *Camellia* plants.

PURINE ALKALOIDS IN CULTURED CELLS

Purine alkaloid formation in tea callus cultures was first reported by Ogutuga and Northcote (1970a,b) and then by Tsushida and Doi (1984). Using *in vitro* *Coffea arabica* cultures, Keller *et al.*, (1972) made the first observation of caffeine production. Caffeine is formed by *C. arabica* cultures in amounts as high as in the plant, but the productivity of cultured tea cells is by far lower than that of *C. arabica* cells. In cultured *C. arabica* cells, caffeine may well be synthesized by the same biosynthetic pathway as in the plant (Fig. 2). Theophylline and paraxanthine, which are present in the plants only in minute quantities are often found in *in vitro* cultures of *Coffea* species; this appears to represent misdirection of secondary metabolism as compared with that in intact plants, or a high capacity for caffeine catabolism. Further, caffeine and theobromine tend to

be released more into the medium, but caffeine is also accumulated intracellularly to some extent and this is correlated with the 5-O-caffeoyl ester of quinic acid concentration in the cells of *C. arabica* (Baumann and Röhrig, 1989; Baumann *et al.*, 1992). Little is known about cellular aspects of metabolism and storage of purine alkaloids in these intact plant tissues.

Purine alkaloids in plants may have ecological significance, by influencing the interrelation between organisms or by improving adaptation to unfavourable environmental conditions. Thus, introducing stress into *in vitro* cultures may improve the production of purine alkaloids. Certain stress-producing agents, such as high light intensity or high NaCl concentration (depending on the culture type), were shown to stimulate caffeine production in suspension cultures of *C. arabica* (e.g. Frischknecht and Baumann, 1985). The same holds for plant hormones (Prenosil *et al.*, 1987; Furuya *et al.*, 1989; Schulthess *et al.*, 1991). Further, biotransformation of theobromine to caffeine in other suspended (Baumann, 1986) or immobilized *C. arabica* cells, as well as biotechnology of such conversion, has also been reported. Caffeine production in this way from paraxanthine, which is a more effective precursor for caffeine biosynthesis *in vitro*, has not been studied (Furuya, T., private communication).

POSSIBLE ROLES AND OTHER ASPECTS OF PURINE ALKALOID FORMATION IN PLANTS

The physiological significance as well as the ecological function of purine alkaloids in plants should be examined in individual plants, because patterns of metabolism and accumulation differ within the plant, even a particular tissue (Suzuki and Waller, 1988). In tea leaves, caffeine is involved in active metabolism and accumulation and/or transport and its biosynthetic pathway does not replace the purine degradation pathway (Fig. 2). However, shed flowers (petals and stamens) and dry fruit (pericarp and fruit stalk) of tea after flowering and ripening contain considerable amounts of caffeine, indicating that caffeine is an inert end product in these tissues. The purine alkaloids in the seed coats of tea seeds have no nutritive function as nitrogen reserves, but they are allelopathic and autotoxic, i.e. inhibit the growth of germinating tea seedlings. Thus the coat of a tea seed, which is more highly developed than that of coffee, functions as a good reservoir of the toxic alkaloids, and prevents autotoxic hazards from becoming effective during fruit development (seed formation) as well as germination. Similar autotoxic reactions in coffee seeds during germination and their ecological and agricultural significance have been described by Waller *et al.* (1989).

Under natural circumstances, coffee fruits drop after ripening, and then some seeds germinate and grow. Purine alkaloids in the pericarp and seeds function as allelochemical. Similarly, ecological roles of the alkaloids in coffee plants, i.e. as naturally occurring pesticides and sterilants, have been demonstrated (Mazzafero, 1991; Rizvi *et al.*, 1980).

The developmental stage, seasonal changes, other environmental factors and agricultural methods used, influence the plant growth and thereby the caffeine content. Caffeine levels in tea leaves increase with the growth of the plant, which is affected by nitrogen fertilization and pruning (which enhances regrowth), whereas treatment in the shade shows little or no effect. Harvesting the tea leaves at longer intervals shows a decrease in caffeine content; the younger leaves when compared to the older ones contain higher caffeine levels. Moreover, the older literature as well as more recent articles on post-harvest physiology of tea and coffee processing indicate that the withering of tea leaves in black tea manufacturing as well as the early processing of coffee beans brings about an increase in the caffeine content with a concomitant loss of ribonucleic acids. Thus, caffeine increase appears to result from the breakdown of nucleic acids (Suzuki *et al.*, 1992).

Finally, although there is still no good understanding of the physiological significance of purine alkaloids in plants, this should be considered from the viewpoint not only of nitrogen metabolism, such as that of purines and nucleic acids but also of one-carbon metabolism, including SAM biosynthesis and transmethylation-demethylation reactions.

CONCLUSION

The occurrence of purine alkaloids in leaves, flowers, fruits and/or seeds of plants (e.g. coffee, tea, cola, guarana, maté, and cacao) has been established, but little is known about the localization of the alkaloids within

particular tissues, or within specific organelles. Such subcellular aspects regarding the biosynthesis, and accumulation of the alkaloids as well as the regulating mechanisms also remain obscure, although the overall pathways of purine alkaloid metabolism (anabolism and catabolism) in tea and coffee plants are now elucidated (Fig. 2 and 3). In other plants (i.e. cacao, cola, maté, and guarana), little is known about the metabolic pathways. Purine metabolism in plants essentially resembles that in microorganisms and animals, but there is also evidence for differences such as deamination of adenosine, which is not widespread in plants. The methyltransferases and a nucleosidase involved in caffeine biosynthesis (which have been studied only with partially purified enzyme preparations) but also *N*- and *O*-demethylases involved in caffeine biodegradation represent possible regulatory control of these purine alkaloids. Further, the majority of caffeine-containing plants have in common that they grow in tropical or subtropical countries; notable exceptions are tea (which also grows in the temperate zone, as in China and Japan) and the common stork's-bill *Erodium cicutarium* (which grows in Europe as far north as the Scandinavian countries and contains a small amount of caffeine) [van Eijk, 1952]. Seasonal variations of the levels of purine alkaloids in tea plants grown in Japan and other countries are now known. Factors influencing caffeine metabolism and accumulation and the mechanisms thereof are interesting subjects to be studied by the plant scientist. These studies should make the physiological significance or role of purine alkaloids in plants clearer. The number of purine alkaloids has recently been extended by the discovery of methyluric acids in *Coffea* species; the presence of caffeine in citrus flowers and leaves has also been reported. We anticipate that new purine alkaloids will be identified as caffeine metabolites in caffeine-containing plants and new plants will be found to contain purine alkaloids (Suzuki *et al.*, 1992).

Acknowledgements--This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research (No. 01540560) from the Ministry of Education, Science and Culture, Japan, and research grants from the Sapporo Bioscience Foundation, the Moritani Scholarship Foundation and the Scandinavia-Japan Sasakawa Foundation. Published with the approval of Oklahoma Agricultural Experiment Station, Oklahoma State University, Stillwater, OK, U.S.A.

REFERENCES

- Anderson, L. and Gibbs, M. 1961. *J. Biol. Chem.* 237:1941.
- Ashihara, H. 1993. *Phytochemistry*, in press.
- Ashihara, H. and Kobota, H. 1987. *Plant Cell Physiol.* 18:535.
- Ashihara, H. and Fujimori, N. 1993. In: *15th Int. Scient. Colloq. Coffee*, Montpellier, June 6-11, p. 767-769, ASIC, Paris.
- Baumann, T. W. 1986. In: *11^e Coll. Sci. Int. sur le Cafe, Romé.* (1985), pp. 55-68, ASIC, Paris.
- Baumann, T. W. and Frischknecht, P. M. 1988. In: Vasil, I. K. (ed) *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. 5. Academic Press, Orlando, FL, pp 403.
- Baumann, T. W. and Röhrig, L. 1989. *Phytochemistry* 28:2667.
- Baumann, T. W. and Wanner, H. 1972. *Planta* 108:11.
- Baumann, T. W., Koetz, R. and Morath, P. 1983. *Plant Cell Rep.* 2:33.
- Baumann, T. W., Mösl, S.-S., Schulthess, B. H. and Aerts, R. J. 1993. In: *15th Int. Scient. Colloq. Coffee*, Montpellier, June 6-11, p. 134-140, ASIC, Paris.
- Baumann, T. W., Rodriguez, M. F. and Kappeler, A. W. 1992. In: *Proc. 14th Int. Conf. Coffee Sci., San Francisco* (1991), pp. 465-469, ASIC, Paris.
- Bresler, H. W. 1904. *Hoppe Seyler, Z. Physiol. Chem.* 4:535.
- Cloughley, J. B. 1982. *Food Chem.* 9:269.
- Frischknecht, P. M. and Baumann, T. W. 1985. *Phytochemistry* 24:2255.
- Fujimori, N., Suzuki, T. and Ashihara, H. 1991. *Phytochemistry* 30:2245.
- Fujimori, N. and Ashihara, H. 1993. *Ann. Bot.* 71:279.
- Furuya, T., Orihara, Y., Koge, K. and Tsuda, Y. 1989. *Shokubutsu Soshiki Baiyo* 6:148 (in Japanese with English summary).
- Inoue, T. and Adachi, F. 1961. *J. Pharm. Soc. Jpn.* 10:1212.
- Johnson, T. W. 1937. *J. Am. Chem. Soc.* 59:1261.
- Kalberer, P. 1965. *Nature* 205:597.
- Kappler, A. W. and Baumann, T. W. 1986. In: *11th Coll. Sc. Int. Sur le Café, Rome* (1985) pp 273-279, ASIC, Paris.
- Keller, H., Wanner, H. and Baumann, T. W. 1972. *Planta* 108:339.
- Kihlman, B. A. 1977. *Caffeine and Chromosomes*. Elsevier, Amsterdam.
- Le Floch, F., Lafleur, . and Guillot, A. 1982. *Plant Sci. Lett.* 27:309.
- Ludovic de Romero, I. C. and Waller, G. R. 1988. *Rev. Latinoamericana. Quim.* 19:7-12.
- Mazzafera, P., Crozier, A. and Magalhães, A. C. 1991. *Phytochemistry* 30:3913.
- Nazario G. M. and Lovatt, C. J. 1991. In: *Abstr. 14th Int. Conf. Coffee Sci., San Francisco* (1991), pp 51, ASIC, Paris.
- Nazario, G. M. and Lovatt, C. J. 1993. In: *15th Int. Scient. Colloq. Coffee*, Montpellier, June 6-11, p. 155-162, ASIC, Paris.
- Negishi, O., Ozawa, T. and Imagawa, H. 1985a. *Agric. Biol. Chem.* 49:887.
- Negishi, O., Ozawa, T. and Imagawa, H. 1985b. *Agric. Biol. Chem.* 49:2221.
- Negishi, O., Ozawa, T. and Imagawa, H. 1985c. *Agric Biol. Chem.* 49:251.
- Negishi, O., Ozawa, T. and Imagawa, H. 1988. *Agric. Biol. Chem.* 52:169.
- Negishi, O., Ozawa, T. and Imagawa, H. 1992. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56:499-503.
- Nishimura, U. and Ashihara, H. 1993. *Phytochemistry*, in press.
- Ogutuga, D. B. A. and Northcote, D. H. 1970a. *J. Exp. Bot.* 21:258.
- Ogutuga, D. B. A. and Northcote, D. H. 1970b. *Biochem. J.* 117:715.
- Preusser (Proiser), P. and Serenkov, G. P. 1963. *Biokhimiya* 28:857.
- Owuor, P. O. 1991. In: *Proc. Int. Symp. Tea Sci., Shizuoka* (1991), pp 165-169.
- Owuor, P. O. and Chavanji, A. M. 1986. *Food Chem.* 20:225.
- Prenosil, J. E., Heggin, M., Baumann, T. W. Frischknecht, P. M., Kappeler, A. W., Brodelius, P. and Haldimann, D. 1987. *Enzyme Microb. Technol.* 9:450.
- Roberts, M. F. and Waller, G. R. 1979. *Phytochemistry* 18:451.
- Ross, C. W. 1981. In: Stumpf, P. K. and Conn, E. E. (eds) *The Biochemistry of Plants*, Vol 6, Academic Press, New York, NY, pp. 169.

- Schulthess, B. H., Wyuss, G. S. and Baumann, T. W. 1991. In: *Proc. 14th Int. Conf. Coffee Sci., San Francisco* (1991), pp. 601-607, ASIC, Paris.
- Schulthess, B. H., Ruedi, P. and Baumann, T. W. 1993. In: *15th Int. Scient. Colloq. Coffee*, Montpellier, June 6-11, p. 770-772, ASIC, Paris.
- Suzuki, T. 1972. *FEBS Lett.* 24:18.
- Suzuki, T. 1973, *Biochem. J.* 132:753.
- Suzuki, T. and Takahashi, E. 1975. *Biochem J.* 146:87.
- Suzuki, T. and Takahashi, E. 1977. *Drug Metab. Rev.* 6:213.
- Suzuki, T. and Waller, G. R. 1988. In: Linskens, H. F. and Jackson, J. F. (eds) *Modern Methods of Plant Analysis, New Ser.* Vol. 8, Springer-Berlin, pp 184.
- Suzuki, T., Ashihara, H. and Waller, G. R. 1992. *Phytochemistry* 31:2575.
- Tsushida, T. and Doi, . 1984. *Nippon Nogelkaagaku Kaishi* 58:1131 (in Japanese with English summary).
- Wagner, K. G. and Backer, A. I. 1992. *Int. Rev. Cytol.* 134:1-84.
- Waller, G. R., Ashihara, H. and Suzuki, T. 1991. *14th Inter. Conf. Coffee Sci., San Francisco* (1991), pp. 258, ASIC, Paris.
- Waller, G. R., MacVean, C. D. and Suzuki, T. 1983. *Plant Cell Rep.* 2:109.
- Wasternack, C. 1982. In: Pirson, A. and Zimmermann, M. H. (eds) *Encyclopedia of Plant Physiology, New Ser.* Vol. 14B, Springer, Berlin, pp 263.

(Note: The complete reference list may be found in Suzuki *et al.*, 1992.)

SUMMARY

The metabolism of purine nucleotides and purine alkaloids (e.g. caffeine theobromine and theophylline) are inherently woven together in coffee and tea plants. Purine metabolism in these plants is similar to that in others, which do not contain caffeine; however, coffee and tea plants have purine nucleotides, including those produced directly by the pathway of purine biosynthesis *de novo* which serve as effective precursors of caffeine. Xanthosine is the first methyl acceptor from *S*-adenosylmethionine in caffeine biosynthesis, and is also metabolized by a purine degradation pathway via xanthine. The regulation of purine alkaloid biosynthesis remains elusive, but the activity of the three *N*-methyltransferases, IMP dehydrogenase, and *N*-methylnucleosidase are considered as well as the caffeine degradation route. The production and accumulation of the alkaloids are associated with the developmental stage of tissues (i.e. leaves, flowers, fruits and seeds) and with seasonal changes. In *Coffea* plants and in cultured cells, the rate of caffeine synthesis and turnover (i.e. biodegradation and or biotransformation to xanthine or to methyluric acids) differs markedly among species. The metabolism (especially biosynthesis) of purine alkaloids differs among *Camellia* species. Ecological roles of the alkaloids have been reported, but their physiological significance in tea and coffee plants remains uncertain.

PURINE METABOLISM AND ALKALOID BIOSYNTHESIS IN LEAVES OF *COFFEA ARABICA* L.

G. M. NAZARIO¹, C. J. LOVATT²

¹ Department of Biology, University of Puerto Rico, PO Box 23360, U.P.R. Station, San Juan P. R. 00931-3360 ;
² Department of Botany and Plant Sciences, University of California, Riverside CA 92521-0124

Although purine metabolism in higher plants has been demonstrated to be similar to that in bacteria and animals (6,9), plants producing unique purine alkaloids, such as caffeine (1,3,7-trimethylxanthine), may have alternative pathways for the synthesis, salvage or catabolism of purines.

During the investigation of caffeine biosynthesis we assessed the capacity of leaves of *Coffea arabica* to synthesize purine nucleotides *de novo*. In addition, we examined the subsequent metabolism of IMP to adenine nucleotides and the catabolism of the purine ring to xanthine and subsequently to urea. Since regulation of purine metabolism by end-product inhibition might be at a different enzymic step in a tissue producing purine alkaloids, we contrasted feedback control of purine *de novo* biosynthesis in leaves of *C. arabica* with that in excised roots of summer squash (*Cucurbita pepo*), a species which does not synthesize purine alkaloids.

Studies have been conducted with *Coffea arabica* (coffee) as well as with *Camellia sinensis*, to elucidate the pathway for the biosynthesis of caffeine. Anderson and Gibbs (1) and Proiser and Serenkov (7) demonstrated, respectively, that the purine ring of caffeine in coffee and in tea was synthesized from the same precursors utilized in the *de novo* biosynthesis of the purine ring, suggesting that the purine ring of caffeine is provided *de novo*. However, so far, most research attempting to elucidate the pathway of caffeine biosynthesis has been based on the salvage of exogenously supplied purine ribosides and bases. There is good evidence that exogenously supplied ribosides and bases are separately compartmentalized in plant cells from those generated endogenously (8). Thus, such research results may compromise attempts to identify the actual pathway of caffeine biosynthesis if it proceeds from purine rings generated endogenously.

Theobromine (3,7-dimethylxanthine), theophylline (1,3-dimethylxanthine) and paraxanthine (1,7-dimethylxanthine) are the three methylated bases proposed as immediate precursors and/or catabolic products of caffeine. The bulk of the literature suggests that theobromine is the immediate precursor of caffeine, while theophylline has been proposed as a product of caffeine degradation (2). Very little work has been done with paraxanthine. The involvement of these xanthines in the synthesis of caffeine is still not conclusive.

In this study, we addressed the specific question of whether theobromine or theophylline is the immediate precursor of caffeine in coffee leaves.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Coffee (*Coffea arabica*) seedlings were donated from the Department of Agriculture in Puerto Rico and imported to California in accordance to USDA regulations. All experiments employed young fully expanded leaves from trees that were 1 to 5 years-old. The leaves were collected just prior to the experiments, washed with distilled water, and quickly blotted dry before weighing.

Seeds of summer squash (*Cucurbita pepo*) courtesy of Harris-Moran, were imbibed in distilled H₂O at room temperature for 24 hours. After germinating for two days, the roots were excised, pooled and immediately weighed into 150mg-aliquots which were maintained between sheets of moistened paper towel until weighing was completed (6).

Experimental

Incorporation of radiolabeled precursors into acid-soluble purine products: Conditions employed for the incorporation of [¹⁴C]labeled substrates of purine metabolism by plant tissues were essentially those described by Lovatt (6).

Isolation of radiolabeled purine nucleotide products by cocrystallization: IMP or adenine nucleotides plus adenosine synthesized by leaf or root tissue from radiolabeled precursors were converted by acid hydrolysis to hypoxanthine and adenine, respectively, by heating the acid soluble fraction at 100°C for 1h prior to neutralization with KOH. Radiolabeled hypoxanthine and adenine synthesized by the plant tissue were isolated by cocrystallization with carrier hypoxanthine and adenine (6,9).

Isolation of radiolabeled PRAICA by TLC: PRAICA synthesized by leaf or root tissue was isolated from the neutralized acid soluble fraction by TLC on cellulose sheets using two different solvent systems as described by Ciardi and Anderson (4).

Recovery of radiolabeled carbon-8 of adenine, hypoxanthine and xanthine in [¹⁴C]urea: The amount of [¹⁴C]urea synthesized from [8-¹⁴C]purine bases by coffee leaves was quantified according to the method of Lovatt and Cheng (5).

Isolation of radiolabeled theobromine, theophylline and caffeine by cocrystallization: Total theobromine, theophylline and caffeine were isolated from either acid-soluble or ethanol-soluble fraction with their respective carrier .

Results and Discussion

De novo biosynthesis of purine nucleotides in leaves of *Coffea arabica*: Evidence of the *de novo* pathway was provided by demonstration of the incorporation of the radiolabeled carbons of formate, bicarbonate and glycine into IMP and into Σ Ade (sum of the adenosine nucleotides, adenosine and adenine) (Table 1). Inosine monophosphate (IMP) was subjected to acid hydrolysis and isolated as hypoxanthine. In addition, adenine nucleotides and adenosine synthesized during the incubations were subjected to acid hydrolysis and isolated as adenine, confirming that the labeled carbons were in both cases incorporated into the purine ring.

Table 1: Incorporation of [^{14}C]labeled precursors of the *de novo* purine biosynthetic pathway into IMP and into the sum of adenine nucleotides, adenosine and adenine (Σ Ade) in intact cells of *Coffea arabica*.

Conditions for the incorporation of 100 mM [^{14}C]glycine (400 dpm/nmol) were optimal; no attempts were made to determine optimal conditions for 25 mM [^{14}C]bicarbonate (2,640 dpm/nmol) or 5 mM [^{14}C]formate (3,300 dpm/nmol).

[^{14}C]- Precursor	nmol precursor incorporated into product per g fr wt leaf tissue during a 3 h incubation	
	IMP	Σ Ade
Glycine	25 \pm 5 ^a	37 \pm 5
Bicarbonate	4 \pm 0	42 \pm 2
Formate	8 \pm 4	61 \pm 7

^a Mean \pm standard error, $n = 2$.

In addition, azaserine, a known inhibitor of *de novo* purine biosynthesis which is effective in plants (6,9), at concentrations of 5-20 mM inhibited by about 60% the incorporation of [^{14}C]bicarbonate into Σ Ade in leaves *C. arabica*.

Catabolism of purines in leaves of *C. arabica*: Evidence of the catabolic pathway was provided by the incorporation of both [^{14}C]formate and [^{14}C]adenosine into hypoxanthine: 10 and 1306 nmol, respectively, incorporated into hypoxanthine per g fresh weight leaf tissue during a 7-h incubation period. The radiolabeled ribosides inosine and adenosine and the bases adenine and hypoxanthine were all converted to xanthine (Table 2). The incorporation of these radiolabeled precursors was inhibited in the presence of allopurinol (10 mM final concentration), a known inhibitor of the enzymes which catalyze the conversion of hypoxanthine to xanthine and xanthine to uric acid (3) (Table 2).

Table 2. Incorporation of radiolabeled inosine, adenosine, adenine and hypoxanthine into xanthine by leaves of *Coffea arabica* incubated in the presence of allopurinol (10 mM final concentration).

No attempts were made to determine optimal conditions for the incorporation of 2 mM [¹⁴C]inosine (1,100 dpm/nmol), 2 mM [¹⁴C]adenosine (1,100 dpm/nmol), 2mM [¹⁴C]adenine (1,100 dpm/nmol) or 2mM [¹⁴C]hypoxanthine (200 dpm/nmol). Xanthine was isolated from the neutralized acid soluble fraction by co-crystallization with carrier xanthine.

[¹⁴ C]labeled Precursor	Incorporation of precursor into xanthine ^a	
	Control	+ allopurinol (10 mM)
	nmol/g fresh wt · 7h	% control
Inosine	341	57
Adenosine	3030	75
Adenine	3264	15
Hypoxanthine	3890	44

^a Mean ± SE (n=2-3)

Furthermore, 7, 113 and 316 nmol of [¹⁴C]urea were formed from [8-¹⁴C]adenine, [8-¹⁴C]hypoxanthine and [8-¹⁴C]xanthine, respectively, per g fr wt leaf tissue during a 3-h incubation period. Urease activity was demonstrated by the release of 120 ± 9 nmol (n=2) ¹⁴CO₂ from exogenously supplied [¹⁴C]urea per g fr wt leaf tissue during a 3-h incubation period.

Regulation of the *de novo* purine biosynthetic pathway in *Coffea arabica* contrasted with regulation of the *de novo* purine pathway in *Cucurbita pepo*. The effect of added adenosine on the activity of the *de novo* purine pathway of *C. arabica* was contrasted with *C. pepo*, a species which does not synthesize purine alkaloids. Adenosine or its metabolites inhibited the incorporation of radiolabeled bicarbonate and formate into IMP and ΣAde by 90%. In the presence of added adenosine, [¹⁴C]bicarbonate and [1-¹⁴C]glycine, but not formate, accumulated in PRAICA (5¹-phosphoribosyl-4-carboxamide-5-aminoimidazole). These results suggest that end product inhibition in *C. pepo* occurs at one or both of the enzymic reactions converting PRAICA to IMP.

In contrast, for *C. arabica*, adenosine or its metabolites inhibited the incorporation of [¹⁴C]bicarbonate into PRAICA, IMP and ΣAde. Consistent with end-product inhibition at an early step in the pathway leading to PRAICA formation,

exogenous adenosine inhibited by 30% the incorporation of [1-¹⁴C]glycine into PRAICA.

We were unable to identify the specific site of regulation for the *de novo* purine pathway of coffee, but results suggest a difference in the site of physiological importance in the regulation of the *de novo* pathway of *C. pepo* vs *C. arabica*.

Evidence that theobromine, theophylline and caffeine are the products of separate pathways in leaves of *Coffea arabica* : The effect of added XMP, inosine, adenosine, adenine, hypoxanthine, xanthine and guanosine on the incorporation of [¹⁴C]formate into theobromine, theophylline and caffeine suggested potential differences in the metabolic pathway leading to the synthesis of the three purine alkaloids. Incorporation of radiolabeled formate was reduced in the presence of exogenously supplied adenosine and adenine, while XMP, inosine, hypoxanthine and xanthine failed to reduced the incorporation. Incorporation of [¹⁴C]formate into theophylline was reduced in the presence of XMP, inosine, adenosine, adenine and guanosine, but not in the presence of hypoxanthine or xanthine. On the other hand, the presence of exogenously supplied XMP, inosine, adenosine, adenine, hypoxanthine and xanthine reduced the specific radioactivity of [¹⁴C]formate incorporated into caffeine (Scheme 1).

Formate----->	IMP----->	Theobromine
	% inhibition	
	adenosine	52
	adenine	81
Formate----->	IMP----->	Theophylline
	XMP	28
	Inosine	51
	Adenosine	65
	Adenine	74
	Guanosine	85
Formate----->	IMP----->	Caffeine
	XMP	55
	Inosine	10
	Adenosine	53
	Adenine	50
	Hypoxanthine	51
	Xanthine	30
	Guanosine	30

Scheme 1. Effect of unlabeled purine additives on the incorporation of radiolabeled formate into theobromine, theophylline and caffeine.

Coffee leaves metabolized xanthine into theobromine in a different manner than in caffeine. We obtained no significant incorporation of [¹⁴C]xanthine into theobromine. However, unlabeled xanthine (10 mM final concentration) increased the incorporation of radiolabeled ribosides and bases into theobromine. Allopurinol either increased or had no effect on the incorporation of these precursors into

theobromine. In contrast, 90 ± 22 ($n=3$) nmol [^{14}C]xanthine were incorporated into caffeine per g fr wt coffee leaves during a 7-h incubation period. Consistent with xanthine being an intermediate in the synthesis of caffeine, unlabeled xanthine (10 mM final concentration) reduced the specific radioactivity of radiolabeled formate, adenosine, adenine and hypoxanthine incorporated into caffeine.

In regards to theophylline and caffeine the most striking differences in the metabolism of formate were in the presence of added hypoxanthine and xanthine, which caused significant accumulation of [^{14}C]formate in theophylline, but reduced the specific radioactivity of [^{14}C]formate incorporated into caffeine.

Additional experiments using the technique of isotope dilution to contrast the *de novo* synthesis of theobromine with its synthesis from exogenously supplied purine ribosides and bases provided evidence that the synthesis of theobromine occurs in two separate compartments in leaves of *Coffea arabica*, one utilizing purine rings generated endogenously and *de novo*, and the other metabolizing exogenously supplied purines. Results suggest that adenine and adenosine, when supplied exogenously, entered the purine pools of both compartments, but did not move between compartments when produced endogenously (Figure 1).

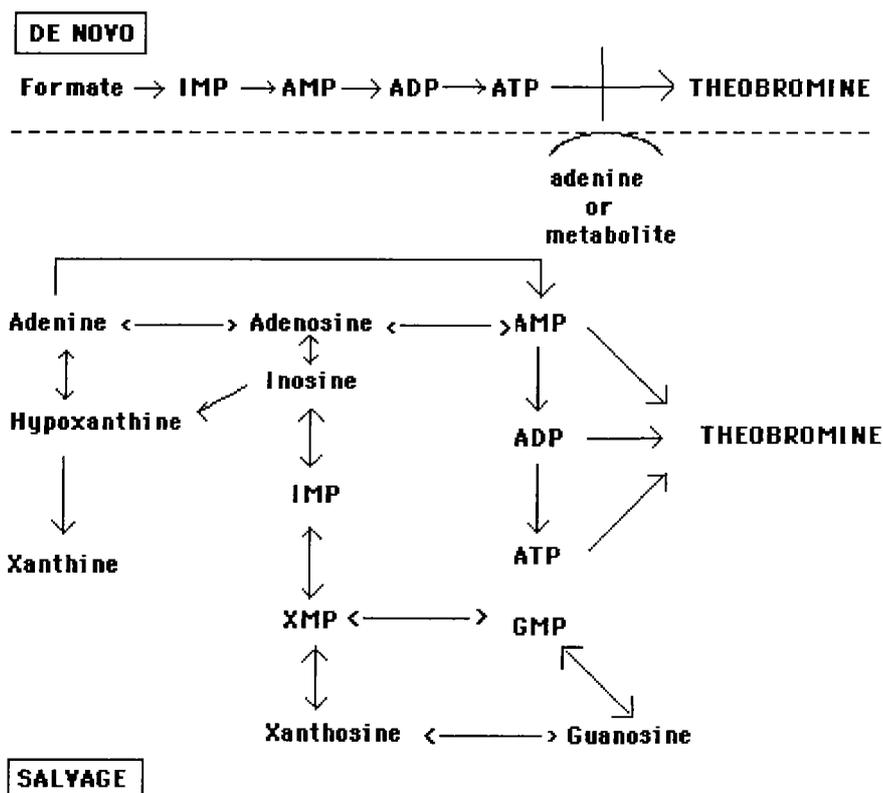


Figure 1. Compartmentalization of the *de novo* and salvage pathways in the synthesis of theobromine in leaves of *Coffea arabica*.

SUMMARY

The occurrence of the classical pathway for the *de novo* biosynthesis of purine nucleotides was suggested by demonstration of the incorporation of several [¹⁴C]precursors into IMP and Σ Ade and by the inhibition of this incorporation by azaserine, a known inhibitor of *de novo* purine biosynthesis in other organisms.

Evidence demonstrating purine degradation via the classical pathway was provided by incorporation of the radiolabeled purine ribosides inosine and adenosine and the radiolabeled bases adenine and hypoxanthine into xanthine. In addition, allopurinol, a known inhibitor of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase, in all cases inhibited the incorporation of radiolabeled precursors into xanthine. Coffee leaves degraded 316 nmoles of [8-¹⁴]xanthine to urea per g fresh weight in 3-h confirming that urea is a product of degradation.

Incorporation of radiolabeled bicarbonate into IMP and Σ Ade was inhibited by the addition of adenosine to excised roots of *C. pepo* and leaves of *C. arabica* suggesting that the purine *de novo* pathway was regulated by end-product inhibition in both species. Regulation by end-product inhibition in *C. pepo*, a species which does not synthesize caffeine, was different from regulation in *C. arabica*. Although we were unable to identify the specific site of the *de novo* purine pathway sensitive to end-product inhibition in coffee, results suggest that an early step in the pathway prior to the synthesis of PRAICA is the site of physiological importance in the regulation of the pathway. In contrast, the site of physiological importance in the regulation of the *de novo* purine pathway in squash was at one or both of the enzymic reactions converting PRAICA to IMP.

The pathway for the biosynthesis of theobromine, theophylline and caffeine was also investigated. Theobromine, theophylline and paraxanthine are logical precursors of caffeine. However, our results provided strong evidence that theobromine, theophylline and caffeine are the products of different pathways. The results suggested that theobromine is synthesized from adenine nucleotides, theophylline from guanine nucleotides and caffeine from the degradation of purines via hypoxanthine to xanthine with paraxanthine the immediate precursor of caffeine.

Literature Cited

1. Anderson L, Gibbs M (1962) The biosynthesis of caffeine in the coffee plant. *J Biol Chem* 237: 1941-1944
2. Ashihara H, Kubota H (1986) Patterns of adenosine metabolism and caffeine biosynthesis in different parts of tea seedlings. *Physiol plant* 68: 275-281
3. Atkins CA, Sanford PJ, Storer PJ, Pate JS (1988) Inhibition of nodule functioning in cowpea by xanthine oxidoreductase inhibitor, allopurinol. *Plant Physiol* 88: 1229-1234
4. Ciardi JE, Anderson EP (1968) Separation of purine and pyrimidine derivatives by thin layer chromatography. *Anal Biochem* 22: 398-408

5. Lovatt CJ, Cheng AH (1984) Application of commercial enzymes to measure the activity of the arginine pathway-urea cycle in intact cells. *Anal Biochem* 142: 305-311
6. Lovatt CJ (1983) *De novo* purine biosynthesis in intact cells of *Cucurbita pepo*. *Plant Physiol* 73: 766-772
7. Proiser E, Serenkov GP (1963) Caffeine biosynthesis in tea leaves. *Biokhimiya* 28: 857-861
8. Ross CW (1981) Biosynthesis of nucleotides pp 169-205. In : PK Stumpf and EE Conn, eds, *The Biochemistry of PLants*, Vol 6. Academic Press, New York
9. Tomlinson PT, Lovatt CJ (1987) Nucleotide metabolism in 'Washington' navel orange fruit: I. Pathways of synthesis and catabolism. *J Amer Soc Hort Sci* 112: 529-535

QUELLES CAFÉICULTURES POUR DEMAIN ?

R. A. MULLER

Ancien Directeur Scientifique de l'IRCC/CIRAD

Mesdames, Messieurs,

Je voudrais tout d'abord remercier Monsieur COSTE, Président de l'ASIC, qui a bien voulu me demander de faire à cette tribune, une tentative de projection dans le futur.

QUELLES CAFÉICULTURES POUR DEMAIN ?

Tel est en effet le thème de mon propos.

Pour répondre à cette question, il convient d'abord de savoir ce qu'est la caféiculture aujourd'hui et quels sont ses bases scientifiques et ses problèmes, afin d'identifier d'une façon réaliste, les mutations qu'il faut redouter et éviter et celles qu'il convient au contraire de provoquer ou favoriser, et les innovations que, pour ce faire, il faudra être en mesure de proposer aux agriculteurs.

I - LA CAFÉICULTURE AUJOURD'HUI

L'enrichissement des connaissances et de l'expérience au cours des dernières décennies, a engendré une évolution parallèle des conceptions en matière de caféiculture conduisant à une augmentation des rendements, à une valorisation accrue du travail et à une meilleure satisfaction des goûts des consommateurs.

Sans entrer dans le détail des innovations techniques qui ont vu le jour au cours du dernier demi-siècle, on peut cependant mettre en évidence quelques-unes des étapes les plus marquantes d'un parcours qui nous amène aux conceptions actuelles concernant :

- le milieu ambiant
- la taille
- la fertilisation minérale
- le matériel végétal
- les maladies et ravageurs
- la récolte et le traitement post-récolte.

1. Le milieu ambiant

Les caféiers ayant leur niche écologique dans les forêts qui occupent leurs lieux d'origine (forêts éthiopiennes pour les arabica, forêts guinéo-congolaises pour les robusta), ont généralement été plantés, au départ du développement de la caféiculture, dans une ambiance forestière.

On a ainsi d'abord simplement éclairci la forêt, comme on peut le voir encore en maints endroits (fig. 1 et 2).

Là où la forêt avait disparu, on a reconstitué cette ambiance forestière en plantant des espèces arborescentes sous lesquelles on a installé les caféiers. Ces arbres d'ombrage ont été le plus souvent des légumineuses (*Albizia spp.*, *Leucaena spp.*, *Inga spp.*, *Erythrina spp.*) (fig. 3), mais parfois aussi des essences appartenant à d'autres groupes botaniques (*Grevillea robusta*), et souvent des mélanges de fruitiers divers (agrumes, manguiers, bananiers, plantains...), mis en place pour compléter l'ombrage naturel ou artificiel jugé insuffisant ou afin de fournir un complément alimentaire.

L'usage des arbres d'ombrage avait donc sa logique. Il permettait, de surcroît, d'éviter des désordres physiologiques de type "Elgon die-back" liés à des variations brusques de température et aux effets de l'exposition au soleil en l'absence d'une alimentation minérale bien comprise. Mais on est arrivé au constat que, si l'ombrage assurait une production relativement stable d'année en année, en revanche il gênait l'utilisation des éléments minéraux, l'azote en particulier, et ne permettait pas à la plante de réagir favorablement aux apports de fertilisants, ni par conséquent d'exprimer toutes ses potentialités productives.

Régulateur de la production à un niveau modeste, l'ombrage a perdu droit de cité et l'on est passé à la conception d'une caféiculture de plein ensoleillement associée à l'usage des engrais, ce qui constitue une étape très importante de l'intensification (fig. 4).

En Amérique Centrale, au Costa Rica en particulier, on a cependant souvent conservé les Erythrines pour en faire des plantes à paillis pourvoyeuses de matière organique et d'azote et ne jouant plus leur rôle primitif de plantes d'ombrage du fait des émondages fréquents et très sévères qu'impose leur nouvelle fonction (fig. 5).

2. La taille

Les caféiers fleurissant sur le bois d'un an, la taille, destinée à produire le maximum possible de bois jeune, est vite apparue comme l'une des clés de la production. De nombreuses méthodes de taille furent proposées et pratiquées et sont souvent encore l'objet de controverses mais le poids financier de cette opération a conduit à imaginer une simplification. On a ainsi progressivement abandonné la taille conçue au niveau du rameau, très exigeante en main-d'oeuvre, pour adopter une taille portant sur la plante entière, le recépage cyclique par lignes alternées après trois, quatre ou cinq années de production selon les variétés et les sites, avec croissance libre des deux ou trois rejets sélectionnés pour reconstituer la plante (fig. 6).

La formule "rock'n roll" des costariciens, bien adaptée aux variétés de ce pays, le Caturra en particulier, et consistant à recéper les plantes alternativement à un mètre du sol en laissant subsister une jupe productrice, puis à 40 cm au cycle suivant, constitue une amélioration de la méthode, limitant les pertes de production consécutives à l'opération de rajeunissement de la plante.

3. La fertilisation minérale

Avec les travaux conduits il y a une quarantaine d'années, les besoins des caféiers en éléments fertilisants ont été définis. Une fumure azotée ou à dominance azotée, en particulier en plein ensoleillement, est apparue presque partout comme un facteur décisif de productivité, mais un complexe d'éléments minéraux, mieux adaptés à chaque situation peut maintenant être proposé grâce aux études plus récentes qui permettent de poser un diagnostic précis pour chaque cas en se fondant sur l'analyse du sol complétée par l'analyse foliaire.

4. Le matériel végétal

Les généticiens et les sélectionneurs ont profondément marqué les potentialités de la caféiculture.

L'amélioration du matériel végétal robuste, par la voie sexuelle, permet d'obtenir des récoltes de l'ordre de 1,5 tonne à l'hectare. La sélection clonale, bien relayée par une parfaite maîtrise de la production industrielle de boutures telle qu'elle a été pratiquée en Côte d'Ivoire, au Cameroun, en Centrafrique, au Togo, conduit à des rendements atteignant 3 tonnes à l'hectare (fig. 7).

Pour l'arabica, le Typica, à l'origine partout répandu, a été remplacé progressivement par de nouveaux cultivars plus productifs et présentant des adaptations et des caractéristiques variées, Blue Mountain Jamaïque, Java, Mundo Novo, etc. de format élevé, et par les Caturra, Catuai et quelques autres caractérisés par une architecture compacte (fig. 8).

L'usage de ces variétés naines est une véritable révolution pour la caféiculture d'arabica, leur petit format autorisant de les planter à de très hautes densités. On est ainsi passé des plantations pouvant compter 1000 à 2000 pieds à l'hectare à des plantations pouvant en compter 10000 en Colombie où le Caturra planté à 1 m x 1 m, avec un seul plant par trou, est conduit selon un système de recépage cyclique après seulement 2 ou 3 récoltes ; la densité adoptée est moins forte en Amérique Centrale avec seulement 6000 à 7000 trous par hectare mais souvent avec 2 ou 3 sujets dans le même trou. Au Costa Rica où l'on a acquis une particulière maîtrise des hautes densités de Caturra couplées avec la taille rock'n roll, et une fumure adéquate, on obtient des rendements particulièrement élevés de 4 à 5 tonnes.

5. Les maladies et ravageurs

Le développement de la caféiculture s'est heurté aux attaques de maladies cryptogamiques, d'insectes, et de nématodes, dont l'apparition jalonne l'histoire du café : rouille orangée (*Hemileia vastatrix*), trachéomycose, anthracnose des baies ou CBD, pourridiés des racines, nématodes, scolyte du grain, borer des troncs, mineuse de la feuille, cochenilles, chenilles défoliatrices, etc. (fig. 9, 10, 11 et 12).

La liste est longue des maladies et des ravageurs qui ont gêné la culture du café, amené les chercheurs à mettre au point des parades adaptées, et conduit la caféiculture à compliquer ses pratiques courantes en y incluant les techniques de lutte phytosanitaire, efficaces dans de nombreux cas, mais toujours coûteuses et contraignantes. La recherche d'autres méthodes de lutte, plus économiques, et nécessitant moins d'efforts, a marqué les dernières décennies. Le plus bel exemple est sans doute l'important travail réalisé pour la recherche de variétés résistantes à la rouille orangée, d'abord dans le sens de la **résistance spécifique** orchestrée par le CIFIC au Portugal et qui a abouti à la création des Catimors résultant du croisement entre l'Hybride de Timor qui résiste à toutes les races connues du pathogène, et le Caturra, et dont certaines lignées peuvent être maintenant employées. La variété Columbia qui procède du même schéma est abondamment diffusée en Colombie.

L'arme génétique est donc, d'ores et déjà, efficace dans quelques cas ; elle peut changer l'aspect de la caféiculture en la libérant de l'emploi de l'arsenal chimique et du poids financier de sa mise en oeuvre.

6. La récolte et le traitement post-récolte

Dans cette récapitulation des étapes marquantes, on ne saurait oublier les tentatives récentes de mise au point d'une récolte mécanisée qui semble avoir trouvé son application pratique au Brésil et en Australie (fig. 13) par la mise en oeuvre de grosses machines travaillant sur le principe des récolteuses à raisin.

Pour terminer, on rappellera qu'au bout de la chaîne, on a appris ce qu'il faut faire pour obtenir un produit de qualité, par voie sèche ou par voie humide, et lui assurer une bonne présentation grâce à des méthodes de triage et de classement perfectionnées et performantes.

II - LE POSSIBLE

Tout ce qui vient d'être dit montre qu'avec le plein ensoleillement, une fumure minérale bien comprise, une taille rationnelle aux plans technique et économique, un matériel végétal à hautes potentialités, une bonne maîtrise de la lutte contre les maladies et les ravageurs, la possibilité de traiter le produit à la satisfaction des acheteurs, on dispose d'un paquet technique qui, appliqué avec cohérence, peut conduire à une caféiculture très performante comme l'attestaient, jusqu'à une date récente au moins, les résultats de ceux qui le mettent en pratique.

III - LE REEL

Pourtant, les statistiques montrent qu'il existe, pour l'ensemble de la caféiculture, une différence énorme entre ce possible et le réel.

Pour plus de 11 millions d'hectares plantés dans les 49 pays qui figurent sur le tableau I, la production est de 5 645 000 tonnes, ce qui situe le rendement moyen annuel de la caféiculture mondiale à environ 510 kg/ha c'est-à-dire bien en-deçà des résultats énoncés plus haut. Sur ces 49 pays, 20 seulement ont une production égale ou supérieure à cette moyenne, 8 atteignent ou dépassent la tonne à l'hectare, la palme revenant au Costa Rica avec plus de 3 fois la moyenne mondiale. 29 des pays figurant sur le tableau, qui totalisent près de la moitié des surfaces plantées sont en-dessous, quelquefois très en-dessous de la moyenne.

Si l'on ajoute que dans nombre des pays qui font globalement bonne figure sur le tableau, il existe une masse importante de petits caféiculteurs très en retrait, on se rend compte que la situation générale de la caféiculture est encore plus mauvaise que ne le laisse penser une première analyse.

Ces chiffres sont éloquemment expliqués lorsque l'on circule dans les pays producteurs. La caféiculture a de multiples visages traduisant l'existence de niveaux techniques et de situations socio-économiques contrastés : à une extrémité, une économie de cueillette générant de maigres revenus, à l'autre un véritable jardinage conduisant aux plus hautes productions qui, répétons-le, peuvent atteindre 3 à 5 tonnes à l'hectare et assurent aux agriculteurs une vie plus que décente.

On peut illustrer ces propos par quelques images :

- il n'y a pas de différence marquante entre les "Wild Coffee" qui constituent le sous-bois naturel des forêts éthiopiennes (fig. 14) et certains arabica rencontrés dans les Andes vénézuéliennes et qui, plantés depuis 20 ou 30 ans ou peut-être plus, n'ont apparemment jamais reçu plus de soins que leurs frères sauvages (fig. 15) ; d'autres, trouvés dans la même région sous ombrage compact, n'ont guère d'autres possibilités que d'entretenir leur maigre feuillage (fig. 16) ;

- que dire des arabicas camerounais (fig. 17) que l'on distingue avec peine au milieu d'une association complexe de plantes vivrières ? ;

- le contraste est évidemment frappant avec les belles plantations camerounaises (fig. 18) et guatémaltèques (fig. 4), ou les plantations costariciennes établies avec un luxe de soins pour lutter contre l'érosion (fig. 19) ;

- enfin, une image futuriste nous est donnée par la toute jeune caféiculture australienne qui a choisi le tout mécanique, qu'il s'agisse de la plantation (fig. 20), de la taille ou de la récolte, et qui simplifie la préparation des plants par le passage direct du germe au champ.

La faible productivité générale de la caféiculture est en partie due au fait que, dans de nombreux pays, l'accroissement de la production nationale ne s'est faite que par l'accroissement des surfaces plantées ; l'exemple de la Côte d'Ivoire est typique : on a assisté à une colonisation sauvage de zones forestières pour s'appropriier la terre, et l'on a aujourd'hui un verger de près d'un million et demi d'hectares de caféiers dont la production

TABLEAU I : SURFACES PLANTEES - PRODUCTIONS NATIONALES - PRODUCTIONS A L'HECTARE

(D'après Annuaire FAO de la production, 1990, F.O. Licht's International Coffee Report, Oct 90, et Café-Cacao-Thé, janvier-mars 92).

PAYS	SURFACES PLANTEES en 1989 et 1990 (en 1000 ha)	TONNAGES PRODUITS en 89-90 et 90-91 (en 1000 T)	MOYENNES HECTARE (en kg)
AFRIQUE			
BURUNDI	37,00	31,00	838,00
CAMEROUN	360,00	109,00	303,00
CENTRAFRIQUE	30,00	16,50	550,00
COTE D'IVOIRE	1 175,00	244,00	208,00
ETHIOPIE	400,00	187,00	468,00
GABON	4,00	0,30	75,00
GHANA	10,00	1,15	115,00
GUINEE	98,00	8,90	91,00
GUINEE EQUATORIALE	19,00	0,55	29,00
KENYA	155,00	97,40	628,00
LIBERIA	20,00	0,60	30,00
MADAGASCAR	239,00	66,00	276,00
MALAWI	5,00	6,60	1 320,00
NIGERIA	7,00	1,75	250,00
UGANDA	239,00	163,00	682,00
RWANDA	46,00	39,50	859,00
SIERRA LEONE	31,00	6,00	194,00
TANZANIE	113,00	50,35	446,00
TOGO	30,00	9,50	317,00
ZAIRE	289,00	100,80	349,00
ZIMBABWE	12,00	13,45	1 121,00
TOTAL	3 319,00	1 153,35	347,00
ASIE			
INDE	227,00	146,50	645,00
INDONESIE	742,00	422,20	569,00
MALAYSIE	13,00	5,40	415,00
PHILIPPINES	143,00	64,00	448,00
SRI LANKA	14,00	3,90	279,00
THAILANDE	51,00	58,10	1 139,00
VIET NAM	43,00	62,20	1 447,00
YEMEN	19,00	2,85	150,00
TOTAL	1 252,00	765,15	611,00
AMERIQUE DU SUD			
BOLIVIE	27,00	9,85	365,00
BRESIL	2 975,00	1 510,25	508,00
COLOMBIE	988,00	823,35	833,00
EQUATEUR	385,00	107,00	278,00
PARAGUAY	17,00	23,00	1 353,00
PEROU	170,00	75,90	446,00
VENEZUELA	272,00	60,80	224,00
TOTAL	4 834,00	2 610,15	540,00
AMERIQUE CENTRALE			
COSTA RICA	94,00	144,30	1 535,00
CUBA	100,00	28,00	280,00
REPUBLIQUE DOMINICAINE	128,00	41,00	320,00
GUATEMALA	267,00	202,00	757,00
HAITI	34,00	26,00	765,00
HONDURAS	150,00	109,00	727,00
JAMAIQUE	6,00	1,35	225,00
MEXIQUE	584,00	292,00	500,00
NICARAGUA	72,50	34,40	474,00
PANAMA	24,00	10,75	448,00
SALVADOR	162,50	165,00	1 015,00
TRINIDAD	8,00	1,35	169,00
TOTAL	1 630,00	1 055,15	647,00
OCEANIE			
PAPOUASIE-NOUVELLE GUINEE	47,50	62,00	1 305,00
TOTAL	47,50	62,00	1 305,00
GRAND TOTAL	11 082,50	5 645,80	509,50

moyenne à l'hectare n'est que de 208 kg sur le tableau 1, et ce malgré la disponibilité de clones sélectionnés dont les potentialités étaient au moins 10 fois supérieures ; mais ces clones, lorsqu'ils ont été utilisés, ont été mis au champ sans être accompagnés des techniques leur permettant d'exprimer ces potentialités.

Il ne suffit donc pas de disposer de résultats scientifiques marquants pour que la caféiculture se transforme en conséquence. Le message technique n'est évidemment pas parvenu à ses destinataires, la grande masse des paysans.

Certes, le monde rural, plus encore dans les pays tropicaux qu'ailleurs, est un monde difficile d'accès par le nombre des individus qui le composent, par leur dispersion, et par leur niveau technique modeste.

Pourtant, pour pénétrer ce monde paysan, tous les pays s'étaient dotés, sous des formes diverses, d'institutions de développement dont la mission était la diffusion des techniques, la démonstration, le conseil, la mise à disposition des paysans du matériel végétal sélectionné, de l'outillage, des engrais, et des pesticides.

Si ces organismes ont fonctionné d'une façon fort coûteuse, leurs résultats apparaissent bien minces et l'on ne peut que regretter l'absence d'impact de la recherche sur la production qui en est résulté.

IV - LES TENDANCES ACTUELLES

Face à la crise qui frappe la caféiculture depuis 1986, la tendance à un reflux vers une caféiculture à caractère extensif encore plus marqué est relevée par les enquêtes récentes.

Cette tendance va donc encore accentuer la distance entre recherche et pratique.

V - ALORS, QUELLE CAFEICULTURE POUR DEMAIN ?

La réponse dépendra des actions qui seront menées dans le proche avenir et qui devraient tendre, d'une part à faire utiliser les acquis du passé, d'autre part à rechercher les moyens d'alléger les coûts de production et à valoriser le travail des paysans.

1. Valoriser les acquis du passé

a. Le paquet technique existant

Les acquis du passé, comme on l'a vu précédemment, seraient de nature à transformer le visage de la caféiculture si l'on réussissait à les faire accepter par l'immense foule des petits paysans à la traîne qui représentent plus de la moitié de la production mondiale.

Ces paquets techniques cohérents existent aussi bien pour les robusta que pour les arabica et leur transfert devrait être à la base du renouvellement et du rajeunissement du verger qui ont été trop négligés au cours des années précédentes :

- utilisation des meilleurs clones de robusta que l'on sait produire en masse sous forme de boutures, ou des cultivars d'arabica à haute productivité quelquefois déjà dotés d'un certain degré de résistance à l'égard de grands aléas parasitaires (rouille ou CBD en particulier) ;

- mise en pratique des systèmes de taille qui ont fait leur preuve ;

- application d'une fumure minérale adaptée selon les résultats du diagnostic-sol avec de premières tentatives de production endogène d'azote et d'amélioration du sol en matière organique par intégration des légumineuses arborescentes en tant que plantes à mulch ;

- lutte phytosanitaire si nécessaire ;
- valorisation du terrain par des vivriers intercalaires limités aux périodes où le caféier libère de l'espace, c'est-à-dire pendant les deux années qui suivent la plantation ou le recépage ;
- récupération des déchets sous forme de composts après culture de champignons et production de gaz, etc...

Ce transfert devra se faire avec l'idée maîtresse de "**produire mieux sur des surfaces réduites**".

Revenant à ce sujet sur l'attitude des paysans qui, face à la crise, se tourneraient vers un extensif proche de la cueillette, sont-ils bien sûrs qu'il soit plus économique de produire 200 kg de café sur un hectare comptant 1500 pieds, que ces mêmes 200 kg sur à peine une centaine d'arbustes conduits selon les règles d'une intensification raisonnable : d'un côté l'extensif ne coûte certes rien en intrants achetés, mais demande un travail considérable et peu rémunéré pour l'entretien minimum assurant la survie des arbustes et pour faciliter l'accès en vue d'une cueillette qui exigera beaucoup de temps pour peu de produit ; de l'autre côté, on aura 10 à 15 fois moins de surface à entretenir, le travail de récolte exigera un temps infiniment moins long, ce qui devrait compenser largement l'achat des quelques intrants nécessaires, et la surface sous café se trouvera réduite au bénéfice d'autres productions ou d'un reboisement salubre pour l'environnement et source de profit à moyen et à long termes.

b. Comment faire passer le message technique ?

Comment donc faire passer le message technique dans le monde paysan ?

Si les organismes de développement n'ont jusqu'ici pas su le faire, il convient de changer les méthodes d'approche. Leur échec s'explique par le fait que l'on a voulu intervenir d'emblée sur de vastes territoires, d'où une dispersion des efforts sur des populations nombreuses considérées à tort comme réceptives dans leur ensemble, et surtout que l'on ne possédait pas les méthodes de transfert de technologie les mieux adaptées, faute d'avoir une connaissance suffisante du milieu socio-économique auquel on s'attaquait.

Un gros effort doit donc être fait, dans l'immédiat et le futur proche, en multipliant **les opérations de recherche/développement** ayant pour but :

- l'analyse des structures paysannes pour en mieux comprendre le fonctionnement et les contraintes ;
- l'adoption d'une vue systémique des exploitations avec intégration de la caféiculture dans l'ensemble plus complexe qu'elles constituent, ouverture sur la diversification, en ne confondant pas, comme c'est trop souvent le cas, polyculture qui suppose une organisation du terroir pour que chaque production soit placée dans les conditions les plus idéales, et associations culturelles, possibles seulement dans quelques cas bien définis, mais le plus généralement nuisibles à toutes les espèces cultivées ensemble ;
- l'identification des modifications de structure nécessaires en amont (organisation du paysannat pour son accès au crédit), et en aval (organisation pour le traitement du produit et la commercialisation) pour mettre les agriculteurs en position d'adopter les propositions techniques qui leur sont faites, sachant bien que l'adoption de toute innovation nécessite un investissement même modeste ;
- le suivi de l'impact des innovations proposées aux agriculteurs sur l'évolution de l'économie de l'exploitation, ce qui suppose une formation des paysans à la gestion et donc une certaine professionnalisation.

Il faudra que les paysans eux-mêmes soient les véritables acteurs de la mutation envisagée. Ce sont eux qui devront, progressivement, mettre en pratique les innovations proposées. On évitera de faire des démonstrations en stations, irréalistes parce qu'effectuées par des agents rémunérés de l'extérieur, et qui n'ont jamais convaincu personne.

Une expérience conduite au Mexique par le CIRAD montre qu'une telle approche est possible (Opération DIMAC : Développement intégré dans les marges de l'aire caféière Jalapa-Coatepec) : les caféiculteurs, mieux connus dans leur diversité et leurs problématiques variées, peuvent être abordés de façon efficace pour qu'ils se montrent réceptifs, et leur intégration directe aux opérations qui les concernent les conduit à adopter le paquet technique proposé dans sa cohérence et sa globalité.

Les innovations du futur auront d'autant plus de chances d'être bien perçues et adoptées, que l'on aura su faire accepter au préalable le paquet technique disponible aujourd'hui. On n'oubliera pas, en particulier, que des variétés nouvelles créées pour répondre à certaines contraintes, n'auront de sens que si elles sont productives et par conséquent conduites selon les règles leur permettant d'exprimer leurs potentialités. Tout travail de génétique non suivi d'une bonne conduite culturale n'aurait donc aucune signification.

Par ces actions qu'il faudrait multiplier, on peut espérer voir se modifier profondément le paysage caféicole. On n'aura certes pas partout la même caféiculture du fait de la diversité climatique, topographique, sociale, économique des différents pays. Et pour répondre d'avance à ceux qui seraient tentés par une certaine modernité à tous prix, il est clair que l'on ne peut pas sans déraison, envisager de transposer partout les pratiques pourtant séduisantes de la jeune caféiculture australienne.

Il convient que, partout où il est accessible, le travail humain soit privilégié plutôt que la machine, afin d'éviter d'accentuer un exode rural sans justification objective qui ne fait qu'aggraver la situation dans des villes n'offrant aucun emploi et par conséquent aucune possibilité de vie régulière.

Mais on fera bien de s'inspirer de la démarche qui a conduit les Australiens à analyser la situation qui leur est propre pour inventer une caféiculture originale adaptée à leurs conditions socio-économiques bien particulières.

2. Le rôle de la recherche dans le futur proche

Si les acquis du passé peuvent apporter un progrès réel, la recherche devra, dans le même temps, s'attacher à **trouver les moyens d'alléger les coûts de production et de valoriser le travail humain.**

En restant très réaliste, on peut tracer les axes majeurs que devraient suivre les recherches dans l'avenir immédiat, pour serrer au plus près les besoins des caféiculteurs, leur permettre de réduire les coûts de production tout en valorisant au mieux leur travail.

a. Création de variétés résistantes aux maladies, aux nématodes et aux insectes

Les contraintes imposées à la caféiculture, particulièrement d'arabica, par les maladies cryptogamiques et les ravageurs, conduisent à proposer un programme d'amélioration du matériel végétal privilégiant l'acquisition du maximum possible d'autodéfense, pour libérer le paysan de la lutte chimique coûteuse, contraignante et polluante.

Cette orientation a déjà été prise et a abouti à un résultat exploitable dans la lutte contre la rouille orangée avec la création des Catimors et autres Colombia dotés du même système de résistance spécifique.

Il convient d'intensifier les recherches commencées au CIRAD pour l'exploitation des formes de résistance non spécifique contre ce pathogène, à terme en principe plus durable, et pouvant conduire à l'obtention d'un matériel végétal plus diversifié et donc adapté à une gamme élargie de situations.

On utilisera les sources variées de résistance offertes par les géotypes arabica éthiopiens récoltés par l'ORSTOM, et qui se montrent riches de possibilités, ainsi que les sources diverses, également identifiées chez les autres espèces, le Canephora en particulier.

On formulera la même recommandation pour l'antracnose des baies ou CBD, les sources naturelles de résistance étant déjà en partie identifiées dans ce même matériel végétal.

Le contrôle des nématodes trouvera aussi une solution génétique, soit en gérant au mieux la diversité spécifique, soit en utilisant les résistances récemment révélées chez les arabica éthiopiens.

Si la résistance aux insectes est plus problématique, une moindre attractivité de certains génotypes et sans doute plus accessible, comme on a pu le voir récemment avec le scolyte du grain *Hypothenemus hampei* : il y a là une possibilité d'esquive que l'amélioration génétique doit inscrire dans ses objectifs.

Ces propositions reposent sur l'exploitation, par les voies de l'amélioration génétique traditionnelles, des caractéristiques naturelles du matériel végétal actuellement à la disposition des chercheurs. Rien ne pourra être fait cependant, si le matériel végétal en collection en Côte d'Ivoire, au Cameroun, en Ethiopie, au Brésil, en Colombie, n'est pas, grâce à un statut international, mis à la disposition de la communauté scientifique. Faute d'une telle mesure, il risque de disparaître, sans bénéfice pour personne. Les méthodes modernes d'analyse du génôme sont de nature à apporter une aide précieuse dans le choix du matériel végétal à utiliser dans ces programmes. Les biotechnologies doivent permettre de gagner du temps : la maîtrise du microbouturage *in vitro* a déjà été obtenue pour un grand nombre de génotypes, on n'est pas loin de maîtriser l'embryogenèse somatique. Ces deux formules de multiplication végétative autoriseront l'utilisation, dès la F1 ou la F2, des sujets présentant les caractéristiques souhaitées, sans avoir, comme par le passé, à attendre des générations avancées longues à obtenir et à fixer.

Les travaux menés dans ces domaines au cours des dix ou quinze années précédentes offrent donc des outils performants pour l'accélération de ceux que l'on peut envisager aujourd'hui.

Pour une étape ultérieure, le génie génétique renforcera encore les possibilités d'obtention d'un matériel végétal résistant aux maladies, nématodes et insectes. N'est-on pas déjà sur la voie de la transformation génétique en vue de l'introduction de gènes de résistance aux insectes dans le génôme du caféier ? Il convient de travailler dans cette voie qui élargira grandement les possibilités.

Priorité donc à l'amélioration des plantes et aux biotechnologies pour apporter aux problèmes posés par les grands aléas parasitaires et les ravageurs, des solutions durables, non contraignantes, non coûteuses et non polluantes.

Le généticien devra travailler en étroite coopération avec le phytopathologiste, l'entomologiste et le nématologiste qui auront pour tâche d'identifier avec précision, par les méthodes modernes de diagnostic qu'offre l'analyse enzymatique ou génomique, les espèces responsables des dégâts afin qu'on ne se trompe pas d'adversaire, d'en caractériser la virulence et l'agressivité, de définir les critères d'appréciation des réactions de la plante, de les mesurer, d'identifier leur nature.

b. Lutte biologique

Mais place aussi aux recherches sur la lutte biologique contre les ravageurs. Il convient d'intensifier, et de mener à terme les travaux conduits depuis quelques années sur les parasitoïdes du scolyte du grain, et de s'engager dans la recherche des parades de même nature à l'égard des autres insectes.

Lutte génétique et lutte biologique associées apporteront dans un délai de 5 à 10 ans, une aide considérable aux paysans en les libérant de lourdes sujétions et de dépenses monétaires importantes.

c. Réduire le coût des fertilisants

Si l'azote est l'élément majeur de la production caféière, il est coûteux ; l'expérience des Costariciens, dont j'ai déjà parlé comme d'un résultat transposable, montre qu'une partie au moins de l'azote nécessaire peut être produite sur place, grâce aux légumineuses arborescentes que sont les Erythrines. Des travaux pour améliorer la capacité de production d'azote de ces plantes, avec sélection des souches de *Rhizobium* les plus actives et les mieux adaptées à chaque espèce et à chaque type de sol devraient leur permettre de jouer un rôle important dans la réduction des intrants achetés et dans la conservation des qualités du sol. D'autres essences pouvant jouer le même rôle et adaptées aux différentes situations sont à rechercher ; toutes les autres méthodes de production endogène d'azote doivent faire l'objet de recherches.

d. Valoriser les sous-produits

On recherchera aussi la possibilité de valoriser les sous-produits de la culture.

Suivant la voie tracée récemment par certaines expériences conduites en Amérique Centrale et au Mexique (DIMAC), on améliorera la récupération d'une énergie non négligeable à la sortie des digesteurs destinés à traiter l'eau résiduaire des stations de dépulpage, pour éviter la pollution des rivières. Des mises au point sont encore nécessaires.

Culture de champignons sur les pulpes, recyclage de ces déchets comme source d'éléments fertilisants sont autant d'éléments qu'il convient, par des expériences spécifiques, de mettre à la disposition des petits exploitants.

e. Avoir des cafés de meilleure qualité pour vendre mieux

La génétique peut encore améliorer la productivité, mais, s'agissant principalement du robusta, c'est sans doute l'amélioration qualitative du produit qu'elle doit inscrire en priorité à son programme pour la part qui peut lui revenir : de bons indices permettent de penser que l'amélioration clonale des robusta peut apporter un plus non négligeable dans ce sens.

On n'oubliera pas non plus qu'on détient, avec l'hybride interspécifique Arabusta, un caféier de basse altitude ou d'altitude moyenne fournissant un produit de qualité : tout ce qui peut être fait pour corriger ses défauts de fertilité, sa vigueur excessive et son attractivité pour les insectes, doit être fait pour achever l'oeuvre commencée en faveur des pays où, faute d'altitude, l'arabica ne pourra pas s'implanter.

f. Réduire les coûts des soins culturaux

Dans le paquet technique actuellement disponible, figure le recépage cyclique.

Cette méthode de taille pourrait cependant ne pas être indéfiniment considérée comme la formule la plus idéale. Des méthodes moins drastiques comme l'étêtage annuel semblent en effet s'être montrées aussi performantes dans certains cas : pour le robusta par exemple, le recépage cyclique est bien adapté aux variétés ne produisant que des rameaux primaires, et les meilleurs clones actuellement disponibles ont été sélectionnés en les conduisant selon ce système ; mais on peut envisager le simple étêtage annuel pour les génotypes qui ont une architecture différente, avec frondaison riche en secondaires et tertiaires.

Une nouvelle sélection sur ce type d'arbustes est à entreprendre afin d'alléger la gestion des plantations par réduction du coût de la taille. Il conviendra cependant de bien s'assurer, à rendement comparable, que l'on tire un réel profit d'une taille annuelle sans doute relativement légère, mais répétitive, par rapport au recépage cyclique, certes lourd mais ne revenant qu'à intervalle de plusieurs années.

Pour de tels travaux comparatifs, comme pour beaucoup d'autres, l'aide de la modélisation devrait être précieuse, afin de ne pas avoir à suivre pendant des années et des années des hectares d'essais.

On prendra soin aussi d'éviter que les plantations ne soient installées dans des situations défavorables aux plans climatique et topographique, rendant leur avenir problématique et leur suivi particulièrement difficile. Une étude de zonification pour éliminer les sites inadaptés (sécheresse, relief...) devrait être inscrite dans les préoccupations des décideurs de chaque pays.

g. Simplifier la récolte

La récolte est l'un des principaux postes de dépense pour le caféiculteur. Elle doit être faite par plusieurs passages successifs pour ne ramasser que les fruits mûrs du fait de l'étalement de la maturation malgré une floraison généralement groupée.

Une maturation homogène autorisant un seul passage de cueillette simplifierait évidemment la récolte et en réduirait grandement les coûts. Une maturation groupée est aussi indispensable pour la récolte mécanique : les fouetteurs qui ont été expérimentés et qui pourraient être utilisables en petites plantations, pourraient apporter une aide aux paysans, s'ils n'étaient, dans les conditions actuelles, destructeurs de fruits immatures. Dans les pays où la récolte se fait à l'aide des machines lourdes, on a une certaine perte en quantité et en qualité, par le fait que l'on récolte une proportion de fruits verts due à la maturation échelonnée.

Sans doute, là encore, la solution peut-elle être trouvée par la génétique, mais des travaux de physiologie devraient y contribuer.

3. La caféiculture de demain

On devrait donc, grâce aux efforts de valorisation des acquis du passé et à l'aboutissement des programmes de recherche qui viennent d'être proposés dans leurs grandes orientations, être en mesure d'offrir aux agriculteurs les moyens d'une caféiculture performante à des coûts réduits caractérisée par :

- un matériel végétal résistant aux principaux parasites et ravageurs actuels et ne nécessitant plus de protection coûteuse ;
- dans certains des méthodes de lutte biologique ;
- une réduction des intrants achetés tant au niveau des pesticides qu'au niveau des fertilisants ;
- un enrichissement du sol en matière organique permettant une meilleure utilisation des engrais ;
- une réduction des frais de culture et de cueillette ;
- des revenus supplémentaires tirés des sous-produits et d'une meilleure qualité du produit.

Par toutes ces voies, on pourra avoir un degré d'intensification raisonnablement consommateur d'intrants monétaires, et se rapprochant de l'utopique "sustainability" des auteurs britanniques.

Ce qui est proposé là n'est peut-être pas révolutionnaire, mais est parfaitement réaliste, et surtout réalisable en dix à vingt ans.

Pour conclure, nous dirons que la caféiculture pourrait, dans un avenir proche, tendre à s'aligner dans son ensemble sur les plus beaux exemples d'exploitations caféicoles que l'on puisse rencontrer aujourd'hui, **pourvu qu'un gros effort soit fait dans le sens du transfert en milieu paysan du paquet technique disponible**. Elle

verra ensuite ses coûts de production s'alléger grâce à des innovations que l'on est en droit d'attendre raisonnablement de la recherche à court et moyen termes.

Mais rien de tout cela ne sera possible si le prix payé aux caféiculteurs ne correspond pas à une juste rémunération de leur travail. Pour mettre fin à la crise actuelle :

- il faudra que les pays producteurs s'entendent clairement sur une politique de production et de commercialisation afin que l'offre ne dépasse pas la demande, et que, d'eux-mêmes, ils se mettent à l'abri de la surproduction ;
- il faudra aussi que, par des accords entre producteurs et consommateurs, un rééquilibrage des forces puisse s'établir.

Mais cela est un autre débat qu'il faut rapidement mener à son terme sous peine de voir la caféiculture, malgré tous les efforts des chercheurs et des développeurs, s'inscrire dans une économie de cueillette et les pays producteurs condamnés à gérer leur misère, ou à renoncer.

* *
 *



Figure 1 : Cafés robusta sous forêt éclaircie en Angola.

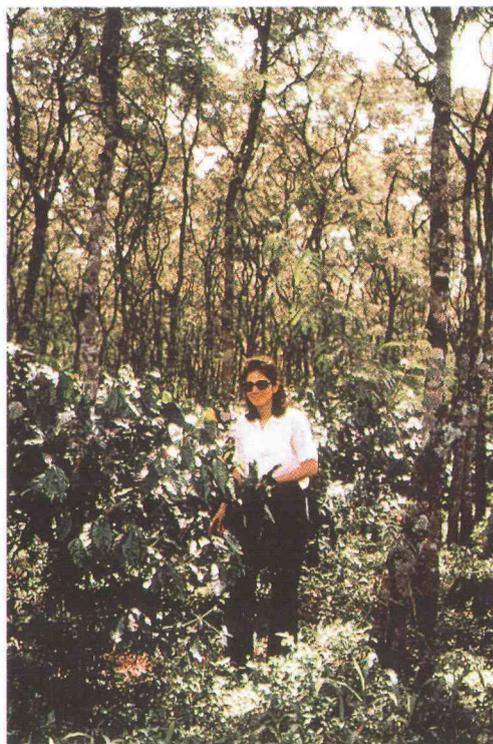


Figure 3 : Forêt abritant une caféière d'arabica dans les Andes Vénézuéliennes.

Figure 2 : Forêt abritant une caféière d'arabica dans les Andes Vénézuéliennes.

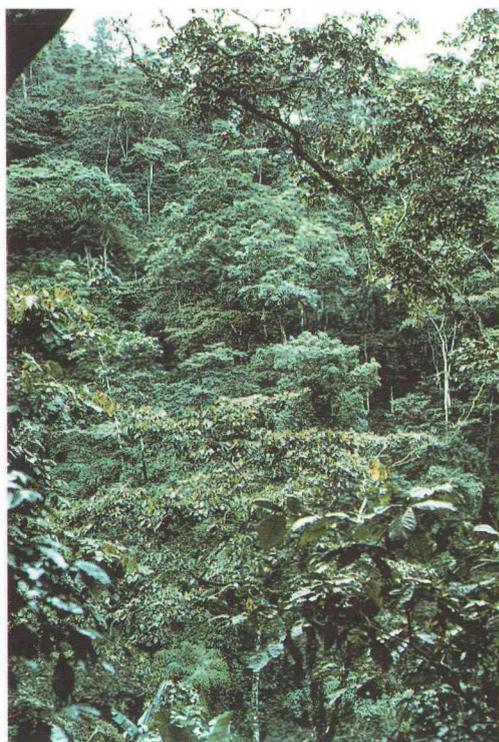


Figure 4 : Plantation d'arabica en plein ensoleillement au Guatemala.



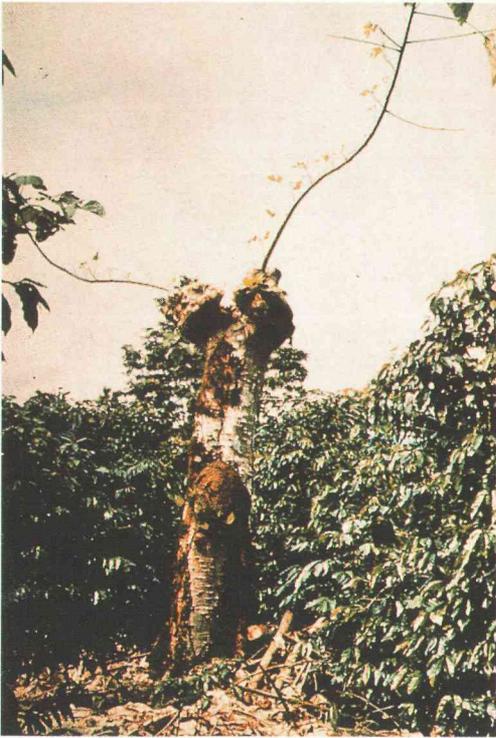


Figure 5 : *Erythrina glauca* fortement taillée pour apporter au sol matière organique et azote, au Costa Rica.



Figure 7 : Bouture d'un clone sélectionné de robusta au Cameroun.

Figure 6 : Recépage par ligne au Costa Rica : on voit ici différents stades de reconstitution de la plante.



Figure 8 : Plant de Caturra, obtenu par microbouturage *in vitro* au Costa Rica.



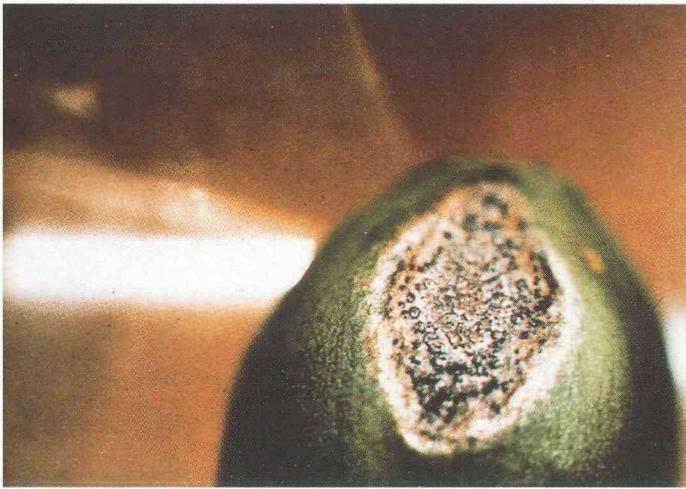


Figure 9 : Jeune fruit d'arabica atteint de CBD (Coffee Berry Disease) due à *Letotrichum coffeanum* sensu Hindorf, au Cameroun.

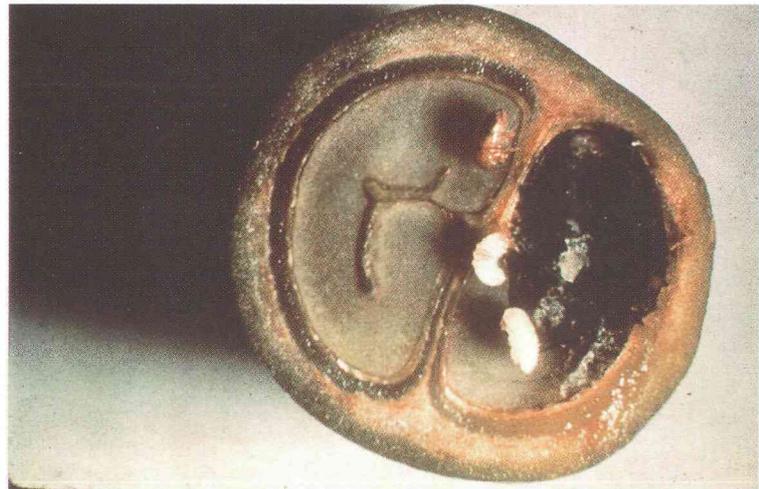


Figure 11 : Coupe d'un fruit attaqué par le Scolyte du grain (*Hypothenemus hampei*).

Figure 10 : Attaque de nématodes au Costa Rica.



Figure 12 : Pourridié des racines et du collet (*Clitocybe elegans*) au Cameroun.





Figure 13 : Récolteuse mécanique en Australie.



Figure 14 : Caféiers sauvages en Ethiopie.

Figure 20 : Plantation à la machine, en Australie.



Figure 15 : Arabica rencontrés en plantation dans les Andes Vénézuéliennes.





Figure 16 : Arabica sous ombrage dense au Vénézuéla.



Figure 18 : Belle plantation d'arabica sans ombrage au Cameroun.

Figure 17 : Arabica en association avec des cultures vivrières au Cameroun (à Bamiléké).



Figure 19 : Costa Rica : plantation en courbes de niveau avec fossés antiérosifs, et trous aveugles destinés à briser le ruissellement.



HYBRID SEED PRODUCTIVE IN ARABICA COFFEE : CONSEQUENCES OF ISOLATION TECHNIQUES IN PREVENTING ALIEN POLLEN CONTAMINATION

C. O. AGWANDA

Coffee Research Foundation, P.O. Box 4, Ruiru, Kenya

INTRODUCTION

The Coffee Research Foundation of Kenya (CRF) has since 1985 incorporated the use of resistant cultivars to combat Coffee Berry Disease (CBD) problems. Cultivar Ruiru 11, an arabica coffee hybrid which combines the desired CBD resistance with high yield and good liquor quality was therefore released to the farmers in 1985 for commercial use.

Its propagation is mainly through hybrid seeds though vegetative methods of propagating the variety is now in place. Manual methods of artificial emasculation and cross-pollination are applied. Emasculation of the mother trees is effected by manual removal of the corolla together with the stamen 1-4 days before anthesis. The emasculated flowers are then protected from uncontrolled cross-pollination by a pollen barrier made either from muslin cloth or grease proof tracing paper. Muslin cloth bags supported on metal frames are used when whole trees are to be isolated while paper bags made from grease proof tracing paper are used when single branches have to be isolated separately.

The concern of this work was therefore to study the effects of the two isolation techniques on preventing undesired insect mediated cross-pollination on our commercial hybrid seed production orchards.

Experimental layout and Results

The studies were sited on our commercial hybrid seed farms located at the Coffee Research Station, Ruiru. The first set of experiments was aimed at determining whether emasculation and pollination had any effect on the activity of honey bees in the seed fields. Three neighbouring trees with expected good blossoming were selected 4 days before anthesis. One tree was emasculated but not pollinated on the day of anthesis. The second tree was emasculated and later pollinated on the day of anthesis. The third tree was not emasculated. The number of bees visiting the three trees were scored between 6.00 am and 6.00 pm in the evening for a period of 10 days starting from the day of anthesis. The experiment was replicated six times over the seed production season.

The second set of experiments was aimed at determining whether any uncontrolled cross-pollination could still occur despite the use of the two isolation techniques, and if so, to determine the proportion of the resultant contamination that could be attributed to activities of the honey bees. Eight neighbouring

trees were selected four days, before anthesis and treated as shown in Table 1.

Table 1
A description of treatments used to determine the level of insect mediated hybrid seed contamination in arabica coffee

Tree No.	Treatment No.	Description
1	1	Tree not emasculated, not isolated and not pollinated.
2	2	Tree emasculated, not isolated not pollinated
3	3	Tree emasculated, not isolated pollinated
4	4	Tree emasculated, isolated using muslin cloth, not pollinated
5	5	Tree emasculated, isolated using paper bags, not pollinated
6	6	Tree emasculated, double isolated using muslin cloth and a 1 mm wire gauze, not pollinated
7	7	Tree emasculated, isolated using muslin cloth, pollinated
8	8	Tree emasculated, isolated using paper bags, pollinated.

The results of the bee activity experiments are shown in figure 1. Two observations can be made from these results.

First, the results indicated that emasculating of coffee trees by completely removing the corolla and the stamens significantly ($P = 0.05$) reduce the number of expected visits to the tree by honey bees. Nevertheless, the number of visits to the emasculated trees remained appreciably high. The second observation was that pollination of the emasculated trees tended to increase the frequency of visits to a tree by the honey bees. This effect was however insignificant.

Results from the second set of experiments is shown in Table 2. It can be observed that isolation using paperbags completely eliminated uncontrolled cross-pollination. Isolation using muslin cloth could still allow uncontrolled out-crossing of upto 11%; 9% of which could be directly related to bee activity. This level of contamination was however insignificant.

From the two experiments, it can be concluded that bees are an important source of seed contamination in commercial hybrid seed farms in arabica coffee. The use of paperbags as isolation means would therefore be preferred in attempting to reduce the insect mediated seed contamination. Our experience in Kenya however indicate that total reliance on paperbags may reduce the efficiency of a seed programme for two reasons. First, the supply of weather resistant paperbags tends to be unreliable and therefore requires stocking well in advance of the seed production activities. The bags can also not be reused and therefore financially more expensive in the long run. The use of muslin cloths for whole tree isolation on the other hand enhances the rate of emasculating by about two times and at the same more efficient in utilizing the available flowers since no flowers are wasted due to limitations in flower orientation and location as would be the case with single branch isolation using paperbags.

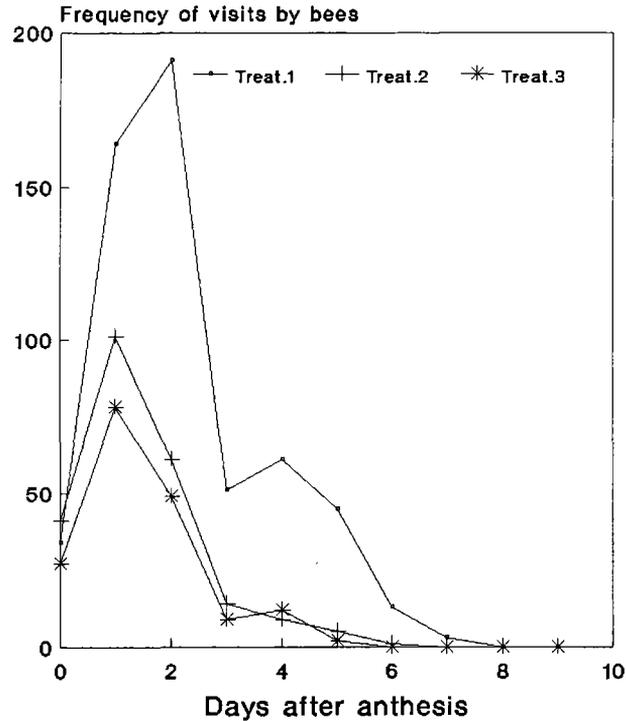


Fig.1 Frequency of visits by honey bees in the seed fields

Table 2
Observed fruitset and mean separations for the eight treatments as described in table 1

	Treatments*							
	1	2	3	4	5	6	7	8
% fruit set	27.49	41.76	59.00	9.75	0.00	1.81	62.15	73.45
Mean separation	A	AB	AB	AB	B	B	AB	A

LSD = 69.54

Significance level: P = 0.05

Summary

Mass propagation of hybrid seeds in *Coffea arabica* L. requires adequate isolation to prevent seed contamination through uncontrolled cross-pollination. The hybrid seed programme in Kenya relies both on the use of paper bags for single branch isolation and on muslin cloth mounted on a metal frame to isolate whole trees. This paper reports initial results of work to determine the effectiveness of the two isolation techniques in preventing insect mediated cross pollination in a hybrid seed production orchard.

Acknowledgement

This paper is published with the permission of the Director of Research, Coffee Research Foundation, Ruiru, Kenya.

L'OBTENTION D'UNE CORE COLLECTION DE CAFÉIERS. DÉFINITION DES GROUPES D'ÉCHANTILLONNAGE ET MÉTHODOLOGIE

M. NOIROT, S. HAMON, F. ANTHONY *

Laboratoire de Ressources Génétiques et d'Amélioration des Plantes Tropicales, ORSTOM,
BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1, France

* CATIE, Apartado 59, 7170 Turrialba, Costa Rica

Vavilov (1935) fut dans les premiers à montrer l'importance des ressources génétiques pour l'amélioration des plantes cultivées. L'évaluation de la diversité des populations ne fut entreprise cependant que quelques décennies plus tard sous l'impulsion notamment de Harlan (1970), de Frankel et Bennet (1970) et de Pernès (1984). La collecte systématique d'échantillons ne tarda pas à poser des problèmes de gestion et de conservation. La plupart des collections devinrent trop grandes, difficilement régénérables, peu manipulables et par conséquent peu utilisées en amélioration. Frankel et Brown (1984) furent les premiers à mettre en exergue le besoin de disposer d'une collection de référence et proposèrent la notion de "Core collection". Mettre en place une core collection consiste selon ces auteurs à obtenir un sous-échantillon de la collection de base présentant un maximum de diversité. Avec 10% d'une collection, il est possible de conserver 75 % de la diversité allélique (Brown, 1989).

Chez les caféiers, les prospections réalisées de 1966 à 1987 en Afrique tropicale et équatoriale (Ethiopie, Kenya, Tanzanie, Centrafrique, Cameroun, Congo, Côte d'Ivoire et Guinée) amenèrent aussi un afflux important de génotypes actuellement conservés en champs¹. Trois pays - Côte-d'Ivoire, Ethiopie et Madagascar - ont à leur charge la conservation respective des collections de caféiers diploïdes africains, de *C. arabica* et des caféiers de la région malgache. A titre d'exemple, la collection entretenue par le Centre des Ressources Génétiques caféières de Côte-d'Ivoire comprend à elle seule 7800 génotypes appartenant à une vingtaine de taxons différents (Anthony, 1992). Le maintien à long terme de ces trois collections de base et leur circulation entre les continents justifient la création d'une core collection de caféiers.

Le problème est alors de choisir la méthodologie de prélèvement et les caractères qui expriment la diversité. C'est ce que nous nous proposons d'étudier dans cette communication.

LE CHOIX DE LA PROCEDURE D'ECHANTILLONNAGE

Les collections présentent souvent un polymorphisme polymodal. La présence d'une telle structure, mais aussi son évaluation va conditionner le choix de la procédure d'échantillonnage (stratifié ou non). L'effectif retenu et le type de prélèvement (aléatoire ou non) sont aussi des caractéristiques importantes de la procédure.

¹Les semences de caféiers sont récalcitrantes à la conservation en chambre froide

La stratification de l'échantillonnage d'après l'organisation des individus en groupes

Lorsque les données existent, le choix des accessions doit se faire après leur structuration en groupes (Frankel et Brown, 1984). D'après ces auteurs, la construction des groupes fait intervenir dans l'ordre suivant: l'origine, la systématique, les isozymes (c.a.d. les marqueurs génétiques), puis les caractères qualitatifs et quantitatifs et enfin, l'information bioclimatique et biogéographique.

Il nous semble important de mettre en première position la structure génétique des populations, telle qu'elle est définie par les barrières à la reproduction, pour la création des groupes d'échantillonnage. Lorsque ces données sont manquantes, la systématique devrait servir de référence. L'information bioclimatique et biogéographique doit ensuite permettre d'affiner la structure en établissant des sous-groupes auxquels correspond une différenciation (sous-espèces, écotypes).

Chez les caféiers diploïdes africains et dans l'état actuel de nos connaissances sur l'hybridation interspécifique (Louarn, 1992) et la systématique (Chevallier, 1947; Leroy, 1980; Bridson et Verdcourt, 1988), ces critères permettent d'identifier 24 groupes principaux correspondant à 15 taxons botaniquement décrits: *C. affinis*, *C. brevipes*, *C. canephora*, *C. congensis*, *C. eugenioides*, *C. fadenii*, *C. humilis*, *C. kapakata*, *C. liberica* var. *liberica*, *C. liberica* var. *dewevrei*, *C. pseudozanguebariae*, *C. racemosa*, *C. salvatrix*, *C. sessiliflora*, *C. stenophylla*, auxquels se rajoutent 9 taxons indéterminés. Pour certains taxons qui sont répartis sur une zone géographique importante (*C. canephora*), il est possible de créer des sous-groupes d'échantillonnage (guinéens et congolais [Berthaud, 1986]). Ceci s'applique aussi aux taxons avec populations isolées géographiquement comme *C. stenophylla* (Berthaud, 1986).

L'effectif échantillonné

La taille d'une core collection a longtemps été sujet à discussion (Frankel et Brown, 1984). Néanmoins, s'appuyant sur le modèle d'allèles neutres (Kimura et Crow, 1964) et la théorie d'échantillonnage, Brown (1989) montre qu'avec 10% de la collection de base, 80% des allèles peuvent être échantillonnés au risque statistique de 5%. Ces résultats ne sont pas influencés par la forme de la distribution de fréquences des allèles à chaque locus.

La taille de chaque sous-échantillon à l'intérieur de la core collection a aussi été étudiée (Brown, 1989). Trois méthodes ont été proposées: 1) le même nombre d'accessions dans chaque groupe; 2) un nombre proportionnel à la taille du groupe et 3) un nombre proportionnel au logarithme de la taille du groupe. D'après Brown, cette troisième solution constitue un bon compromis. Prélever un effectif différent selon les groupes et qui suit une relation logarithmique nous paraît à première vue acceptable. Néanmoins, cette option suppose une relation entre l'effectif et la diversité génétique du sous-groupe. Il arrive que de petits groupes (*C. sessiliflora*) soient plus variables que d'autres beaucoup plus grands (*C. arabica*). L'application de la solution préconisée par Brown aboutit alors un biais important par rapport à notre but qui est, ne l'oublions pas, de réunir le maximum de diversité. En fait, il nous semble préférable de définir l'effectif des sous-groupes par rapport à leur propre variabilité.

Le type de prélèvement

Traditionnellement, le prélèvement des individus destinés à la core collection se fait de manière aléatoire soit sur l'ensemble de la collection (cas où l'organisation en groupes est inconnue ou absente) soit dans chacun des groupes préalablement définis. Un tel échantillon a pour avantage d'être représentatif au sens statistique de la collection de base, ce qui n'implique pas qu'il soit représentatif de la population prospectée. Pour cela, il faut que la collection de base soit elle-même un échantillon aléatoire et simple des populations initiales. Ce biais inférentiel existe déjà très souvent de manière implicite dans la méthode de prospection pour les populations naturelles et de manière évidente pour les espèces cultivées.

En fait, pour la grande majorité des utilisateurs d'une core-collection, le principal problème est d'éviter les redondances de génotypes (doublons). La présence de tels doublons est liée au mode de reproduction. Rares chez

les allogames, ils sont très fréquents chez les autogames et deviennent la règle chez les espèces apomictiques ou à multiplication végétative.

Sur ces considérations, Hamon, Noirot et Anthony (1993) ont proposé une autre méthodologie dont le but est effectivement de maximiser la diversité de l'échantillon. Le principe en est simple et la méthode s'applique à tout ensemble d'individus caractérisés par plusieurs variables quantitatives. Dans une première étape, elle consiste à effectuer une analyse en composantes principales des données afin d'obtenir de nouvelles variables indépendantes (les facteurs) et d'éliminer la variabilité résiduelle (les facteurs d'inertie inférieure à 1). Dans une seconde étape, chacune des composantes retenues est pondérée par sa variabilité (en l'occurrence par la racine carrée de sa valeur propre) afin qu'elles aient le même impact dans le calcul des distances entre individus. Nous remarquerons que ces deux premières étapes permettent d'éliminer la colinéarité des variables initiales. La troisième étape consiste à prélever les individus qui contribuent le plus à la variabilité de la core collection (la variabilité est mesurée sur ces composantes centrées et réduites). Ceci revient à prélever les individus situés à la périphérie du nuage de variabilité.

Pour être efficace, cette méthode suppose une influence modeste du milieu sur les caractères pris en considération. Dans le cas contraire, le prélèvement peut être considéré comme quasi-aléatoire vis-à-vis des allèles qui interviennent dans l'élaboration du phénotype.

La méthode repose aussi sur un postulat d'additivité généralisée. Elle implique en effet que tous les individus intermédiaires puissent être réobtenus par croisement. Pour cela, la structure génétique doit être connue et les niveaux des barrières à la reproduction doivent avoir été estimés.

Enfin, il est possible d'y appliquer les règles qui définissent l'effectif du prélèvement, c'est à dire retenir par exemple 10% de la collection de base. Dans tous les cas, la variabilité de la core collection sera supérieure ou égale à celle issue d'un échantillonnage aléatoire est simple. Il est aussi possible de définir d'autres critères de décision pour l'arrêt des prélèvements. Celui-ci peut être décidé par exemple d'après l'évolution de la variabilité prélevée au fur et à mesure des tirages.

La principale objection à l'utilisation de cette méthode résulte du fait que la core collection n'est pas représentative de la collection de base au sens statistique du terme, ni de la population prospectée. Mais était-ce déjà le cas pour cette dernière ?

Cette méthode a déjà été testée sur le taxon *C. liberica*. (Hamon, Noirot et Anthony, 1993). Elle va être appliquée aux autres taxons de caféiers et pourrait aussi être étendue aux variables qualitatives. Ceci nécessite seulement un changement de métrique dans le calcul des distances et de méthode réductionnelle multivariée (Analyse factorielle des correspondances à la place de l'analyse en composantes principales, ou encore analyse en coordonnées principales).

LE CHOIX DES CARACTERES

Dans le paragraphe précédent, nous avons évoqué les caractères qui permettent de structurer la variabilité en groupes comme la fertilité des hybrides, ainsi que les données écologiques et climatiques qui conduisent à différencier les écotypes. Il existe un autre groupe de caractères utilisés pour la création d'une core collection: ceux qui servent à mesurer la diversité de ces groupes.

Pour évaluer la diversité, Frankel (1974) fait la distinction entre 1) les caractères à déterminisme connu pour lesquels l'identification du génotype à partir du phénotype est relativement simple (caractères souvent monogéniques ou oligogéniques, tels que les résistances aux maladies et les colorations anthocyanées) et 2) les caractères au déterminisme génétique inconnu et pour lesquels les croisements entre phénotypes ne permettent pas facilement d'établir le génotype (caractères polygéniques, sujets aux variations environnementales). Les premiers sont souvent considérés comme de bons marqueurs d'identification, et certains, comme les résistances aux maladies,

montrent un intérêt indéniable en amélioration génétique. A l'inverse, les caractères quantitatifs, comme le rendement par exemple, se caractérisent souvent par un intérêt économique (Frankel et Brown, 1984).

Les isozymes appartiennent au premier groupe et ont souvent été utilisés dès les années 1980 dans l'estimation de la diversité et la création d'une core collection. Brown (1989) distingue 4 types d'allèles:

- les allèles communs et largement dispersés; ils seront inclus dans la core collection même avec un échantillonnage de 10%;
- les allèles rares et localisés; leur inclusion est très aléatoire;
- les allèles rares et largement dispersés; leur insertion dans la core collection dépend de la taille de la core collection;
- les allèles communs et localisés; la prise en compte des critères bioclimatiques et biogéographiques dans la structuration des groupes avant l'échantillonnage doit aboutir à leur prélèvement.

Néanmoins, l'utilisation des marqueurs isozymiques dans l'estimation de la diversité est sujet à discussion: 1) cette diversité n'est pas nécessairement corrélée à la diversité morphologique; 2) elle reflète plus la phylogénie que l'adaptation; 3) son intérêt économique est souvent moins important (Davis et Gilmartin, 1985), 4) la divergence morphologique peut précéder la divergence enzymatique (Crawford, 1985) et ceci est le cas chez *C. arabica* par exemple. Enfin, dans de nombreux cas, les seules données dont on dispose sont des données d'évaluation quantitatives.

Les données quantitatives présentent en revanche, comme Frankel l'a signalé, le désavantage de mesurer la diversité phénotypique, c'est à dire la diversité génétique et celle du milieu. Néanmoins, ces caractères soumis à la sélection naturelle montrent un polymorphisme dont l'intensité reflète la diversité des conditions dans lesquelles ils ont été sélectionnés. De ce fait, ils constituent un intérêt indéniable lors de l'utilisation des ressources génétiques.

EXEMPLE D'OBTENTION D'UNE CORE-COLLECTION A L'INTERIEUR DU GROUPE *C. LIBERICA* VAR. *LIBERICA*

Pour tester notre modèle, nous avons appliqué la procédure de sélection à l'ensemble des 338 géotypes de *C. liberica* originaires d'Afrique centrale. Maintenus dans une collection au champ à Divo (Côte-d'Ivoire), ils ont été caractérisés par 12 descripteurs quantitatifs concernant la morphologie, la technologie, la fertilité, la biochimie et l'agronomie (tableau 1).

Tableau 1: Descripteurs utilisés pour la création de la core collection de *C. liberica*

DESCRIPTEURS	CODE	Moyenne	CV (%)	Dissymétrie	Applatissement
Longueur de la feuille (cm)	LOFE	21,8	10,2	-0,3	1,2
Largeur de la feuille (cm)	LAFE	10,4	13,1	0,3	0,4
Diamètre du tronc, 6 années après plantation (cm)	CCOL	30,4	16,5	-0,2	0,6
Hauteur de la première ramification (cm)	HPLA	49,5	21,9	0,0	0,6
Diamètre maximum de la jupe	JUPE	9,6	20,0	-0,7	1,7
Hauteur totale de l'arbre	HAUT	10,5	28,1	-0,4	0,0
Production de cerises mures (kg)	PROD	31,4	53,5	0,4	0,6
Poids de 100 grains à 12% d'humidité (gr)	P100	14,4	20,3	0,4	0,2
Rendement en café marchand (%)	TRDM	15,7	15,5	-0,2	0,6
Teneur en caféine des grains (%)	CAFE	1,2	21,7	1,4	3,3
Taux de caracoli (%)	TCAR	28,7	50,3	0,9	0,8
Remplissage des cerises (%)	TREM	71,8	13,1	-0,4	0,0

Sauf pour la teneur en caféine, les descripteurs ont une distribution symétrique. Le coefficient de variation est généralement inférieur à 10% excepté pour les caractères liés à la production de café. L'analyse en composantes

principales indique que 3 facteurs principaux doivent être utilisés. Ils ont les significations suivantes : axe 1 (30 %) port de la plante et vigueur, axe 2 (15 %) fertilité de la plante et axe 3 (12 %) polymorphisme des feuilles (tableau 2). La distribution des génotypes le long des axes ne révèle pas visuellement la présence de sous-groupes. Les méthodes de classification, suivies par l'analyse discriminante, confirment l'absence de sous-groupes et valide l'hypothèse d'un seul groupe de diversité.

Tableau 2: Contributions relatives des variables sur les 3 premières composantes principales.

Axe / Descrip.	LOFE	LAFE	DCOL	CCOL	HAUT	JUPE	HPLA	P100	TRDM	TREM	TCAR	CAFE	PROD
1 (29.9%)	0,90	0,12	0,64	0,70	0,66	0,36	0,11	0,20	0,25	0,23	0,11	0,00	0,39
2 (15.2%)	0,10	0,01	0,15	0,16	0,03	0,10	0,02	0,03	0,32	0,58	0,55	0,02	0,00
3 (12.8%)	0,71	0,70	0,23	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02	0,02	0,04	0,10	0,02
Total (3 axes)	0,81	0,83	0,82	0,86	0,69	0,46	0,14	0,23	0,59	0,83	0,70	0,12	0,41

La cinétique de sélection de la variabilité est présentée sur la figure 1. La courbe (a) montre que la sélection de 10 % des génotypes (les plus variables) correspond à 30 % de l'inertie (équivalent à une somme des carrés généralisée). Le niveau 50 % d'inertie est atteint avec 25 % des génotypes. Nous observons aussi que l'inertie sélectionnée par cette méthode est plus grande que dans le cas d'un prélèvement strictement aléatoire (courbe b).

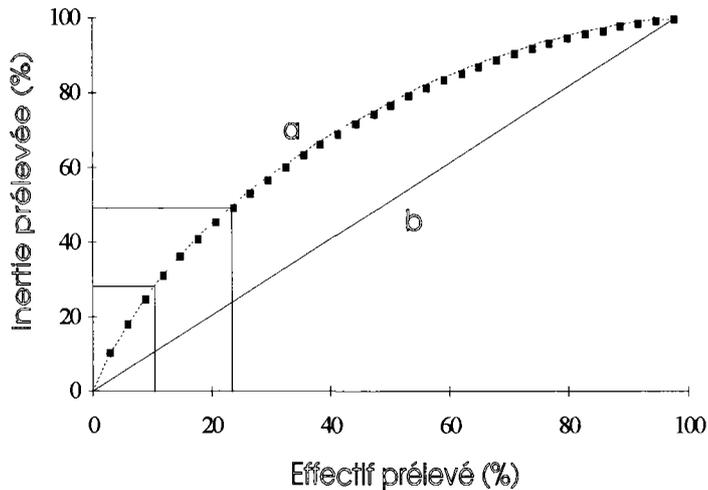


Figure 1: Evolution de l'inertie prélevée en fonction de la taille de l'échantillon

PROPOSITIONS POUR UNE CORE COLLECTION DE CAFÉIERS

Pour l'ensemble des collections de caféiers, nous proposons 88 groupes de diversités (tableau 3). Ceux-ci peuvent être classés en 3 types principaux:

1) L'espèce *C. arabica*, la plus importante commercialement, renferme trois sous-groupes de diversité. Amphiploïde, autogame et de domestication récente, cette espèce montre un polymorphisme isozymique particulièrement faible. Dans la plupart des collections existent des formes génétiquement apparentées. L'identification de tous les mutants et variants originaux doit précéder la création de la core collection. Il devient urgent d'éliminer aussi la redondance des génotypes présents dans la collection de base. L'emploi de marqueurs moléculaires discriminants par RAPD (Lashermes *et al.*, 1993; Cros *et al.*, 1993) devrait précéder l'échantillonnage.

2) Un grand nombre d'espèce sauvages n'ont toujours pas été étudiées et certaines restent encore non-décrites botaniquement. Ces espèces, diploïdes et autoincompatibles, sont fortement hétérozygotes. Pour ces groupes, la stratégie aléatoire de Brown convient bien. La duplication des génotypes retenus peut se faire soit par bouturage ou greffage, soit par multiplication *in vitro* (Bertrand-Desbrunais *et al.* 1991). Une procédure alternative pourrait être la réalisation d'un lot de graines obtenues en fécondation libre par une seule récolte sur tous les génotypes.

Tableau 3 : Main diversity groups with the core of *Coffea*

Afrique (38 groupes)	
<i>C. arabica</i> (3 groupes)(1 *)	
<i>C. arabica</i> (F.A.O 1964- ORSTOM 1966*- Mt Marsabit)	
Groupes simples, botaniquement décrits (5 groupes) (4*)	
<i>C. fadenii</i> - <i>C. humilis</i> * - <i>C. pseudozanguebariae</i> * - <i>C. racemosa</i> * - <i>C. salvatrix</i> *	
Groupes simples, non décrits botaniquement (8 groupes) (7*)	
<i>C. sp. F</i> * - <i>C. sp. "Bakossi"</i> * - <i>C. sp. "Ngongo2"</i> * - <i>C. sp. "Ngongo3"</i> * - <i>C. sp. "Congo"</i> * - <i>C. sp. "Mayombe"</i> * - <i>C. sp. "Nkoumbala"</i> * - <i>C. sp. "Song-Mbong"</i>	
Groupes complexes (22 groupes) (19*)	
<i>C. brevipes</i>	- Mt Cameroun* - Kumba-Loum* - var. <i>heterocalyx</i> *
<i>C. canephora</i>	- guinean* - congolien* - camerounese* - Nana*
<i>C. congensis</i>	- centrafricain* - camerounese* - congolien*
<i>C. eugenioides</i>	- kenyan - var. <i>kivuensis</i>
<i>C. kapakata</i>	- tanzanien - "brésilien"
<i>C. liberica</i>	- guinean* - congolien* - Koto*
<i>C. sessiliflora</i>	- Shimba* - Kitulangalo*
<i>C. stenophylla</i>	- Assabli* - Ira*
<i>C. sp. "Moloundou"</i>	- Moloundou* - Souanké*
Madagascar (50 groupes)	
<i>C. andrambovatensis</i> - <i>C. arensiana</i> - <i>C. augagneuri</i> - <i>C. bertrandi</i> - <i>C. boiviniana</i> - <i>C. buxifolia</i> - <i>C. dolichophylla</i> - <i>C. dubardi</i> - <i>C. farafanganensis</i> - <i>C. heimii</i> - <i>C. humblotiana</i> - (Iles Comores) - <i>C. homollei</i> - <i>C. jumellei</i> - <i>C. kianjavatensis</i> - <i>C. lancifolia</i> - <i>C. mangoroensis</i> - <i>C. mauritiana</i> (Ile de la Réunion) - <i>C. millotii</i> - <i>C. mogeneti</i> - <i>C. perrieri</i> - <i>C. pervilleana</i> - <i>C. resinosa</i> - <i>C. richardii</i> - <i>C. sahafariensis</i> - <i>C. sakarahae</i> - <i>C. tetragona</i> - <i>C. tsirananae</i> - <i>C. vatovavyensis</i> - <i>C. vaughanii</i> - <i>C. vianneyi</i> - <i>C. ind.</i> (20 taxons non décrits).	

Légende: Les groupes de diversité avec un astérisque constituent actuellement la core collection du genre *Coffea*

Dans ce cas, les copies de la core collection qui vont être distribuées auront le même fond génétique, mais des accessions différentes.

3) Pour les espèces bien étudiées, comme *C. canephora*, *C. liberica*, *C. congensis*, etc... et caractérisées par des données quantitatives (Anthony, 1992), nous suggérons l'utilisation de notre méthodologie. Le concept est simple et facile à appliquer avec un micro-ordinateur. Le principal problème reste, comme pour les autres méthodes, d'être sûr d'avoir affaire à un seul groupe de diversité à l'intérieur duquel l'interfertilité des génotypes est totale.

CONCLUSIONS

La conservation efficace et l'utilisation effective des ressources génétiques des caféiers en Afrique doit allier simultanément la maintenance des trois principales collections de base (Jimma-Ethiopie, Divo et Man-Côte d'Ivoire, Ilaka-Est et Kianjavata- Madagascar) et la constitution de core collections.

Aujourd'hui, une large part de la biodiversité du genre *Coffea* a été collectée et au moins partiellement caractérisée. Nous disposons donc d'un ensemble "ressources génétiques-évaluation-procédure d'échantillonnage" tout à fait suffisant pour que la core collection passe du modèle à la réalité.

Il appartient aux chercheurs (généticiens, phytopathologistes, agronomes, etc.) et aux sélectionneurs d'afficher clairement leurs priorités. L'émergence récente du réseau interafricain RECA sous l'égide de l'OIAC, le rôle coordonnateur de l'IBPGR, les efforts conjoints des Institutions des pays du Sud et du Nord sont autant d'atouts qui permettent d'être optimistes

RESUME

L'augmentation constante des effectifs des collections de plantes constituées pour conserver la diversité génétique et développer des programmes de sélection accroît les problèmes de gestion (espace, coût, etc.). D'où

l'idée apparue à la fin des années 80 (Brown, 1989) de créer une collection réduite, la core-collection, susceptible de renfermer 80% de la variabilité rassemblée. C'est elle qui est multipliée à l'attention des utilisateurs.

L'obtention d'une "Core collection" de caféiers comprend deux étapes. La première consiste à définir les groupes d'échantillonnage d'après l'organisation génétique du matériel végétal étudié; les principaux critères utilisés sont la biogéographie, la présence de barrières reproductives et la taxonomie numérique. La deuxième étape consiste à prélever dans chacun de ces groupes un échantillon dont l'effectif ne dépasse pas 10% de la population initiale. Habituellement, ce tirage est aléatoire. A l'inverse, nous proposons ici une méthode qui maximise la diversité échantillonnée. Elle fonctionne actuellement avec des caractères quantitatifs, mais pourrait être adaptée aux caractères qualitatifs. Un exemple est donné pour différentes populations de *Coffea liberica* évalués en collections avec des données quantitatives. L'application aux collections de caféiers cultivés (*C. arabica* et *C. canephora*) devrait être facile.

ABSTRACT

Constant increasing in size of germplasm leads to management problems (space, cost, etc.). At the end of the eighties, Brown (1989) suggested to develop reduced collections, (i.e. core collection), that would include 80% of the collected diversity. This core collection would be multiplied for the users.

Development of a *Coffee* core collection presents two steps. The first one is to define sampling groups from the genetical organization of the species complex; the main criteria are biogeography, presence of reproductive barriers and numerical taxonomy. The second step is to constitute for each group a sample with a size inferior to 10% of the initiate population. Usually, a random sampling is applied. By contrast, we propose a method that maximalizes the sampled diversity. The method has been applied using quantitative traits, but could be easily adapted to qualitative data. An example is given for the different populations of *Coffea liberica*, that were evaluated in collection using quantitative data. Applications of such method to *C. arabica* and *C. canephora* should be easy.

REFERENCES

- Anthony, F. (1992). Les ressources génétiques des caféiers : collecte, gestion d'un conservatoire et évaluation de la diversité génétique. *Thèse, Paris-Sud (Orsay), série TDM, éditions ORSTOM*, 320 pages
- Berthaud, J. (1986). Les ressources génétiques pour l'amélioration des caféiers africains diploïdes : évaluation de la richesse génétique des populations sylvestres et de ses mécanismes organisateurs. Conséquences pour l'application. *Thèse d'état, Paris-Sud (Orsay), Collection "Travaux et Documents", ORSTOM*, 188: 72 p.
- Brown, A. D. H. (1989). Size and structure of collection: the case for core collection: 136-156. In *the use of plant genetic resources*. Eds Brown *et al.* Camb. Univ. Press.
- Brown, A.D.H. (1989). Core collections: a practical approach to genetic resources management. *Genome*, 31: 818-824
- Chevallier, A. (1947). Les caféiers du globe III) Systématique des caféiers et faux caféiers. Maladies et insectes nuisibles. in *Encyclopédie biologique*, 28, Fasc. III, Ed. P. Lechevallier (Paris)
- Crawford, J.L. (1985). Electrophoretic data and plant speciation. *Syst. Bot.* 10 405-415
- Cros J., Lashermes, Ph., Marmey, Ph., Anthony, F., Hamon, S. & A. Charrier (1993). Molecular analysis of genetic diversity and phylogenetic relationship in *Coffea*. *XV^e Congrès A.S.I.C.*, Montpellier
- Bertrand-Desbrunais, A., Noirot M. & A. Charrier. (1991): Minimal growth *in vitro* conservation of coffee (*coffea sp.*). 1. Influence of low concentration of 6-Benzylaminopurine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 27: 333-339.
- Bridson, D. et B. Verdcourt (1988). *Coffea*. in *Flora of Tropical Esat Africa*. Rubiaceae (Part 2). Ed. R.M. Polhill, Balkema (Rotterdam)
- Davis, J.I. & A.J. Gilmartin (1985) Morphological variation and speciation. *Syst. Bot.* 10: 416-4255

- Frankel, O.H. (1974). Genetic conservation: our responsibility. *Genetics* 70: 53-65
- Frankel, O. H. & E. Bennett (1970). *Genetic Resources in Plant. Their exploration and conservation*. Blackwell Scientific Pub. Oxford.
- Frankel, O. H. & A. D. H. Brown (1984). Current plant genetic resources - A critical appraisal. In *Genetics new Frontiers. Proc. of XV Int. Congress of Genetics*. Oxford & IBH Publishing Co (4): 3-13.
- Hamon, S., Noirot, M. & F. Anthony (1993) Selecting a coffee core collection using the principal component score (PCS) strategy with quantitative data. In *Core collections of plant genetic resources* Eds Brown & Hodgkin (à paraître)
- Harlan, J.R. (1970). The evolution of cultivated plants. In Frankel and Bennet Ed "*Genetic Resources in Plant. Their exploration and conservation*". Blackwell Scientific Publ. Oxford: 19-32.
- Kimura, M & J.F. Crow (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49:725-738
- Lashermes, Ph., Cros J., Marmey, Ph. & A. Charrier (1993). Use of random amplified DNA markers to analyse genetic variability and relationships of *Coffea* species. *Gen. Res. Crop Evol.* (sous presse)
- Leroy, J.F. (1980). Evolution et taxogénèse chez les caféiers. Hypothèse sur leur origine. *C.R. Acad. Sci.*, 291: 593-596.
- Louarn, J. (1992). La fertilité des hybrides interspécifiques et les relations génomiques entre les caféiers diploïdes d'origine africaine (genre *Coffea* L. sous genre *Coffea*). *Thèse d'Etat es-Sciences Naturelles*, Paris XI Orsay, 190 pages.
- Pernès, J. (1984) *Gestion des ressources génétiques des plantes*. Tome 1 & 2. Ed. Pernès, A.C.C.T. (Paris)
- Vavilov, N. I. (1935). The origin, variation immunity and breeding of cultivated plants. *Chron. Bot.* 13, 6 volumes.

ESTIMATION DE PARAMÈTRES GÉNÉTIQUES CHEZ *COFFEA CANEPHORA* PIERRE

Th. LEROY, C. MONTAGNON, C. CILAS
CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 01

INTRODUCTION

Depuis 1984, un programme de sélection récurrente réciproque a été initié en Côte d'Ivoire après la mise en évidence chez *Coffea canephora* de deux groupes de caféiers aux caractéristiques complémentaires dont les hybrides sont vigoureux et productifs, les Guinéens et les Congolais (Berthaud, 1986).

Des résultats antérieurs suggèrent la prépondérance des variances d'aptitude générale à la combinaison, et donc d'une transmission de type additif pour la productivité, la vigueur des jeunes arbres, la hauteur des arbres, et la granulométrie (Bouharmont *et al.*, 1986; Bouharmont et Awemo, 1990). Des corrélations élevées entre la vigueur et la productivité des arbres ont également été mises en évidence (Ravohitrarivo, 1980). Peu de données sont disponibles sur la transmission de la résistance aux maladies, comme la rouille orangée *Hemileia vastatrix*. Ces estimations portaient cependant sur un nombre limité de géniteurs non représentatifs de la variabilité de l'espèce (Charrier et Berthaud, 1988).

La présente étude a pour but d'évaluer des paramètres génétiques à partir de l'évaluation de plusieurs essais de géniteurs et de descendances intergroupes entre Guinéens et Congolais. Les héritabilités des principaux caractères sélectionnés sont estimées par l'analyse de la variance ou la régression entre parents et descendants. Les corrélations phénotypiques et génotypiques entre les caractères sont ensuite calculées. Les conséquences de ces études sur le choix des caractères à sélectionner, leur sélection et la sortie variétale sont discutées.

MATERIEL ET METHODES

Matériel végétal et caractères étudiés

Les essais de descendances analysés ont été plantés entre 1986 et 1989, en randomisation totale de parcelles monoarbres. Les effectifs par descendance sont de 50 arbres par descendance en moyenne.

Les essais évalués sont présentés dans le Tableau 1: matériel végétal, caractères analysés, dispositifs statistiques pour les analyses.

**TABLEAU 1 - ESSAIS ÉTUDIÉS: MATÉRIEL VÉGÉTAL PLANTÉ,
CARACTÈRES ANALYSÉS, DISPOSITIFS STATISTIQUES EMPLOYÉS.**

ESSAI: numéro et année de plantation	MATERIEL VEGETAL	CARACTERES	PLAN DE CROISEMENT
Essai 1 1986	10 descendances intergroupes	Vigueur Architecture Productivité (4 récoltes) Granulométrie	2 guinéens x 5 congolais
Essai 2 1986	24 descendances intergroupes 7 descendances diverses	Vigueur Architecture Productivité (4 récoltes) Granulométrie	Single pair
Essai 3 1986	12 descendances intergroupes 4 descendances diverses	Vigueur Architecture Productivité (4 récoltes) Granulométrie	Single pair
Essai 4 1988	12 descendances intergroupes	Vigueur Architecture Productivité (2 récoltes) Granulométrie	4 guinéens x 3 congolais,
Essai 5 1989	21 descendances intergroupes	Vigueur Architecture Productivité (une récolte)	1 Congolais x 21 guinéens
Essai 6 1988	21 descendances intergroupes	Vigueur Architecture Productivité (2 récoltes)	Single pair
Essai 7 1988	21 descendances intergroupes 19 descendances diverses	Vigueur Architecture Productivité (2 récoltes)	Single pair

Les caractères sélectionnés sont les suivants:

- vigueur des jeunes arbres estimée par : le diamètre au collet à 30 mois
la hauteur des arbres à deux ans

le diamètre de l'arbre (ou encombrement) mesuré à quatre ans perpendiculairement à la ligne de plantation. C'est un caractère important pour le sélectionneur, pour choisir des arbres dont l'encombrement n'implique pas des compétitions entre les arbres défavorables à la production de la parcelle pour les densités classiques de plantation

- la productivité annuelle et cumulée des arbres sur deux à quatre récoltes; Bouharmont et Awemo (1980) considèrent que le cumul des quatre premières récoltes est très fortement corrélé avec la productivité cumulée sur dix récoltes ($r=0.9$)

- la granulométrie du café produit a été estimée par des mesures du poids de cent fèves au cours de trois récoltes successives

- la résistance à la rouille orangée a été notée individuellement suivant une échelle présentée par Eskès et Toma-Braghini (1981), simplifiée pour nos essais suivant une échelle de 1 à 5 qui combine type de réaction et

intensité de l'attaque.

Estimation des variances génétiques

Les différents essais de descendance ont été analysés suivant des modèles adaptés (Dagnélie, 1970): analyse à effets mixtes pour l'essai 1 et analyse à effets aléatoires pour l'essai 4 et l'essai 5. Les variances statistiques sont calculées à partir de l'analyse de la variance à deux facteurs, et des valeurs des carrés moyens. Le calcul de ces variances permet d'estimer les variances génétiques d'additivité, de dominance, et l'héritabilité au sens strict liée à l'effet aléatoire par le rapport de la variance d'additivité sur la variance phénotypique. Une héritabilité au sens large peut être estimée par le rapport de la variance génétique (additivité et dominance) sur la variance phénotypique. Toutes les héritabilités estimées portent sur des données individuelles.

Régression entre parents et descendants

La pente de la régression entre les parents et les descendants est une estimation de l'héritabilité au sens strict si la régression se fait sur la valeur du parent moyen. Si la régression est estimée par rapport à un seul parent (essai 5 Top cross), la pente est une estimation de la moitié de l'héritabilité au sens strict (Falconer, 1974). Les conditions d'application de ces régressions, portant sur les résidus et la distribution des données (Tomassone *et al.*, 1983), ont été testées.

Les régressions entre les parents et les descendants ont permis d'analyser les caractères évalués dans les essais 5, 6 et 7, de connaître la transmission de la granulométrie pour les récoltes de 1990 et 1991, et la transmission du taux de caféine pour la récolte de 1991. Les données des parents ont été observées dans des essais clonaux de géniteurs.

Corrélations phénotypiques et génotypiques entre caractères

Les corrélations totales entre les caractères sont présentées pour les essais 2 et 3. Des données sur 208 individus de l'essai 3, et 231 individus de l'essai 2, ont permis de calculer les corrélations phénotypiques entre les caractères technologiques du café produit, la vigueur et la productivité des arbres. Les corrélations génétiques et environnementales ont été calculées pour les essais 2 et 3 plantés en 1986.

RESULTATS

Héritabilité des principaux caractères sélectionnés

L'héritabilité de la productivité et des principaux caractères sélectionnés est présentée dans le Tableau 2 pour les estimations faites par l'analyse des variances génétiques ou par les régressions entre parents et descendants.

Les héritabilités au sens strict, calculées pour les deux premières récoltes cumulées, sont supérieures à 0,75. La productivité au jeune âge est donc un caractère à forte additivité. Dans l'essai 1, la quatrième récolte a été très forte (plus de 70% de la production totale des arbres) et portée par des arbres ayant atteint un développement végétatif important. L'héritabilité calculée pour cette récolte est de 0,14 au sens strict et de 0,49 au sens large. La production sur des arbres adultes a donc une transmission de type dominant. Pour les quatre récoltes cumulées, l'héritabilité calculée est de 0,36 (0,83 pour l'héritabilité au sens large). L'héritabilité au sens strict est donc moyenne, la part génétique de la transmission de la productivité est forte, la part de l'additivité est moyenne.

L'héritabilité au sens strict du diamètre au collet des arbres est comprise entre 0,13 et 0,35 dans les trois essais étudiés. Ce caractère a donc une héritabilité moyenne. L'encombrement des arbres, mesuré sur des arbres âgés de quatre ans, présente une héritabilité élevée de 0,53. La hauteur des arbres a une héritabilité assez élevée comprise entre 0,31 et 0,48, ce qui en fait un caractère assez fortement héritable.

TABLEAU 2 - HÉRITABILITÉ DES CARACTÈRES SÉLECTIONNÉS.

Caractère	Héritabilité au sens strict	Héritabilité au sens large
Deux premières récoltes cumulées	0,76 à 0,82	
Quatrième récolte	0,15	0,49
Quatre récoltes cumulées	0,36	0,83
diamètre au collet à 30 mois	0,13 à 0,35	
Hauteur des arbres à 24 mois	0,31 à 0,48	
Encombrement des arbres à 4 ans	0,50	
Taille des fèves	0,15 à 0,36	
Taux de caféine	0,55	

La granulométrie a une héritabilité au sens strict comprise suivant les années entre 0,15 et 0,36. Les variances de dominance sont non significatives pour ce caractère, la part de l'additivité est donc forte et l'influence de l'environnement pour la transmission de ce caractère est importante (Charmetant et Leroy, 1986).

Le taux de caféine du café produit a une héritabilité élevée estimée par régression entre parents et descendants (0,55), une sélection efficace de ce caractère par choix de géniteurs à faible teneur en caféine semble donc possible.

Corrélations entre caractères

Corrélations phénotypiques

Pour les essais 2 et 3 plantés en 1986 (Tableau 3), les caractères de vigueur et d'architecture sont bien corrélés entre eux ($r > 0,4$). Le diamètre au collet à 30 mois est la variable de vigueur la plus fortement corrélée avec la production cumulée dans l'essai 3, alors que c'est la hauteur des arbres à deux ans dans l'essai 2. L'encombrement des arbres est assez peu corrélé avec la productivité et la plupart des autres caractères dans l'essai 3, les corrélations sont plus élevées dans l'essai 2.

La note de sensibilité à la rouille orangée lors d'une année de forte attaque a été intégrée dans ces études. La plupart des corrélations calculées sont non significatives ou très faibles, sauf pour la productivité cumulée dans l'essai 2 qui présente une corrélation négative significative peu élevée avec la notation de rouille orangée.

Les corrélations observées sont faibles ou non significatives entre la vigueur ou la productivité des arbres, et la granulométrie du café produit. Dans l'essai 3, on observe cependant une corrélation positive significative entre productivité cumulée et granulométrie (0,2). Ces résultats ne montrent pas de corrélations négatives, et donc d'antagonisme, entre la productivité et la granulométrie du café produit, critère commercial de qualité du café.

Corrélations génétiques et environnementales

Les corrélations génétiques entre la productivité cumulée sur quatre récoltes, le diamètre au collet à 30 mois, l'encombrement des arbres à 4 ans et leur hauteur à 24 mois ont été estimées dans les essais 2 et 3 (Tableau 3). Pour la plupart des caractères mesurés, les corrélations environnementales sont faibles par rapport aux corrélations génétiques et les erreurs types des corrélations sont peu importantes. Les corrélations génétiques peuvent donc être considérées comme estimées avec une bonne précision.

TABLEAU 3 - CORRÉLATIONS PHÉNOTYPIQUES, GÉNÉTIQUES (G) ET ENVIRONNEMENTALES (E) ENTRE LES PRINCIPAUX CARACTÈRES DE VIGUEUR ET DE PRODUCTIVITÉ DANS LES ESSAIS DE DESCENDANCES PLANTÉS EN 1986: ESSAI 3 AU DESSOUS DE LA DIAGONALE ET ESSAI 2 AU DESSUS DE LA DIAGONALE.

	DC30M	ENC48	C2460	HT24M
DC30M P	1	0,39	0,51	0,67
G		0,71	0,70	0,84
E		0,31	0,54	0,79
ENC48 P	0,15	1	0,44	0,48
G	0,19		0,93	0,41
E	0,34		0,23	0,24
C2460 P	0,56	0,24	1	0,55
G	0,93	0,10		0,39
E	0,49	0,25		0,47
HT24M P	0,68	0,34	0,45	1
G	0,78	0,44	0,76	
E	0,68	0,29	0,42	

HT24M : hauteur des arbres à 24 mois

DC30M : diamètre au collet des arbres à 30 mois

ENC48 : encombrement de l'arbre à 4 ans

C2460 : récolte cumulée entre 24 et 60 mois

Le diamètre au collet à 30 mois est génétiquement très corrélé avec la productivité, avec des valeurs estimées comprises entre 0,7 et 0,9. En revanche, les corrélations génétiques entre encombrement et diamètre au collet des arbres sont beaucoup plus fortes dans l'essai 2 que dans l'essai 3, avec une forte corrélation environnementale dans l'essai 3. L'encombrement des arbres est fortement corrélé génétiquement avec la productivité dans l'essai 2 (0,9), et faiblement dans l'essai 3 (0,1). Dans ce dernier essai, l'encombrement des arbres présente d'ailleurs de fortes corrélations environnementales et des écarts-types des estimations des corrélations génétiques élevées. La hauteur des arbres est très fortement corrélée avec le diamètre au collet des arbres, ses corrélations avec la productivité sont variables suivant les essais.

DISCUSSION

La structure génétique du matériel végétal (parents hétérozygotes) ne permet que des estimations approchées des variances d'additivité et de dominance (Gallais, 1989). Les caractères de hauteur et d'encombrement des arbres ont une héritabilité élevée et stable, comme de précédentes études sur les aptitudes à la combinaison pouvaient le laisser prévoir (Bouharmont *et al.*, 1986). Une sélection parentale pour ces caractères sera efficace. La production des arbres se divise en deux phases: la production précoce portée par de jeunes arbres a une héritabilité élevée, puis les valeurs estimées diminuent pour les productions successives. Sur un cycle de production l'héritabilité est moyenne. La précocité de production pourra être sélectionnée chez les géniteurs, alors que la production cumulée sera plutôt sélectionnée pour des combinaisons hybrides particulières.

L'héritabilité de la granulométrie est moyenne, l'importance des effets environnementaux est confirmée mais la part de l'additivité dans la transmission est forte. Des résultats antérieurs montrent l'intérêt du choix de géniteurs pour améliorer ce caractère (Bouharmont *et al.*, 1986), ce qui n'exclut pas le choix de combinaisons ou d'individus à gros grains pour tous les hybrides. Le taux de caféine présente une héritabilité élevée qui permettra une sélection efficace des géniteurs pour ce caractère.

Les corrélations entre les caractères, au niveau phénotypique et génétique, aident à choisir les caractères les plus pertinents à sélectionner pour une sélection précoce. Le diamètre au collet à 30 mois est la donnée de vigueur la plus intéressante et la mieux corrélée à la productivité.

La sensibilité des arbres à la rouille orangée et la taille des fèves ne sont que faiblement corrélées avec la productivité. La sélection d'arbres et de descendances productifs, résistants à la rouille orangée, et produisant un café à forte granulométrie est donc possible.

L'encombrement des arbres est une donnée végétative intéressante, car il montre le développement des arbres dans les conditions édaphiques et climatiques spécifiques à chaque essai. En effet, l'essai 3 a été planté en bas d'une colline, sur un sol plus riche que l'essai 2. Les arbres se sont donc mieux développés. Les conditions de compétition entre les arbres sont donc différentes dans les deux essais, ce qui modifie les corrélations de l'encombrement avec les autres caractères. La sélection dans l'essai 3 s'effectue en présence d'une compétition de développement entre les arbres, leur encombrement est donc un facteur négatif pour la production. En revanche, dans l'autre essai, la compétition entre les arbres est réduite, l'encombrement des arbres est un facteur de développement et donc de productivité accrue. Les autres caractères de vigueur, diamètre au collet et hauteur des arbres, sont plus fortement corrélés avec la productivité quand les arbres sont en situation de concurrence.

La prise en compte des relations entre la productivité et la vigueur est primordiale pour l'interprétation des résultats de chaque essai. Elle se fait par l'analyse de covariance en utilisant une donnée de vigueur (diamètre au collet ou encombrement) comme covariable de la productivité, ou par l'introduction dans un index de sélection de la productivité et de la vigueur en leur donnant un poids différent. La vigueur est nécessaire pour le démarrage des plants, mais peut être défavorable à la productivité des arbres adultes en raison des concurrences entre les arbres.

L'étude des corrélations génétiques entre les caractères sélectionnés conduit à la mise en place d'un index de sélection associant au rendement une notation de vigueur au stade précoce comme le diamètre au collet à 30 mois. L'encombrement des arbres sera aussi utilisé dans les deux cas de présence ou d'absence de compétition. Les autres caractères sélectionnés, comme la granulométrie, le taux de caféine et la résistance à la rouille orangée seront sélectionnés par niveaux indépendants, car la sélection se fera par des seuils: plus de 13 grammes pour cent fèves pour la granulométrie, moins de 2,3% de caféine et résistance des arbres pour la rouille orangée.

CONCLUSIONS GENERALES

Les connaissances sur la transmission des caractères permettent d'orienter la sélection vers le choix de géniteurs à bonne valeur propre pour les caractères les plus hérissables comme la hauteur des arbres, la production précoce, ou vers la sélection d'arbres et de descendances dans les hybrides entre les populations pour les caractères les moins hérissables comme le diamètre au collet des arbres ou la production d'arbres adultes. La sélection réciproque permet une amélioration simultanée pour les caractères à faible ou forte hérissabilité (Comstock *et al.*, 1949). Une telle sélection mise en place sur le caféier depuis 1984 devrait donc permettre la vulgarisation de variétés productives donnant un café de bonne qualité. Les premiers résultats acquis semblent confirmer ces possibilités (Leroy *et coll.*, 1991).

Les corrélations observées permettent de déterminer les caractères les plus efficaces pour la sélection. Le diamètre au collet à 30 mois et la hauteur des arbres sont les caractères de vigueur les mieux corrélés avec la productivité des arbres. Enfin, l'étude des corrélations génétiques entre les caractères est une base pour la création d'un index de sélection pour la sortie variétale, qui associera les caractères cibles de vigueur et de productivité.

Grâce à l'évaluation de ces paramètres génétiques, le programme d'amélioration par sélection réciproque sera efficace pour distribuer aux planteurs du matériel végétal productif, et proposer aux consommateurs un café robusta de qualité. Soixante sept clones et 7 hybrides ont déjà été repérés grâce à ce programme de sélection, et des perspectives intéressantes d'amélioration de la qualité organoleptique des cafés produits sont à attendre grâce à des études en cours sur la variabilité pour ces caractères.

BIBLIOGRAPHIE

- Berthaud J., 1986. Propositions pour une nouvelle stratégie d'amélioration des caféiers de l'espèce *C. canephora*, basée sur les résultats de l'analyse des populations sylvestres. In : 11th international colloquium on coffee ASIC, Lomé (Togo), 1985/02/11-15, pp.445-452. Paris (France), ASIC.
- Bouharmont P. & J. Awemo, 1980. La sélection végétative du caféier Robusta au Cameroun. Deuxième partie. Diffusion du matériel végétal. Café Cacao Thé. 24 (1) : 3-18.
- Bouharmont P., R. Lotodé, J. Awemo & X. Castaing, 1986. La sélection générative du caféier au Cameroun. Analyse des résultats d'un essai d'hybrides diallèle partiel implanté en 1973. Café Cacao Thé. 30 (2) : 93-112.
- Bouharmont P. & J. Awemo, 1990. La sélection générative du caféier robusta au Cameroun. Analyse des résultats d'un essai d'hybrides diallèle quasi-complet implanté en 1981. In : 13th international colloquium on coffee ASIC, Paipa (Colombie), 1989/08/21-25, pp. 502-511. Paris (France), ASIC.
- Charrier A. & J. Berthaud, 1988. Principles and methods in coffee plant breeding: *Coffea canephora* Pierre. In: COFFEE, Volume 4: Agronomy, R.J. Clarke & R. Macrae Ed., Elsevier Applied Science, London (Great Britain), pp.167-197.
- Comstock R.E., Robinson H.F. & P.H. Harvey, 1949. A breeding procedure designed to make maximum use of both general and specific combining ability. Agronomy Journal. 41 : 360-367.
- Dagnélie P., 1970. Théorie et méthodes statistiques. Volume 2. J. Duculot Ed., Gembloux (Belgique), 451 pages.
- Eskes A.B. & M. Toma-Braghini, 1981. Assessment methods for resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.). Pl. Prot. Bull. FAO. 29 : 56-66.
- Falconer D.S., 1974. Introduction à la génétique quantitative. Masson , Paris (France), 284 pages.
- Gallais A., 1989. Théorie de la sélection en amélioration des plantes. Masson , Paris (France), 1989, 588 pages.
- Leroy T., P. Charmetant & A. Yapo, 1991. Application de la sélection récurrente réciproque au caféier *Coffea canephora* Pierre: premiers résultats du programme réalisé en Côte d'Ivoire. Café Cacao Thé. 35 (2) : 95-103.
- Ravohitrarivo C.P., 1980. Etude de la variabilité des descendances et des problèmes liés à l'amélioration des caféiers cultivés diploïdes. Thèse de Doctorat de 3ème cycle, University of Madagascar, 105 pages.
- Tomassone R., E. Lesquoy & C. Millier, 1983. La régression. Nouveaux regards sur une ancienne méthode statistique. INRA-Actualités scientifiques et agronomiques N° 13. Masson , Paris (France), 180 pages.

RESUMÉ

Le programme de sélection récurrente en cours en Côte d'Ivoire permet l'étude des paramètres génétiques pour le caféier *Coffea canephora*.

La transmission des caractères a été évaluée à travers l'analyse des variances génétiques dans des essais factoriels, et les régressions entre parents et descendants. L'héritabilité estimée est moyenne pour la productivité cumulée sur quatre récoltes ($h^2=0,3$), mais les valeurs estimées sont plus élevées pour la production précoce que pour celle d'arbres adultes. La taille des fèves a une héritabilité moyenne ($h^2=0,25$), alors que la vigueur des

arbres a des héritabilités moyennes à élevées: 0,13 pour le diamètre au collet, 0,50 pour la hauteur des arbres et leur encombrement).

Les corrélations entre les caractères ont été étudiées. Elles sont élevées entre la plupart des caractères de vigueur et la productivité des arbres. On observe de très faibles corrélations entre la productivité et les caractères technologiques. L'encombrement des arbres présente une corrélation génétique avec la productivité variable suivant les conditions de compétition entre les arbres.

L'évaluation de ces paramètres génétiques permet de choisir les caractères les plus pertinents pour la sélection, de déterminer le type de sélection optimal pour chacun d'entre eux, et de mettre en place un index de sélection pour les sorties variétales au niveau individuel et familial.

SYSTÈME DE REPRODUCTION DES ARABUSTA *LATO SENSU* ET EXPLOITATION DE LEURS DESCENDANCES POUR L'AMÉLIORATION DES CAFÉIERS DE BASSE ALTITUDE

D. LE PIERRÈS (1), A. YAPO (2)

(1) L.R.G.A.P.T., ORSTOM, B.P. 5045, 34032 Montpellier cedex 1, France
(2) Station IDEFOR, Département Café Cacao, B.P. 808, Divo, Côte-d'Ivoire

INTRODUCTION

L'Arabusta, hybride interspécifique tétraploïde artificiel entre *Coffea arabica* et *C. canephora* (CAPOT, 1972), étudié à grande échelle depuis 20 ans, n'a pas une fertilité équivalente à celle de ses parents. Ce caféier, généralement vigoureux, produit des gamètes défectueux, tant mâles que femelles (BERTHAUD, 1977, OWUOR et VAN DER WOSSEN, 1981). Ses grains de pollen sont très hétérogènes en taille et en viabilité. Sa fertilité femelle se caractérise par un taux important de loges atrophiées en "écailles", dont la première conséquence est la production de grains caracolis et un pourcentage très variable de loges vides (De REFFYE, 1975, LE PIERRES et CHARMETANT, 1985 YAPO, 1987). Bien que l'Arabusta soit apprécié pour la qualité organoleptique de son café et sa teneur moyenne en caféine, ses productions insuffisantes et son adaptation agronomique trop aléatoire sont des handicaps à la vulgarisation en culture directe de cet hybride interspécifique de 1ère génération.

Plusieurs auteurs ont prouvé que ses défauts de fertilité proviennent d'irrégularités méiotiques qui entraînent la formation de gamètes déséquilibrés (GRASSIAS, 1980 OWUOR, 1985, BOAVENTURA et Da CRUZ, 1987).

La diversification des combinaisons interspécifiques a été réalisée depuis une dizaine d'années en Côte-d'Ivoire dans le cadre de l'Opération Conjointe ORSTOM - CIRAD/IRCC (LE PIERRES, 1982, CHARMETANT *et al.*, 1985 et 1991), pour étudier comment pouvait varier la fertilité des Arabusta en fonction de génomes de *Coffea* hybridés. Ainsi ont été créés les Arabusta *lato sensu*, où le *C. canephora* de l'Arabusta *stricto sensu* a été remplacé par d'autres espèces de caféiers diploïdes qui ont été tétraploïdisés avant hybridation avec *C. arabica*.

L'utilisation directe des Arabusta de 1ère génération n'étant pas possible, notre communication a pour but d'étudier les modes de reproduction pour une meilleure exploitation de leurs descendances. Le présent travail effectué à la Station IDEFOR/DCC de Divo en Côte-d'Ivoire se propose de comparer la fructification de plusieurs Arabusta *lato sensu* sous différents types de pollinisation. Par ailleurs des croisements entre des Arabusta *stricto sensu* ont donné des descendances de 2ème, 3ème et 4ème générations qui sont observées au champ. Après l'exposé des résultats de leur fructification sous divers modes de reproduction, on cherchera à préciser leur biologie reproductive, et l'exploitation de celle-ci pour l'amélioration des caféiers.

TECHNIQUES D'ETUDE

1) Contrôle de la fertilité sous divers modes de reproduction

La fertilité femelle vue sous l'angle de la production peut être quantifiée par le produit : nombre de fruits x coefficient de remplissage en graines des fruits. Nous examinerons l'influence des modes de reproduction sur les taux de fructification d'une part, et sur les coefficients de remplissage d'autre part.

Trois études sont abordées :

a) Comparaison des Arabusta *lato sensu* en fécondation libre

Nous présentons une analyse factorielle des correspondances (AFC) effectuée à partir des données brutes de la fertilité recueillies après tranchage de fruits provenant de fécondations libres, et comptage des classes de cerises selon la méthode de De Reffye (1975). Les contrôles de la fertilité se sont déroulés pendant quatre années sur trois combinaisons interspécifiques F1 différentes qui sont l'Arabusta *stricto sensu* (incluant les hybrides issus de *C. canephora* et du caféier de la Nana), les Arabusta faits avec *C. congensis*, et les hybrides "Kawisaris" (*C. arabica* x *C. liberica*, ou *C. arabica* x *C. dewevrei*), ainsi qu'une forme Arabusta "3 voies" : *C. arabica* croisée avec le Congusta (*C. congensis* x *C. canephora*).

b) Influence de la nature du pollen sur les fructifications

Dans une première étude, nous comparons les taux de fructification obtenus sous trois types de pollinisation : autofécondation (AF), backcross par *C. arabica* mâle (BC), et fécondation libre (FL). Le matériel étudié comprend les mêmes combinaisons d'Arabusta (faites avec *C. canephora*, *C. liberica*, et *C. congensis*).

Une deuxième étude aborde en détail les réussites des fructifications relatives à une seule combinaison interspécifique représentée par les Kawisaris qui ont montré dans les expériences précédentes une autostérilité prononcée et un mauvais remplissage des fruits. Une trentaine d'arbres Kawisaris issus de combinaisons variées entre une dizaine de géniteurs *C. arabica* croisés avec huit *C. liberica* et deux *C. dewevrei* a été étudiée de 1981 à 1989. Les FL ont été comparées aux AF, et à des croisements consanguins : croisements frère x soeur (F x S) et croisements entre demi-frères (1/2F x 1/2F) issus du même parent *C. liberica* ou *C. dewevrei*.

c) Contrôle du remplissage en graines des fruits

Le remplissage des fruits est exprimé par le rapport du nombre de graines au nombre de fruits. C'est un critère synthétique de la fertilité femelle, qui intègre deux indices habituels de stérilité : le taux d'écaillés (ou indirectement le taux de caracolis) pour la stérilité gamétique, et le taux de loges vides pour la stérilité zygotique. Le taux d'écaillés dans les fruits correspond au rapport du nombre de fruits à une seule loge au double du nombre de fruits. Le taux de caracolis a été estimé sur les fruits par le rapport du nombre de fruits à une loge au nombre total de loges développées. Le taux de loges vides est calculé par le rapport du nombre de loges vides ou contenant des graines mal formées au nombre total d'ovules développés en loges.

Les Kawisaris ont été retenus comme matériel d'étude à cause de leur plus grande stérilité zygotique. Les observations ont été effectuées sur deux floraisons. Sur la première floraison les AF ont été comparées aux FL, et sur la deuxième on a comparé les croisements entre individus non consanguins (NC) à des BC avec *C. arabica* mâle.

2) Observation des descendance au champ

Plus de 300 descendance, représentant environ 19.000 plants au champ, forment actuellement le matériel en observation. Il comprend trois générations successives après la 1ère génération : G2, G3 et G4 (tableau 1). Seuls les arbres G2 et G3 actuellement adultes ont été observés.

L'obtention des descendance de deuxième génération ou G2, se fait par croisements des Arabusta F1. Les brassages génétiques utilisent les trois types de pollinisations possibles : autofécondations (AF), fécondations libres (FL) et croisements contrôlés "4 voies" (CC). De la même manière, par croisements des G2 sont obtenues les G3, puis les G4.

L'évolution de la fertilité des hybrides de deuxième et troisième générations est étudiée sur 64 individus G2 et 49 individus F3 sélectionnés dans les FL et les CC pour leur vigueur et leur grande capacité de floraison. Il s'agit de voir si la tendance à la baisse de fertilité constatée dans la 2ème génération d'Arabusta s'accroît ou s'arrête dans les générations suivantes.

Tableau 1 :
Les descendance
G2, G3, et G4
observées au champ

génération	(Nombre de familles) / types de descendance et <i>effectif au champ</i>			cumul
G2	(10) FL <u>1 050</u>	(90) AF <u>3 690</u>	(93) CC <u>6 280</u>	(193) <u>11 020</u>
G3	(3) CC <u>99</u>	(29) AF <u>0</u>	(16)FL - (23)AF <u>6 084 - 0</u>	(71) <u>6 183</u>
G4			(40) FL <u>2 175</u>	(40) <u>2 175</u>
			Total =	(304) <u>19 378</u>

légende : FL = fécondations libres
AF = autofécondations
CC = croisements contrôlés "4 voies"

RESULTATS

1) La fructification en fonction du mode de reproduction

a) La fructification en fécondation libre des Arabusta *lato sensu*

Une étude synthétique de la fructification des Arabusta est présentée par l'AFC de la figure 1. Les deux premiers axes font ressortir l'indépendance du caractère "remplissage des fruits" porté par l'axe 1 (50 % de la variation totale), de la "réussite de la fécondation" sous condition naturelle en FL situé sur l'axe 2 (18 % de l'information globale). Le remplissage est caractérisé par les fruits contenant 2 graines et 1 graine qui sont opposés aux fruits sans café. La réussite de la fécondation de l'axe 2 rend compte de la fertilité gamétique par opposition des fruits à 2 loges développées (2 grains, 1 grain + 1 loge vide, 2 loges vides) aux fruits à 1 seule loge (1 grain caracoli + 1 écaille, 1 loge vide + 1 écaille).

L'interaction avec le milieu (effet "années") est évidente, essentiellement le long de l'axe 1. Les conditions environnementales influencent principalement le remplissage des fruits, et nettement moins les fécondations.

Concernant les types de combinaisons hybrides, leurs fertilités sont aussi beaucoup plus inégales pour le caractère remplissage de leurs fruits que pour la réussite de leur fécondation. Par rapport à l'Arabusta *stricto sensu* (lettre : A), dont sa situation proche de l'origine indique une fertilité moyenne parmi les Arabusta *lato sensu*, nous voyons que les hybrides les plus fertiles placés du côté des meilleurs remplissages sont issus des combinaisons avec *C. congensis* (C) ou avec le Congusta (G), tandis qu'une des formes d'Arabusta *stricto sensu* : avec les caféiers de la Nana (N), ainsi que les Kawisaris (K) sont les plus stériles.

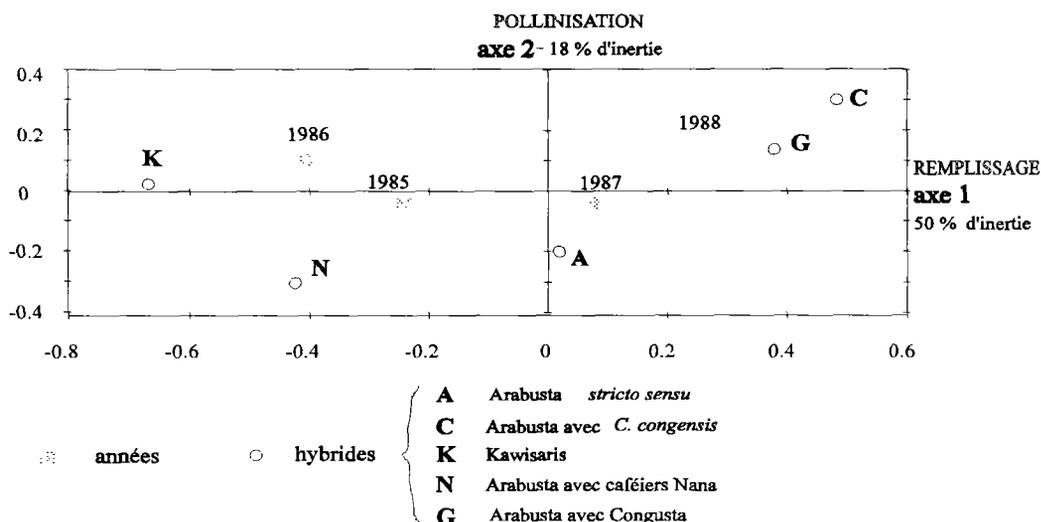


Figure 1 : Représentation graphique en AFC des fertilités des Arabusta *lato sensu*

b) Influence de la nature du pollen sur les taux de fructification

Le tableau 2 donne les pourcentages moyens de fruits qui grossissent sous divers modes de pollinisation (AF, BC par *C. arabica*, et FL) pour les trois types d'Arabusta :

Tableau 2 : Comparaison des taux de fructification en % chez les Arabusta *lato sensu* en - autofécondation (AF), - backcross par *C. arabica* (BC), - et fécondation libre (FL).

	AF	BC	FL
<i>C.arabica</i> x <i>C.canephora</i>	25 - 30	25	30
<i>C.arabica</i> x <i>C.liberica</i>	0 - 25	72	45
<i>C.arabica</i> x <i>C.congensis</i>	30	non fait	50

L'Arabusta *stricto sensu* montre des taux de nouaison très voisins de 25 % sous tous les modes de pollinisation étudiés. Ces hybrides sont parfaitement autogames, avec des taux de fructification en AF équivalents à ceux de la FL. L'apport de pollen d'Arabica ne modifie pas les taux de fructification. La même proportion d'ovules évolue en fruits indépendamment de la nature du pollen. La sélection pollinique est efficace des gamètes équilibrés dans la pollinisation de l'Arabusta.

L'Arabusta ayant le parent *C. congensis*, tout en ayant de meilleurs résultats en FL, paraît autant autofertile que l'Arabusta *stricto sensu*.

Par contre, les Kawisaris (*C. arabica* x *C. liberica*) ont un comportement très différent des précédents, et peuvent avoir des taux de fructification très variables suivant la nature du pollen. L'AF donne parfois aucune réussite, ce qui indiquerait alors l'existence d'une autostérilité telle que MENDES (1950) l'avait déjà signalée au Brésil sur un hybride interspécifique du même type dénommé "387". L'observation en fluorescence du développement des tubes polliniques en conditions contrôlées de pollinisation par de l'autopollen a démontré l'absence de l'autoincompatibilité de nature gamétophytique comme celle décrite par BERTHAUD (1980) chez l'espèce diploïde *C. canephora*. Ces arbres sont loin d'être femelles stériles puisque les fécondations avec du pollen de *C. arabica* donnent des réussites records égales en moyenne à 72 %. La nature et la qualité du pollen influencent donc les fructifications de ces hybrides.

L'étude approfondie du comportement autostérile des Kawisaris est synthétisée par les taux de fructification dans le tableau 3. La réussite en autofécondation des hybrides est d'une façon générale toujours inférieure à celle de la fécondation libre. Cependant il ressort une très grande instabilité du pourcentage de réussite en autofécondation qui montre un effet année prépondérant. Le rapport AF/FL semble varier dans le même sens. L'autostérilité en AF n'est pas absolue. Le cas de la 2ème souche hybride de notre exemple est remarquable à ce sujet pour les années 1985 et 1989.

Tableau 3 : Contrôle de la fructification des Kawisaris sur plusieurs années en autofécondation (AF) et en fécondation libre (FL)

	années									
	1981		1983		1984		1985		1989	
Moyennes des hybrides	1,1	42,6	4,4	12,2	4,7	18,6	1,2	3,6	0,9	7,5
deux exemples de souches hybrides	1,4	41,1	6,2	2,9			1,8	23,2	0	4,3
			12,0	35,8	2,2	3,4	31,1	51,6	18	6,6

Légendes

AF	FL
----	----

fruits pour 100 fleurs en autofécondations
fruits pour 100 fleurs en fécondations libres

Le tableau 4 rassemble les données de la fructification des Kawisaris résultant des croisements frères x sœurs (F x S) ou de 1/2 frères (1/2F x 1/2F) entre hybrides consanguins comparés aux AF et aux FL : 1/2F x 1/2F)

- les croisements entre individus consanguins ont des taux de fructifications semblables ;
- les réussites de fructification impliquant des fécondations entre gamètes apparentés chez les Kawisaris sont nettement inférieures à celles enregistrées en ambiance FL de Kawisaris uniquement ;
- la stérilité dûe aux fécondations consanguines affecte principalement le taux de fructification et par voie de conséquence la quantité de graines produites.

Tableau 4 : Résultats moyens des fécondations contrôlées sur Kawisaris :

- en fécondation libre (FL)
- en autofécondation (AF)
- des croisements Frères x Sœurs (F x S)
- des croisements entre 1/2 Frères (1/2F x 1/2F)

	FL		AF		F x S		1/2F x 1/2F	
fruits / 100 fleurs	28,8		5,4		3,4		1,3	
	14	53	0	11	0	22	0	10
graines / 100 fleurs	32,7		5,8		3,7		1,7	
	11	67	0	11	0	25	0	13

Légende

moyenne
mini max

c) Coefficients de remplissage des fruits de Kawisaris

Parmi les Arabusta *lato sensu*, les Kawisaris se distinguent de deux manières. D'une part ils extériorisent la moins bonne fertilité par le remplissage des fruits en FL. D'autre part leurs intensités de nouaison sont variables suivant la nature du pollen fécondant. Cette modification du remplissage des fruits selon le mode de reproduction a été recherchée dans l'altération ou la malformation des albumens des graines résultant de croisements consanguins "AF" ou "F x S" par rapport aux croisements réputés donner de meilleures nouaisons, tels que les croisements "4 voies" (en NC ou dans les FL) ou les rétrocroisements avec *C. arabica*.

L'efficacité des types de pollen sur le développement des albumens est relatée dans les deux tableaux suivants. Le tableau 5 met en parallèle les résultats de croisements consanguins AF et des FL pour les caractères "% caracolis", "% écailles", "% vides", et "coefficient de remplissage". L'analyse de la variance ne met pas en évidence d'effet "type de pollen" pour aucun de ces caractères. Le coefficient de remplissage moyen est comparable pour les deux types de fécondation, bien que les taux de fructification étaient différentes au départ. Les grains de pollen fécondants de l'AF sont aussi efficaces pour la formation de l'albumen des graines que ceux de la FL. La dégénérescence des jeunes zygotes devrait se faire à un stade précoce de la fructification.

Tableau 5 : Comparaison des fécondations libres (FL) aux autofécondations (AF) pour la formation des graines dans les fruits des hybrides Kawisaris

types de pollinisations	% CARACOLIS	% ECAILLES	% VIDES	remplissage Graines/Fruit
FL	65,3 (NS)	39,5 (NS)	25,5 (NS)	0,897 (NS)
AF	73,7	42,0	23,0	0,898

(NS) : Non Significatif

Tableau 6 : Comparaison des croisements non consanguins (NC) aux backcross (BC) pour la formation des graines dans les fruits des hybrides Kawisaris

types de pollinisations	% CARACOLIS	% ECAILLES	% VIDES	remplissage Graines/Fruit
NC	65,2 (*)	44,4 (*)	33,8 (*)	0,804 (NS)
BC	48,0	32,4	40,0	0,804

(*) : Significatif

(NS) : Non Significatif

Le tableau 6 compare des croisements NC à des BC pour les mêmes caractéristiques étudiés précédemment. L'analyse de la variance montre seulement des effets pollen sur les qualités de fructification. Cette fois, on s'aperçoit que du pollen *C. arabica* assure des meilleures fécondations puisqu'il y a moins d'écailles et de caracolis. Mais des phénomènes inexplicables vont donner des taux de loges vides statistiquement plus grands que dans les lots NC. On aboutit en définitive à des remplissages identiques des fruits pour un génotype femelle donné. Une très forte sélection pollinique pour les gamètes équilibrés à 22 chromosomes dans le pollen fécondant des tétraploïdes tel *C. arabica* ayant été suggérée par MONACO et CARVALHO (1975), il est possible que la meilleure qualité du pollen de *C. arabica* amène la fécondation d'une quantité supplémentaire (meilleure fertilité gamétique) d'ovules aneuploïdes, mais dont les zygotes qui en résultent ne pourront pas se développer ensuite à cause de leur aneuploïdie apportés par les ovules (plus grande stérilité zygotique). Ce cas suggère la prédominance de facteurs présents dans les gamètes femelles, qui par effet de dosage génomique sont déterminants de la qualité de maturation des albumens formés.

A la vue des résultats portés sur ces derniers tableaux, on déduit que :

- des mauvais remplissages ont lieu quelle que soit la nature du pollen ;
- les fécondations ont lieu préférentiellement avec les meilleurs grains de pollen équilibrés qui seraient plus compétitifs ;

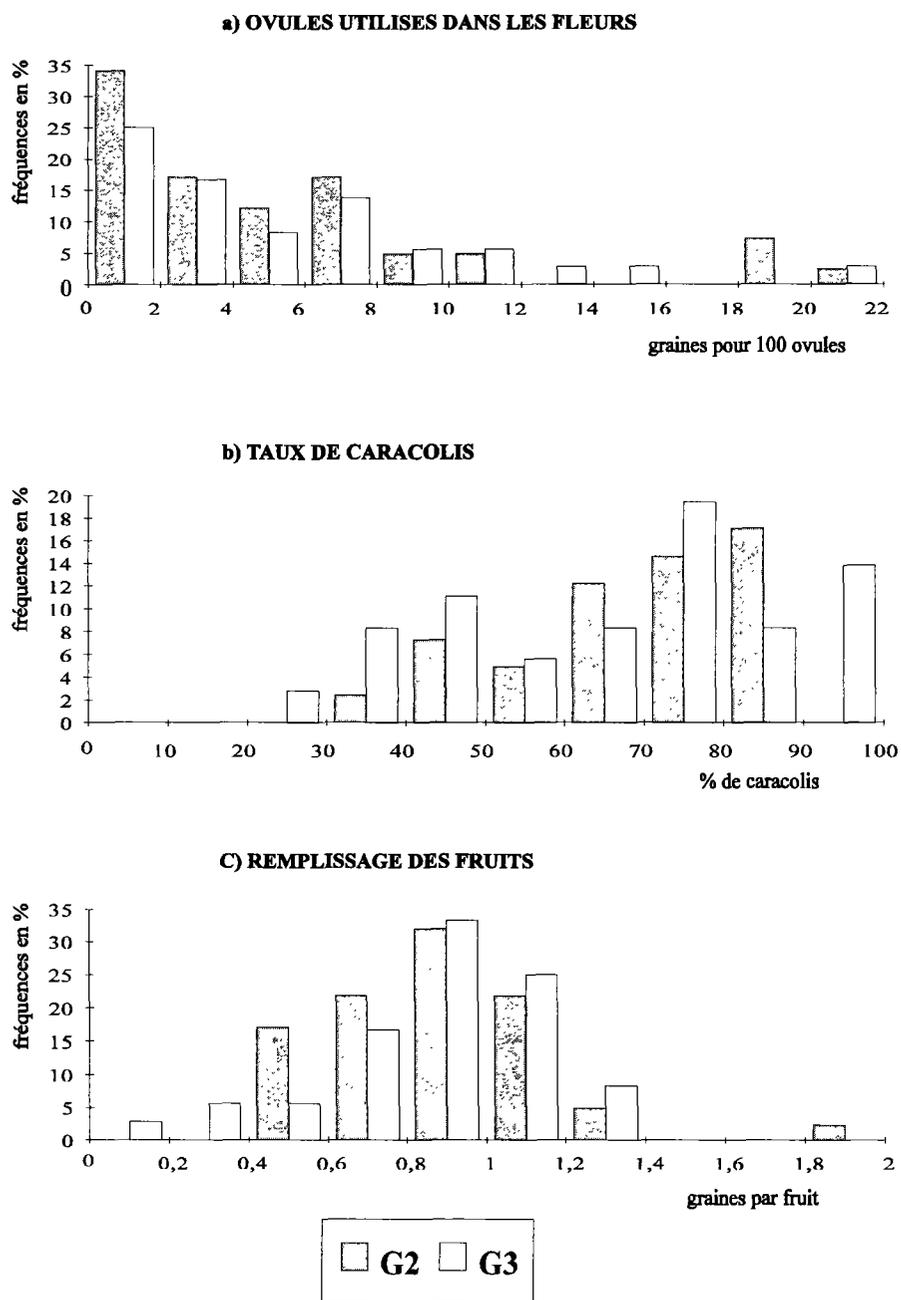


Figure 2 : Distribution des paramètres de la fertilité femelle dans les générations G2 et G3 d'*Arabusta stricto sensu*

- le coefficient de remplissage semble bien être une caractéristique liée aux gamètes femelles des Kawisaris ;
- en condition d'allopollinisation, la sélection pollinique joue en faveur des pollens non consanguins.

2) Analyse de la fertilité des descendance d'*Arabusta stricto sensu*

Nous avons contrôlé la fertilité femelle représentée sur les histogrammes des différents paramètres étudiés (figure 2).

- la transformation en fruits des ovules initiaux des fleurs, est faible dans les deux générations G2 et G3 avec des variations du taux d'utilisation des ovules allant de 0% à 22 %. La forme des courbes de répartition des fréquences en fonction des classes de fertilité croissante des ovules sont du type "loi de Poisson". Les histogrammes font ressortir que ce sont les arbres les plus stériles qui sont regroupés dans la classe la plus fréquente. Chez les G2 environ 1/3 des arbres appartiennent à cette classe, contre 1/4 des arbres de la G3. Globalement un gain de 10 % est observé en faveur des G3.
- Les taux de caracolis sont différents entre les deux types de descendance. La variation chez les F3 est plus forte que chez les G2. Cependant, les meilleurs individus G3 ont des taux de caracolis relativement bas, de l'ordre de 25 %. Une baisse générale de 11 % est observée en passant de la G2 à la G3.
- Les courbes de distribution des coefficients moyens de remplissage en graines/fruit des G2 et G3 ont une allure gaussienne. Chaque fruit contient environ 1 graine. Cette valeur du coefficient de remplissage est très voisine de celles observées chez les géniteurs F1. Les G3 sont meilleurs que les G2 avec un gain relatif de 13 %.

DISCUSSION CONCLUSION

Le remplissage des fruits est très hétérogène selon les combinaisons interspécifiques. L'analyse du remplissage, sous plusieurs types de pollinisation des Kawisaris, qui sont les hybrides ayant le plus de loges vides, a permis de montrer que les fécondations impliquant la rencontre de gamètes consanguins donnent des nouaisons très faibles par rapport aux autres modes de pollinisation. Cependant les rares fruits noués ne sont pas moins remplis que leurs homologues issus de FL. Comme on a vérifié que ces hybrides n'étaient pas affectés d'incompatibilité au niveau du style (pas d'incompatibilité pré-zygotique), il existerait dans ce cas une létalité du jeune zygote due à de l'incompatibilité post-zygotique comme Lanaud *et al.* (1987) l'ont observée en intraspécifique chez le cacaoyer. Dans nos exemples, la disjonction des recombinaisons de génome à l'issue de la méiose chez les Arabusta serait la principale cause de production de zygotes anormaux inviables associés à des albumens déséquilibrés.

L'avortement post-zygotique peut donc se manifester à divers âges au cours du développement du zygote et du grossissement des tissus maternels du jeune fruit. Au stade le plus précoce, il empêcherait la nouaison par une chute massive de petits ovaires après la fécondation comme nous l'avons remarqué chez les Arabusta *stricto sensu*. Plus tard après la nouaison, l'albumen se développerait mal pour donner des loges vides ou des grains mal formés. Ce cas de réaction d'incompatibilité est également connu chez les hybrides triploïdes entre *C. arabica* et *C. canephora*. L'origine génétique de cette incompatibilité post-zygotique pourrait provenir essentiellement de l'aneuploïdie des gamètes femelles consécutive aux appariements déséquilibrés chez les hybrides interspécifiques. Ceux-ci seraient moins contre-sélectionnés que leurs homologues mâles à la pollinisation puis à la fécondation.

Concernant la biologie reproductive, les Arabusta *lato sensu* étudiés n'ont pas d'incompatibilité pré-zygotique, mais sont tous plus ou moins affectés d'incompatibilité post-zygotique consécutive à la stérilité zygotique avec une production importante de loges vides. Les hybrides Kawisaris ont un comportement autostérile incomplet, contrairement aux Arabusta faits avec *C. canephora* ou *C. congensis*. Nous avons montré que les réussites des nouaisons en FL sont équivalentes à celles des AF chez les Arabusta *stricto sensu*, tandis qu'à l'inverse le niveau des fructifications des Kawisaris en FL dépend à 90 % de la xénogamie. Les résultats ne s'opposent pas à l'idée de l'autogamie préférentielle chez l'Arabusta *stricto sensu*, à l'opposé des Kawisaris qui ont principalement un mode de reproduction allogame.

Notre étude met en relief des différences de relation entre les espèces parentales des Arabusta *lato sensu*. Parmi les quatre espèces diploïdes hybridées avec *C. arabica*, *C. canephora* et *C. congensis* forment un groupe d'espèces dont les hybrides Arabusta sont beaucoup moins atteints de stérilité zygotique que le deuxième groupe d'espèces représenté par *C. liberica* et *C. dewevrei*. Ce regroupement d'espèces concorde avec les relations en

croisement étudiées par LOUARN (1992). Du point de vue génétique, le groupe des caféiers canephoroïdes paraît nettement plus proche de *C. arabica* que les caféiers liberio-excelsoïdes.

La qualité du pollen fécondant influence les taux de fructification des Kawisaris mais pas ceux des Arabusta *stricto sensu*. Par ailleurs la nature du pollen est sans action sur les taux de remplissage en graines des fruits. Pour améliorer la fertilité femelle, il y a intérêt à favoriser les fécondations par du pollen bien équilibré et si possible non consanguin surtout chez les Kawisaris, tout en sachant que le taux de loges vides ne sera pas modifié. Le caractère remplissage des fruits est un critère valable pour la sélection des Arabusta *lato sensu*, puisqu'il est invariable pour un génotype donné quelle que soit la nature du pollen, et représente donc le potentiel d'ovules réellement transformés en graines.

L'étude des descendances G2 et G3 d'Arabusta a mis en évidence d'abord qu'il est difficile de sélectionner des individus vigoureux équilibrés dans les descendances issues d'autofécondation, et ensuite que le niveau de fertilité en FL des générations successives est globalement faible. Cependant, la baisse de fertilité constatée lors du passage de la F1 à la G2, semble s'inverser de la G2 à la G3. Ceci laisse espérer une restauration significative de la fertilité au cours des prochaines générations.

Pour l'orientation des programmes impliquant la création des générations, on a montré les difficultés de réalisation des descendances par autofécondation, surtout quand les plantes sont affectées d'autostérilité ou/et ne sont pas très fertiles. Pour des raisons d'efficacité de création à grande échelle de matériel, nous préconisons d'effectuer une sélection précoce des meilleurs arbres maternels en FL sur des caractères de fertilité et de production, et d'utiliser seulement l'autofécondation à partir de la 3ème ou la 4ème génération.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BERTHAUD J. (1977). L'hybridation interspécifique entre *Coffea arabica* L. et *C. canephora* Pierre. Obtention et comparaison des hybrides triploïdes, Arabusta et hexaploïdes. Thèse Doctorat 3ème cycle (Paris XI), Orsay, 54 p., 5 annexes.
- BERTHAUD J. (1980). L'incompatibilité chez *Coffea canephora*. Méthode de test et déterminisme génétique. ASIC (Paris), 9ème Colloque, Londres, 517-526.
- BOAVENTURA Y.M.S., CRUZ N.D. Da (1987). Citogenética do híbrido interespecifico (*Coffea arabica* L. var. Bourbon x *C. canephora* Pierre ex Froehner (Linden) Chev.) que originou of café "ICATU". Turrialba, 37, 171-178.
- CAPOT J. (1972). L'amélioration du caféier en Côte-d'Ivoire. Les hybrides Arabusta. Café Cacao Thé (Paris), XVI, 3-18.
- CHARMETANT P., LE PIERRES D., YAPO A. (1985). La diversification des Arabusta. Bilan de deux campagnes d'hybridation en Côte-d'Ivoire. ASIC (Paris), 11ème Colloque, Lomé, 435-439.
- CHARMETANT P., LE PIERRES D., YAPO A. (1991). Evaluation d'hybrides Arabusta F1 (caféiers diploïdes doublés x *Coffea arabica*) en Côte-d'Ivoire de 1982 à 1989. ASIC (Paris), 15ème Colloque, San Francisco, 9 p..
- GRASSIAS M. (1980). Etude de la fertilité et du comportement méiotique des hybrides interspécifiques Arabusta *Coffea arabica* x *C. canephora*. Thèse doct. 3e cycle (Paris XI), Orsay, 108 p., 11 annexes.
- LANAUD C., SOUNIGO O., AMEFIA Y.K., PAULIN D., LACHENAUD Ph., CLEMENT D. (1987). Nouvelles données sur le fonctionnement du système d'incompatibilité du cacaoyer et ses conséquences pour la sélection. Café Cacao Thé, XXXI, 267-277.
- LE PIERRES D. (1982). Perspectives offertes par quelques nouveaux hybrides interspécifiques fertiles *Coffea arabica* x *C. spp.* pour l'amélioration des caféiers de basse altitude. ASIC (Paris), 10ème Colloque, Salvador, 579-582.
- LE PIERRES D., CHARMETANT P. (1985). Relations entre la vigueur, la fertilité et la production des Arabusta. ASIC (Paris), 11ème Colloque, Lomé, 427-434.
- LOUARN J. (1992). La fertilité des hybrides interspécifiques et les relations génomiques entre caféiers diploïdes d'origine africaine (genre *Coffea* L. sous-genre *Coffea*). Thèse Doctorat d'Etat (Paris XI), Orsay, 200p..
- MENDES A.J.T. (1950) Uma nova forma de *Coffea*. Bragantia (Campinas), 10, 11-25.

- MONACO L.C et CARVALHO A. (1975). Coffee breeding for leaf rust resistance . ASIC (Paris), 7ème Colloque, Hambourg, 437-457.
- OWUOR J.B.O. (1985). Interspecific hybridization between *Coffea arabica* L and tetraploid *C. canephora* P. ex Fr. II. Meiosis in F1 hybrids and backcrosses to *C. arabica*. Euphytica, 34, 355-360.
- OWUOR J.B.O., VAN DER VOSSSEN H.A.M. (1981). Interspecific hybridization between *Coffea arabica* L. and tetraploid *C. canephora* P.ex Fr.. I. Fertility in F1 hybrids and backcrosses to *C. arabica*. Euphytica, 30, 861-866.
- REFFYE Ph. De (1975). Le contrôle de la fructification et de ses anomalies chez *Coffea arabica*, Robusta, et leurs hybrides "Arabusta". ASIC (Paris), 7ème Colloque, Hambourg, 459-482.
- YAPO A. (1987) Influence du sens du croisement sur la fertilité et le comportement végétatif des hybrides Arabusta. ASIC (Paris), 12ème Colloque, Montreux, 433-440.

Résumé :

LE PIERRES D., YAPO A. - Système de reproduction des Arabusta lato sensu et exploitation de leurs descendances pour l'amélioration des caféiers de basse altitude.

Les Arabusta lato sensu, ou hybrides interspécifiques F1 tétraploïdes entre *Coffea arabica* et les autres caféiers sont caractérisés par une fertilité imparfaite, et une production limitée qui empêche leur diffusion directe en culture.

Les taux de fructification en fécondation libre, stables dès la nouaison, sont caractéristiques des différents types d'hybrides. Le remplissage des fruits est très hétérogène suivant les combinaisons interspécifiques. L'étude du mode de reproduction montre que les Arabusta avec *C. canephora* ou *C. congensis* sont autofertiles, tandis que ceux avec *C. liberica* ou *C. dewevrei* sont partiellement autostériles.

L'amélioration de la fertilité des Arabusta est recherchée depuis une dizaine d'années à l'IDEFOR/DCC à Divo en Côte-d'Ivoire par l'obtention de nouvelles formes hybrides créées à partir d'hybrides F1 4x sous divers modes de pollinisations : autofécondation, fécondation libre, et pollinisation contrôlée "4 voies". Les observations de fertilité et de comportement en Côte-d'Ivoire ont porté sur des descendances de plusieurs types de croisements d'Arabusta stricto sensu : 11 000 G2, 6 000 G3, 2 000 G4.

Abstract :

LE PIERRES D., YAPO A. - Reproductive system of the Arabusta lato sensu trees and coffee trees improvement for low altitude adaptation using their offsprings. -

The Arabusta lato sensu or F1 tetraploid hybrid between *C. arabica* and other coffee trees, have a poor fertility which may be explained in part by chromosomal asynapsis at meiosis. Their low production prevents their distribution to coffee growers.

The fruit set in open pollination are constant since setting, and characteristic of every Arabusta type. Fruit filling is very heterogenous between interspecific combinations. The study of the reproductive system shows that the Arabusta with *C. canephora* or *C. congensis* are autofertile, whereas the ones with *C. liberica* or *C. dewevrei* are partially autosterile.

Arabusta breeding is applied since 10 years in IDEFOR/DCC at Divo in Côte-d'Ivoire by obtention new hybrid forms from F1 tetraploid hybrids under different pollination conditions : selfing, open pollination, and controlled pollination "4-ways hybrids". The observations on fertility and phenology are made in field on 11 000 G2, 6 000 G3, and 2 000 G4.

MISE EN ÉVIDENCE DE DIFFÉRENTS NIVEAUX D’AFFINITÉ DES GREFFES INTERSPÉCIFIQUES CHEZ LES CAFÉIERS

E. COUTURON

Station de Génétique des Caféiers, ORSTOM, BP 434, Man, Côte-d'Ivoire

INTRODUCTION

La culture des caféiers repose principalement sur les techniques de multiplication par semis, plus rarement sur des techniques horticoles de multiplication végétative. Ces dernières sont surtout utilisées pour multiplier les individus élites des caféiers allogames. Ainsi, le greffage a été pratiqué par les Hollandais en Indonésie pour le développement de la caféiculture dans ce pays au début du siècle (Cramer, 1957). Le bouturage horticole a accompagné la sélection clonale de *C. canephora* en Afrique à partir des années 60 (Snoeck, 1968). La culture de *C. arabica* dans les zones infestées de nématodes a conduit les caféiculteurs du Guatemala à réaliser un greffage au stade jeune en utilisant des porte-greffes *C. canephora* (Reyna E.H., 1968). Par ailleurs, les chercheurs de l'ORSTOM en Côte d'Ivoire utilisent couramment le bouturage et le greffage dans leurs programmes de conservation et d'amélioration des caféiers. Cette dernière technique permet d'améliorer la croissance d'un grand nombre d'espèces sauvages et cultivées ainsi que leur duplication pour leur maintien en collection vivante (Charrier, 1978). Un tel acquis peut pourtant être optimisé par une meilleure connaissance du comportement des espèces greffées, en particulier du point de vue de leur compatibilité (Le Pierrès, 1987).

Nous nous proposons ici de rapporter une expérimentation réalisée à la station ORSTOM de Man en Côte d'Ivoire, visant à rechercher les combinaisons les plus favorables en greffage d'une dizaine d'espèces de caféiers cultivés et sauvages. La survie, la vigueur et la compatibilité des plantes greffées sont étudiées. Après avoir discuté des résultats, un choix des meilleures porte-greffes est proposé, en particulier pour la culture de *C. arabica*.

MATERIEL ET METHODE

La diversité du matériel végétal est représentée par 10 espèces du genre *Coffea* et par une espèce du genre voisin *Psilanthus*, *P. manii* (MAN), originaire de Côte d'Ivoire.

Les espèces du genre *Coffea* sont :

- *C. arabica* (ARA) originaire d'Ethiopie.
- *C. canephora* (CAN), *C. congensis* (CON), *C. liberica* var. *dewevrei* (LIB), *C. humilis* (HUM), *C. stenophylla* (STE), originaires d'Afrique de l'ouest et centrale.
- *C. eugenioides* (EUG), *C. pseudozanguebariae* (PSE), *C. sessiliflora* (SES), *C. racemosa* (RAC), originaires d'Afrique de l'est.

Chaque espèce est représentée par un lot de semences issu d'un mélange en proportions égales de 6 descendances en fécondation libre. Les jeunes plants obtenus de semis sont utilisés au stade "feuilles cotylédonaire" 15 jours après leur repiquage en pot. Leur greffage est réalisé par section transversale de l'hypocotyle à mi-hauteur et échange de la partie supérieure entre les deux partenaires. La moitié de l'hypocotyle portant les feuilles cotylédonaire est taillée en biseau (photo 1, cf. annexe), puis insérée sur la partie radicale préalablement incisée (photo 2). Une légère ligature au raphia est effectuée sur la zone de jonction (photo 3). Celle-ci est recouverte d'une stratification de sciure (photo 4), puis les greffes sont placées dans des enceintes, en atmosphère humide.

Un an plus tard, les plants greffés sont installés en champ sur la base de 20 pieds par combinaison. La plantation est réalisée à l'écartement de 1,25m. par 2,5m. sur un sol latéritique et sous un léger ombrage de *Glyricidia*.

Les observations en pépinière portent sur le taux de réussite du greffage puis sur la croissance des jeunes plantes greffées ; à 10 mois, un premier contrôle de la qualité de la soudure du porte-greffe et du greffon est effectué sur des coupes longitudinales de la zone de jonction.

En champ, la croissance et l'aspect végétatif des greffes sont aussi observés. A la clôture de l'essai, soit 4 ans après le greffage, un bilan des survivants est établi. La mesure du diamètre à la base du greffon est prise. L'aspect externe de la zone de jonction est observé. Enfin des coupes obtenues par sciage longitudinal des greffes permettent de juger de la qualité de la soudure du porte-greffe et du greffon.

RESULTATS

Trente greffes par combinaison ont été réalisées selon un plan diallèle quasi complet pour 10 des 11 espèces étudiées soit (tableau 1) :

- 10 combinaisons d'autogreffes des espèces.
- 89 combinaisons de greffes interspécifiques avec les 10 espèces prises comme porte-greffe et comme greffon.

Tableau 1. Combinaisons de greffes réalisées

PG/ G	ARA	CAN	CON	LIB	HUM	EUG	SES	PSE	RAC	MAN
ARA	X	X	X	X	O	X	X	O	X	O
CAN	X	X	X	X	O	X	X	X	X	O
CON	X	X	X	X	O	X	X	O	X	O
LIB	X	X	X	X	O	X	X	X	X	O
HUM	X	X	X	X	O	X	X	X	X	O
EUG	X	X	X	-	O	O	X	X	X	O
SES	X	X	X	X	O	X	X	X	X	O
PSE	X	X	X	X	O	X	X	X	X	O
RAC	X	X	X	X	O	X	X	X	X	O
MAN	X	X	X	X	O	X	X	X	X	O

Le greffage au stade jeune des caféiers est aisé quelle que soit l'espèce considérée. La soudure se fait en 40 jours dans nos conditions. Le taux de réussite moyen se situe entre 80 et 100%. Un seul cas d'incompatibilité au greffage s'est manifesté avec *P. manii*, mais de façon unilatérale. Ce caféier du genre *Psilanthus* est un porte-greffe compatible pour les espèces de *Coffea* étudiées ; par contre, les greffons de *P. manii* ont montré une soudure incomplète et dépéri après 8 mois. Au bout d'un an en pépinière, les autres plants greffés ont une croissance normale. A ce stade, des coupes pratiquées au niveau de la zone de jonction ne montrent aucune anomalie de soudure.

1. Survie

En champ, le taux de survie des plants greffés à 4 ans permet d'apprécier la qualité des associations initiales et l'adaptation de ces plantes aux conditions environnementales de Man. La lecture peut se faire à deux niveaux :

1. Pour les autogreffes, témoins de greffage qui traduisent l'effet milieu, on distingue 3 situations :

- *C. eugenioides* et *C. humilis* ne survivent pas.
- *C. sessiliflora* et *C. pseudozanguebariae* ont des taux de survie inférieurs ou égaux à 50% qui reflètent leur mauvaise adaptation aux conditions pédoclimatiques locales,
- Les autres espèces se maintiennent au dessus de 50%.

2. Pour les hétérogreffes :

- Les taux de survie sont très variables et se situent entre 5 et 100%.
- Seuls, les greffons de *C. humilis*, espèce ombrophile dans son milieu d'origine, dépérissent totalement dans les conditions de culture de Man quel que soit le porte-greffe utilisé.
- Une autre espèce, *C. pseudozanguebariae*, n'a pas survécu en greffage sur des porte-greffes de vigueur moyenne (*C. arabica*), à faible (*C. congensis*).

Tableau 2. Survie des plants greffés en champ, à 4 ans (en %).

LISTE DES ESPECES	PORTE-GREFFES	GREFFONS	AUTOGREFFES
<i>C. pseudozanguebariae</i>	72	23	50
<i>C. liberica</i>	68	91	100
<i>C. canephora</i>	68	89	80
<i>C. arabica</i>	64	80	95
<i>C. sessiliflora</i>	62	32	30
<i>C. racemosa</i>	52	64	100
<i>C. congensis</i>	48	60	85
<i>C. eugenioides</i>	25	30	0
<i>C. humilis</i>	40	0	0
<i>P. manii</i>	54	0	0

L'adaptation pédoclimatique de chaque espèce prise comme porte-greffe peut être évaluée par son taux moyen de survie dans les différentes associations avec les autres espèces (tableau 2). *C. pseudozanguebariae*, *C. liberica* et *C. canephora* se situent en tête du classement et assurent environ 70% de survie aux greffons des autres espèces ; puis les taux se réduisent à 64% avec *C. arabica* pour tomber à 25% avec *C. eugenioides*. D'autre part, si on considère les mêmes espèces prises comme greffons, on constate que leur survie est plus élevée, mais que leur classement reste identique, à l'exception de *C. sessiliflora* et *C. pseudozanguebariae* qui survivent très faiblement, et de *C. humilis* qui dépérit totalement.

Comparativement aux autogreffes, il n'y a pas d'amélioration notable de la survie des espèces : *C. arabica*, *C. canephora*, *C. congensis*, *C. liberica*, *C. pseudozanguebariae* et *C. racemosa* lorsqu'elles sont greffées sur les autres espèces. Seule la survie de *C. eugenioides* et *C. sessiliflora* est sensiblement améliorée dans les associations avec les porte-greffes *C. arabica*, *C. canephora*, *C. liberica* et *C. pseudozanguebariae*.

2. Vigueur

Les mesures de vigueur données par le diamètre moyen à la base des greffons font apparaître une situation analogue à celle décrite pour la survie. Les porte-greffes *C. pseudozanguebariae*, *C. liberica* et *C. canephora* confèrent les plus fortes vigueurs aux greffons dans les associations avec l'ensemble des autres espèces (tableau 3). D'autre part, les mêmes espèces prises comme greffons se classent selon leur vigueur originale : forte pour *C. liberica* et *C. canephora* ; moyenne à faible pour les autres espèces. Ce classement est comparable à celui des autogreffes. A noter le comportement original de *C. pseudozanguebariae*, espèce de faible développement, située en tête du classement des porte-greffes "vigorisants".

Tableau 3. Vigueur (diamètre en mm)

LISTE DES ESPECES	PORTE-GREFFES	GREFFONS	AUTOGREFFES
<i>C. pseudozanguebariae</i>	36	24	23
<i>C. liberica</i>	35	43	57
<i>C. canephora</i>	33	41	54
<i>C. arabica</i>	29	38	44
<i>C. sessiliflora</i>	28	15	18
<i>C. racemosa</i>	31	25	29
<i>C. congensis</i>	27	30	29
<i>C. eugenioides</i>	15	21	-
<i>C. humilis</i>	25	-	-
<i>P. manii</i>	24	-	-

3. Compatibilité

L'étude de la compatibilité par l'observation de l'aspect externe des greffes (photo 5) n'a pas permis de juger avec précision la qualité effective des unions. En effet, 60% des cas de bourrelets d'apparence défectueuse ont révélé des soudures sans défaut à la lecture interne. Les différents cas observés sur les coupes sont classés en 5 catégories (photo 6) :

- 1 : la soudure ne présente aucun défaut.
- 2 : un léger défaut de soudure périphérique est observé.
- 3 : le défaut de soudure est plus accentué mais reste périphérique, avec de brèves incursions internes.
- 4 et 5 : un quart à plus de la moitié de la zone de jonction présente une soudure défectueuse

La compatibilité des différentes combinaisons d'espèces, évaluée par la moyenne des notes obtenues, est présentée dans le tableau 4.

Tableau 4. Compatibilité moyenne (notes 1 à 5).

PG\ G	CAN	CON	LIB	ARA	EUG	PSE	SES	RAC
CAN	1.0	1.0	1.0	1.2	1.2	1.0	1.4	1.8
CON	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	-	2.0	3.7
LIB	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.1	1.3	1.1
ARA	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	-	1.2	3.3
EUG	1.0	1.0	-	1.0	-	1.0	2.0	2.3
PSE	1.0	1.0	1.2	1.4	1.8	1.0	1.1	1.1
SES	1.4	2.7	2.7	2.7	3.2	1.6	1.0	2.0
RAC	2.0	1.6	2.3	3.1	4.0	1.0	1.7	1.0

Les autogreffes de chaque espèce présentent des unions sans défaut (classe 1) ; pour les hétérogreffes, on distingue 4 situations :

- les espèces *C. canephora*, *C. congensis* et *C. liberica* greffées entre elles sont totalement compatibles, comme porte-greffe et comme greffon.
- *C. arabica* et *C. eugenioides* sont compatibles avec ces 3 espèces à l'exception de quelques cas de faible incompatibilité relevés avec *C. canephora* (classes 2 et 3).
- *C. pseudozanguebariae* manifeste globalement une bonne affinité avec l'ensemble des espèces étudiées. Cependant quelques cas de faible incompatibilité sont notés avec *C. eugenioides*, *C. arabica*, *C. liberica*, *C. sessiliflora* et *C. racemosa*.
- *C. racemosa* et *C. sessiliflora* présentent une incompatibilité marquée (classes 3, 4 et 5) avec toutes les autres espèces, à l'exception de *C. pseudozanguebariae*.

C. stenophylla, *C. humilis* et *P. manii* sont incomplètement représentés dans les différentes combinaisons avec les autres espèces. Ces caféiers manifestent une bonne affinité dans les combinaisons existantes avec *C. canephora*, *C. congensis*, *C. liberica*, *C. arabica* et *C. eugenioides*. Cependant, quelques cas d'incompatibilités notées 2 et 3 sont observés dans les associations suivantes :

- *C. stenophylla* pris comme porte-greffe avec les greffons *C. congensis*, *C. arabica* et *C. eugenioides*, ou réciproquement comme greffon avec les porte-greffes *C. canephora* et *C. arabica*.
- *C. humilis* pris comme porte-greffe avec les greffons *C. liberica* et *C. eugenioides*.
- *P. manii* pris comme porte-greffe avec les greffons *C. liberica*, *C. arabica* et *C. eugenioides*.

4. Comportement de *C. arabica* en greffage.

Le comportement de *C. arabica* en greffage a été approfondi en rapport avec la recherche de porte-greffes assurant la compatibilité et la croissance optimales de la principale espèce d'altitude cultivée dans nos conditions de basse altitude (tableau 5). Le taux de survie à 4 ans de *C. arabica* greffé est équivalent au témoin avec les porte-greffes vigoureux *C. canephora*, *C. liberica*, *C. stenophylla* et *C. pseudozanguebariae*. Il décroît avec les autres porte-greffes pour tomber à 40% avec *C. eugenioides*.

Tableau 5. Influence des porte-greffes sur le greffon *C. arabica*.

PORTE-GREFFES	Survie		Compatibilité			Vigueur
	%	nombre	classe 1	classes 2 et 3	classes 4 et 5	diamètre (mm)
<i>C. arabica</i> (témoin)	95	19	19	-	-	44
<i>C. liberica</i> (var. dew.)	95	19	19	-	-	50
<i>C. canephora</i>	100	20	17	3	-	49
<i>C. pseudozanguebariae</i>	90	18	13	5	-	48
<i>C. stenophylla</i>	95	19	17	2	-	44
<i>C. racemosa</i>	65	13	1	6	6	34
<i>C. congensis</i>	80	16	16	-	-	33
<i>C. sessiliflora</i>	89	17	5	6	6	32
<i>C. humilis</i>	75	15	15	-	-	31
<i>C. eugenioides</i>	40	6	6	-	-	23
<i>P. manii</i>	85	17	11	6	-	31

L'observation de la qualité de la soudure au point de greffe a permis de préciser la compatibilité de ces différentes combinaisons :

- les associations sont parfaites et comparables à l'autogreffe (classe 1) avec le porte-greffe vigoureux *C. liberica* donnant une survie élevée. Il en est de même avec les porte-greffes *C. congensis*, *C. humilis* et *C. eugenioides*, mais ces espèces de vigueur faible à très faible assurent une moindre survie.
- les associations sont correctes, avec quelques cas d'affinité moindre (classe 2 et 3) pour des porte-greffes vigoureux comme *C. canephora*, *C. pseudozanguebariae* et *C. stenophylla*, à faible comme *P. manii*.
- les associations avec les porte-greffes de faible vigueur *C. racemosa* et *C. sessiliflora* sont défectueuses, avec prédominance des notes d'affinité 3, 4 et 5.

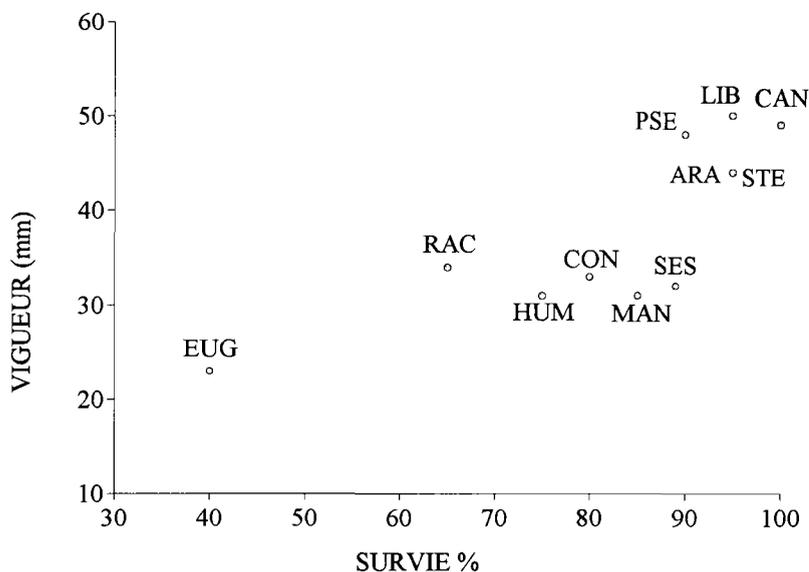


Figure 1. Influence des porte-greffes sur le greffon *C. arabica*.

L'estimation de la vigueur des plants greffés de *C. arabica* complète l'étude de leur compatibilité avec les différents porte-greffes. Un gain de vigueur par rapport au témoin *C. arabica* est obtenu avec les 3 porte-greffes *C. liberica*, *C. canephora* et *C. pseudozanguebariae*, les autres combinaisons étant équivalentes (*C. stenophylla*) ou défavorables. Une représentation graphique (Figure 1) associant le taux de survie et la vigueur permet de visualiser les 3 porte-greffes les plus intéressants pour améliorer la croissance et la production de *C. arabica*.

DISCUSSION

Cette étude sur la compatibilité des espèces de caféiers greffées fait apparaître 5 situations distinctes en relation avec leur origine géographique :

- Un premier groupe de compatibilité totale rassemble les caféiers de basse altitude ouest et centre-africains : *C. canephora*, *C. congensis* et *C. liberica*. Originaires de la même zone, *C. stenophylla* et *C. humilis* ont une bonne compatibilité avec ce groupe pour les combinaisons observées.
- Un deuxième groupe est constitué par *C. arabica* et *C. eugenioides*, caféiers d'altitude du nord-est africain qui manifestent une bonne compatibilité entre eux et avec les espèces du groupe précédent.
- Un troisième groupe est représenté par les caféiers de basse altitude est-africains : *C. racemosa* et *C. sessiliflora* qui montrent des incompatibilités marquées entre eux et avec l'ensemble des autres espèces, à l'exception de *C. pseudozanguebariae*.
- Enfin, *C. pseudozanguebariae* de la même origine géographique que les deux espèces précédentes, montre une bonne compatibilité relative dans toutes les associations étudiées, même avec les caféiers ouest et centre africains.
- Une seule incompatibilité totale au greffage est observée avec *P. manii* lorsque cette espèce est associée aux *Coffea* comme greffon. En revanche *P. manii* manifeste globalement une bonne affinité avec ceux-ci lorsqu'il est utilisé comme porte-greffe.

Cette situation est à rapprocher des résultats obtenus par hybridation interspécifique (Louarn, 1992). Il existe une différenciation génomique entre les caféiers ouest africains par rapport à ceux de l'Afrique orientale. Notons que *C. canephora* peut être croisé dans les deux sens avec *C. pseudozanguebariae* mais dans un seul sens (*C. canephora* parent mâle) avec les espèces *C. racemosa* et *C. sessiliflora*.

Il ressort de l'étude de la vigueur conférée aux greffons par les différents porte-greffes que les trois espèces *C. liberica*, *C. canephora* et *C. pseudozanguebariae* ont une influence favorable sur la croissance des autres espèces de vigueur moyenne à faible. Cependant, la survie de la plupart de celles-ci n'est pas sensiblement améliorée comparativement au témoin.

Les cas de survie très faible à nulle observés chez *C. eugenioides* et *C. humilis* s'expliquent par leurs adaptations spécifiques. *C. eugenioides*, espèce adaptée à l'altitude, tend à dépérir lorsqu'elle est implantée en plaine. Par contre sa croissance en collection sous ombrage au sommet du mont Tonkoui (1100 m) en Côte d'Ivoire est satisfaisante. De même, *C. humilis* espèce ombrophille originaire de Côte d'Ivoire a totalement dépéri dans nos conditions expérimentales. Seule sa culture sous forêt permet son maintien en collection.

Pour les espèces de croissance moyenne à déficiente, les porte-greffes assurant les plus fortes vigueurs sans risque d'incompatibilité majeure sont les suivants :

- *C. canephora*, *C. liberica* et *C. pseudozanguebariae* pour *C. congensis* ;
- *C. liberica* et *C. canephora* pour *C. eugenioides* ;
- *C. pseudozanguebariae* pour *C. sessiliflora* ;

- *C. canephora*, *C. racemosa* et *C. liberica* pour *C. pseudozanguebariae* ;
- *C. liberica* et *C. pseudozanguebariae* pour *C. racemosa*.

Le greffage de *C. arabica*, espèce cultivée adaptée aux conditions climatiques d'altitude, présente un intérêt agronomique particulier pour sa culture dans les conditions pédoclimatiques de plaine et dans les sols infestés de nématodes. La plus forte amélioration de vigueur est obtenue avec *C. liberica*. Cependant, les risques connus de sensibilité à la trachéomycose de cette espèce lui feront préférer *C. canephora*, qui présente le double avantage d'être tolérante à cette maladie du système vasculaire ainsi qu'aux attaques de nématodes. Toutefois, le choix des porte-greffes pour la mise en culture de lignées de *C. arabica* devra porter sur des clones de *C. canephora* dont la compatibilité aura été préalablement vérifiée. Par ailleurs, l'influence d'une espèce dépourvue de caféine comme *C. pseudozanguebariae* prise comme porte-greffe, mériterait d'être étudiée sur *C. arabica*, dans les conditions de culture d'altitude et de plaine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CHARRIER A., 1978. La structure génétique des caféiers spontanés de la région malgache. *Mascarocoffea*. Leurs relations avec les caféiers d'origine africaine (*EUCOFFEA*). Thèse d'Etat Université de Paris XI (ORSAY), 223 pages.
- CRAMER P.J.S., 1957. A review of literature of *Coffea* research in Indonesia. SIC Editorial I.A.I.A.S. (Turrialba), Costa Rica, 262 pages.
- LE PIERRES D., 1987. Considérations sur les incompatibilités de greffe pour la culture des caféiers. ASIC (Paris), 12ème Colloque, Montreux, 783-790.
- LOUARN J., 1992. La fertilité des hybrides interspécifiques et les relations génomiques entre caféiers diploïdes d'origine africaine (genre *Coffea* L. sous-genre *Coffea*), Thèse d'Etat Université de Paris XI (ORSAY), 200 pages.
- REYNA E. H., 1968. La tecnica del injerto hipocotiledonar del cafeto para el control de nematodos. CAFE (Lima), Vol. 7, n°1, 5-11.
- SNOECK J., 1968. La rénovation de la caféiculture malgache à partir de clones sélectionnés. Café Cacao Thé, XII, 3, 223-235.

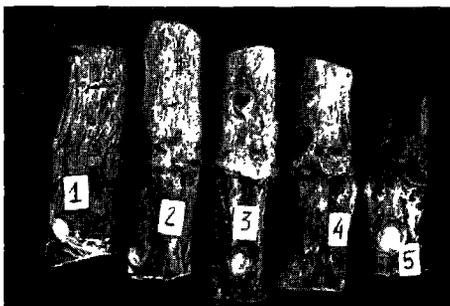
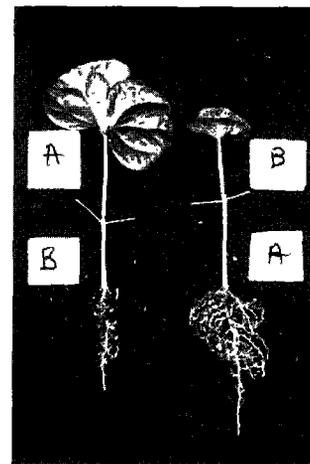
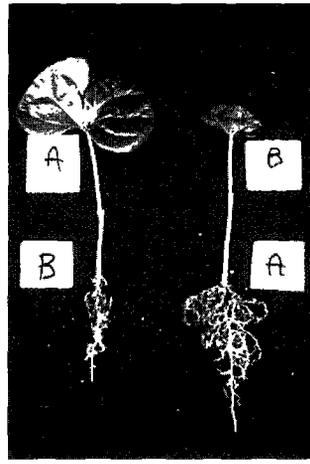
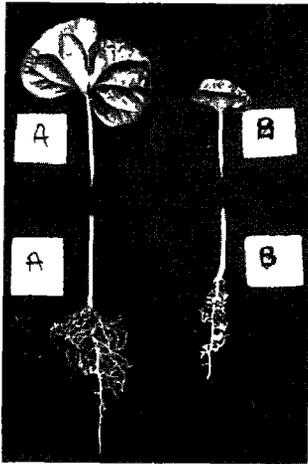
Résumé

La compatibilité de greffe de dix espèces du genre *Coffea* et d'une espèce du genre voisin *Psilanthus* a été testée selon un schéma diallele presque complet, soit 99 combinaisons étudiées. Le greffage a été réalisé en utilisant de jeunes plantes au stade "feuilles cotylédonaire".

Une observation détaillée au niveau de la greffe a été réalisée sur les caféiers greffés âgés de 4 ans, implantés en champ : la qualité de la soudure du porte-greffe et du greffon observée sur coupe met en évidence des incompatibilités plus ou moins marquées sur environ la moitié des combinaisons interspécifiques étudiées.

D'autres paramètres tels que la vigueur et le taux de survie en champ des plants greffés ont été également étudiés dans les conditions pédo-climatiques de la station de Man en Côte d'Ivoire. L'ensemble de ces informations permet de retenir les meilleures combinaisons pour l'installation des espèces cultivées et sauvages en collection et d'établir un choix des porte-greffes les plus favorables à la culture de *C. arabica*.

ANNEXE



ON THE USE OF DOUBLED HAPLOIDS IN GENETICS AND BREEDING OF *COFFEA CANEPHORA* P.

P. LASHERMES, A. CHARRIER, E. COUTURON

ORSTOM, Laboratoire de ressources génétiques et d'amélioration des plantes tropicales,
911 Av. Agropolis, BP 5045, F-34032 Montpellier Cedex 1, France

1- Introduction

Haploid plant production followed by chromosome doubling offers the possibility of developing completely homozygous genotypes from heterozygote parents in a single generation. Doubled haploids (DH) have received considerable interest in recent years as methods of creating haploids have become more efficient. Successful applications of doubled haploids in genetic and breeding programs have been developed in a large range of crop species including cereals, rapeseed and several *solanacea*. However, utilisation of DH in woody species has been very limited due to, mainly, the difficulty for producing sufficient numbers of DH (Chen Zhenghua, 1987).

Starting in 1980, ORSTOM has carried out a large program on development and utilisation of DH in *Coffea canephora*. Preliminary outcomes were presented during the 12th ASIC conference (Berthaud et al., 1987). In this report, we intend to outline the main results obtained and will attempt to discuss aspects of application of DH in genetics and breeding of *C. canephora*.

2- Method of creating doubled haploids

Success in coffee haploid production by *in vitro* culture technique has been limited so far (Lanaud, 1981 ; Carneiro, 1992). Therefore, use of the spontaneous haploids (Winton and Stettler, 1974) is the only efficient way presently available to produce DH in *C. canephora*. The spontaneous development of haploid embryo in *Coffea canephora* was first reported by Dublin and Parvais in 1975. In 1982, a method of DH production was proposed (Couturon, 1982 ; Couturon and Berthaud, 1982) based on grafting of haploid embryos occurring in association with polyembryony (Figure 1). Haploid embryos are of maternal origin as deduced from inheritance of morphological and enzymatic markers (Couturon, 1982 ; Valverde, pers. com.).

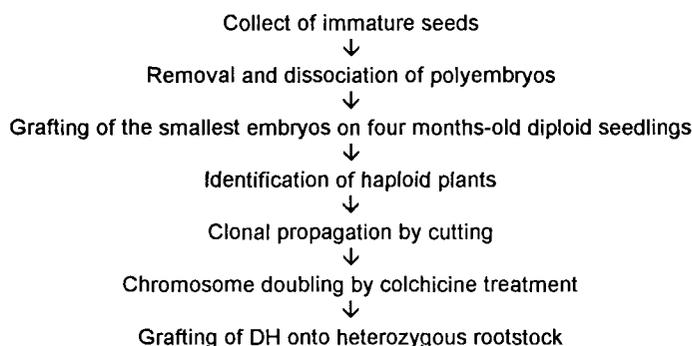


Figure 1. Main steps of DH production in *C. canephora* based on the haploid embryos occurring spontaneously in association with polyembryony.

Using this technique, DH's were produced from more than 40 different genotypes representing a large genetic diversity (Lashermes et al., 1993a). None genotype seemed recalcitrant to the method. Low aptitude of some genotypes for polyembryo and haploid development can be balanced by a high number of seeds examined. The number of haploid plants produced per 1000 examined seeds ranged from 0.1 to 1.4 depending on the genotype, and a mean production of 0.6 haploid plants per 1000 seeds was obtained. The best results were obtained from genotypes combining a high rate of polyembryo production and an important proportion of haploid among the plantlets obtained after grafting (Figure 2).

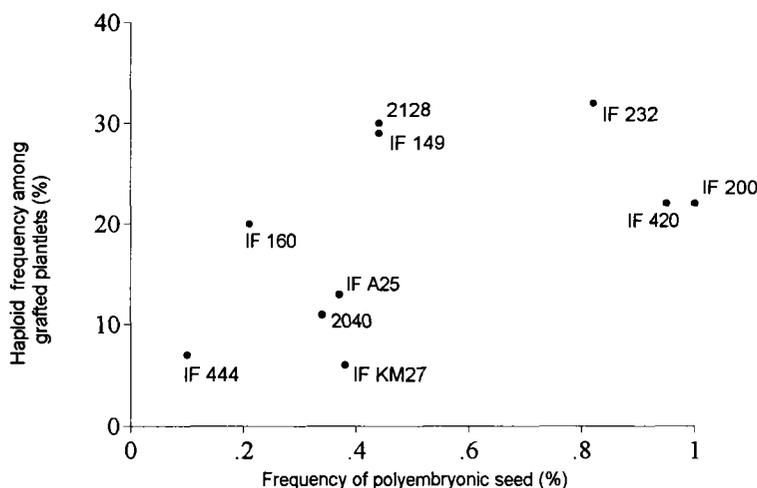


Figure 2. Rate of polyembryo production and proportion of haploid among grafted plantlets showed by different genotypes.

Increase in the production might be obtained by genetic and technical improvements. From some DH genotypes, production as high as 5 haploid plants per 100 seeds has been observed. Environmental factors during flowering time seem important, and applications of physical or physiological treatments such as delayed pollination should be considered. In spite of the embryo grafting process, it is reasonable to assume that a large part of haploid embryos did not survive, and technique as *in vitro* embryo rescue may be of interest.

3- Agronomic evaluation of doubled haploids

Evaluation under field conditions of more than 750 DH produced principally from 10 different genotypes has been accomplished (Lashermes et al., 1993a). Special care was given to the DH growing and adapted cultural practices (e. g. pruning, important quantity of fertilizer) were required. Nevertheless, most of DH genotypes showed a low vigor and approximately half of them did not survive in field conditions suggesting a strong, negative effect of homozygosity on plant development. Only about 5% of DH's exhibited a vigor comparable to a heterozygous tree.

Cultivated clones of *C. canephora* are only a few generations removed from their wild ancestors, and high level of heterozygosity is maintained by a self-incompatibility system (Berthaud, 1980). In consequence, the genetic load is assumed to be important, and the strict homozygosity of DH's may lead to the frequent expression of lethal or sub-lethal genes. Large difference in surviving rate (19% to 97%) observed between DH families (i.e. group of DH produced from the same genotype) would result from differences of the parental clones in frequency of recessive deleterious alleles.

From the observation of surviving DH's, the injurious effects of inbreeding appear dependent on characters. When comparing the mean value of DH families with their respective parental clone, inbreeding

depression appeared particularly severe on general vigor and reproductive aspects including cherry yield but limited, for instance, on leaf area (-20%), hundred beans weight (-20%) and resistance to leaf rust.

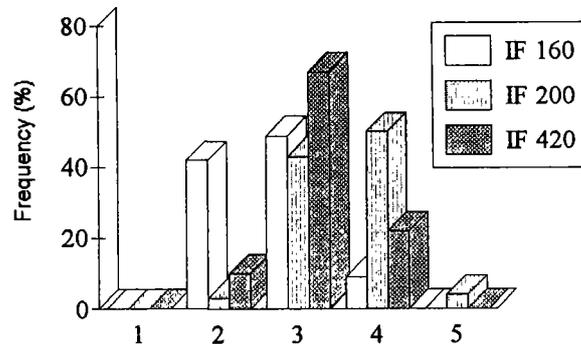


Figure 3. Frequency distributions of doubled haploid genotypes produced from different clones for susceptibility to leaf rust (1=resistant, 5= highly susceptible)

For all characters studied, considerable genetic variations were evidenced within and between DH families. As an example, the frequency distributions for susceptibility to leaf rust of DH's produced from different genotypes (clone) are presented in figure 3. Leaf rust (*Hemileia vastatrix*) susceptibility was scored by repeatedly observing trees on 1-5 scale. The distribution of DH's produced from the resistant clone IF 160 is skewed towards resistant levels (Berthaud and Lour, 1982). In contrast, the distribution of DH's produced from the moderately susceptible clone IF 200 is skewed towards susceptible levels. The distribution of DH's produced from IF 420 is centred on the parental clone value (moderately resistant).

Most of DH's had a very low cherry yield and none had a production comparable to a standard heterozygous plant. The low cherry yield of DH's is for a large part due to a reduced fruit set. Independently of the plant vigor, a high proportion of flowers "fell down" and did not produce fruit. This phenomenon, usual in *C. canephora*, is notably pronounced in the DH's, and may be related to physiological deficiencies. In addition, the DH's present a high frequency of peaberries and empty berries resulting in a low fruit filling coefficient. Despite few notable exceptions, most of DH's showed a fair level of pollen viability (> 50%) as estimated by aceto-carmin staining. This result was confirmed by the high success rate of crosses using DH genotypes as male parent.

4- Combining ability of doubled haploids

With regard to coffee breeding, a crucial aspect is the performance of DH in combination. Ninety-five DH's were crossed with either heterozygous genotypes or DH to determine their combining ability. The DH's tested were produced from 9 different genotypes but in majority from the clones IF 160 and IF 200. Several agronomic trials were established, and a number of characteristics were observed (Lashermes et al., 1993b). Strong vigor was evidenced for most hybrid combinations assayed. The reduced fertility that characterised the DH's was not observed at the hybrid level. Overall frequency of peaberries which are caused by ovule abortions, is similar for both hybrid combinations and standard clones.

DH's produced appeared to be a representative sample of the parental gametes when considering the agronomic traits analysed (Figure 4). The average value of a family of DH's, in terms of combining ability, did not differ from the value of the parental clone.

The variability of the combining ability for yield observed among DH's derived from IF 200 and IF 160 is considerable. DH's showed excellent combining ability when crossing with non-related genotype. Hybrid combinations had yields comparable to standard clonal varieties (IF 126, IF 202, IF 461). The most producing combinations were intergroup hybrids between a guinean accession and different DH's produced from clones belonging or related to the congolese pool. However, high yield was also observed for hybrids involving two DH's associated to the congolese pool.

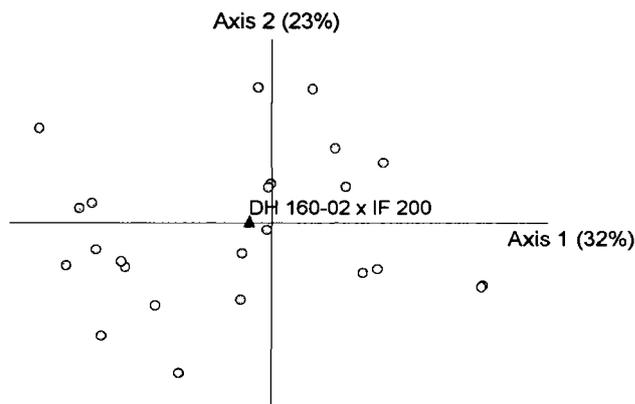


Figure 4. Principal component analysis for agronomic characteristics of top-crosses involving 24 DH produced from IF 200 and a common tester DH 160-02 ; position of the cross DH 160-02 x IF 200 is indicated as control.

Performances of an subset of hybrids were analysed as a factorial mating design involving 3 DH's produced from IF 160 as female parent and 4 DH's produced from IF 200 as male parent. Analyses indicated that all genetic variance was attributable to additive effects in estimates of yield as well as plant height, leaf area, leaf shape and hundred beans weight. The general combining ability variance was also predominant for stem girth and leaf rust susceptibility although effects due to interaction were detected. Importance of the general combining ability for yield (Figure 5) was confirmed by a second experiment involving 4 DH's produced from IF 160 and two genetically distant testers. Similar importance of the general combining ability has been observed by Bouharmont et al. (1986) and Leroy et al. (1993) in analysing incomplete diallel designs involving clones.

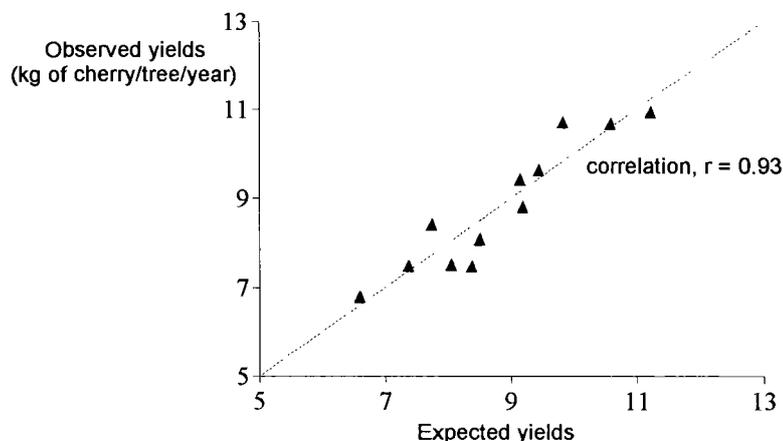


Figure 5. Observed yields of 12 hybrid combinations, resulting from a factorial mating design, plotted against yields predicted from parental general combining ability.

Rank correlation coefficients were calculated between characteristics of 21 DH's derived from IF 200 and their respective top-crosses using a common homozygous tester. Significant rank correlation coefficients were observed between values of DH's and their respective top-crosses for leaf shape and leaf area. On the other hand, no relationships were observed between vigor, yield of DH's, and height, girth and yield of top-crosses. These results may appear in contradiction with the importance of the general combining ability

observed. If only additive effects were involved, correlation in ranking values of DH and top-crosses would be expected. A possible explanation is that evaluation of DH's could be distorted since their strict homozygosity leads to the expression of recessive deleterious alleles. These alleles, responsible for a large part of the strong inbreeding depression, would be only expressed in homozygotes. Such situation where an important general combining effect coexists with a strong inbreeding depression has been frequently reported for allogamous species (Gallais 1989) including trees species (Lanaud, 1987 ; Namkong and Kang 1990).

5- Applications in coffee breeding

Current breeding programs (Charrier and Berthaud 1988) are directed to the development of varieties distributed either through seed (synthetic and hybrid varieties) or after vegetative propagation (clone). Synthetic (hybrid) varieties can be produced at much lower cost, and are easier to distribute than the clonal varieties (Duris 1985). However, the heterozygous nature of parents causes large variation in offspring and interest in synthetic and hybrid varieties is therefore limited (Capot 1977, Charmetant et al. 1990).

DH, not only provides unique information's on genetics of *C. canephora* but, could be used as homozygous parents in the production of F₁ hybrids (Figure 6). This new type of variety could combine several advantages: low cost, full benefit from heterosis, homogeneity. However, it may raise several difficulties. Inbreeding masks the real potential of DH and no prediction of their value as progenitors seems to be possible before trial. Number of DH that can be tested for combining ability is technically and economically limited. Results in this study indicate that the mean combining ability of a DH family can be anticipated from the value of the parental clone. So, a partial solution could be to focus the production of DH on clones showing the best combining abilities (Bouharmont et al., 1986 ; Leroy, 1993). Another difficulty in developing F₁ hybrid varieties is seed production. Yield of most DH is limited, and both parents of hybrid should be compatible with synchronised flowering. A preliminary selection among DH could be made on the characters directly related to the production of seeds ; the selected trees being subsequently tested for combining ability. The development of three-way crosses or double crosses could be an interesting approach to reduce seed production difficulty. In addition, three-way crosses (double crosses) varieties would be heterogeneous for the self-incompatibility genes and could avoid the necessity to mix varieties in the plantations to insure cross-pollination.

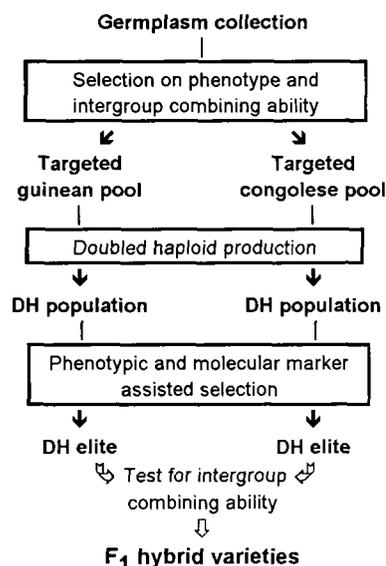


Figure 6. Development of hybrid varieties using doubled haploids in *C. canephora* (modified after Charrier and Berthaud, 1988).

In relation with the reciprocal recurrent selection program (Comstock et al. 1949) developed in *C. canephora* (Leroy 1993), a straightforward utilisation of DH would be to use selected DH genotypes as tester. Since the general combining ability is predominant, improvement of populations would not be affected. Absence of genetic variability attributable to the parent tester in the testing progeny should lead to a higher selection efficiency.

6- Conclusion and prospects

Ability to produce large number of DH from almost any genotypes in *C. canephora* affords a unique opportunity to assess the interest of doubled haploids in woody species. The method used, although time-consuming, does not require any particular facilities and production of DH based on the spontaneous occurrence of haploid plants in association with polyembryony, could be achieved in any coffee research station.

Only via haploidy can inbred lines be developed in a self-incompatible diploid crop with a long juvenile period such as *C. canephora*. Despite the inbreeding depression, DH's have a great potential in genetic and coffee breeding programmes. DH's produced from the same clone present large genetic variations and genetic analysis of important characters (e.g. incompatibility system, leaf rust resistance, caffeine content) can be undertaken. DH's are particularly well suited to detect the additive effects of quantitative trait loci (QTL) via linkage to genetic markers (Knapp et al., 1990 ; Lashermes et al., 1993c). Regarding coffee breeding, the DH's provide the possibility to develop F₁ hybrid varieties. This application could have a considerable impact on coffee cropping but requires additional study. Particularly, seed production technology will need further attention, and agronomic multilocal trials have to be established.

References

- Berthaud J., 1980. L'incompatibilité chez *Coffea canephora*: méthode de test et déterminisme génétique. *Café Cacao Thé*, 24: 267-274.
- Berthaud J., Charrier A., Couturon E., Louarn J., Valverde V., 1987. Utilization of *coffea canephora* haploids: results of studies in progress. 12th Conference of ASIC, Montreux, pp. 453-458.
- Berthaud J. and Lourd M., 1982. La résistance à *Hemileia vastatrix* des caféiers de l'espèce *Coffea canephora* de Côte d'Ivoire. Etude de la transmission de ce caractère par croisements contrôlés. *Lisboa. Garcia de Orta, Sér Est agron*, 9(1-2): 89-96.
- Bouharmont P., Lotodé R., Awemo J., Castaing X., 1986. La sélection générative du caféier robusta au cameroun. *Café Cacao Thé*, 30: 93-112.
- Capot J., 1977. L'amélioration du caféier Robusta en Côte d'Ivoire. *Café Cacao Thé*, 21: 233-244.
- Carneiro M.F., 1992. Androgenesis on cvs. *Coffea arabica* L. Eucarpia congress, Angers, France, poster abstracts, pp. 143-144.
- Charmetant P., Leroy T., Bontems S., Delsol E., 1990. Evaluation d'hybrides de *Coffea canephora* produits en champs semenciers en Côte d'Ivoire. *Café Cacao Thé*, 34: 257-263.
- Charrier A., Berthaud J., 1988. Principles and methods in coffee plant breeding: *Coffea canephora* Pierre. In: Clarke RJ and Macrae R (eds) *Coffee vol. 4: Agronomy*, pp. 167-197. Elsevier Applied Science, London.
- Chen Zhenghua, 1987. Induction of androgenesis in hardwood trees. In: Bonga J.M. and Durzan J. (eds) *Cell and tissue culture in forestry*, vol. 2, pp.247-268. Martinus Nijhoff publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster.

- Comstock R.E., Robinson H.F., Harvry P.H., 1949. A breeding procedure designed to make maximum use of both general and specific combining ability. *Agron. J.*, 41: 360.
- Couturon E., 1982. Obtention d'haploïdes spontanés de *Coffea canephora* Pierre par l'utilisation du greffage d'embryons. *Café Cacao Thé* 26 (3): 155-160.
- Couturon E., Berthaud J., 1982. Présentation d'une méthode de récupération d'haploïdes spontanés et d'obtention de plantes diploïdes homozygotes chez les caféiers de l'espèce *C. canephora*. 10th Conference of ASIC, Salvador, pp. 385-389.
- Dublin P., Parvais J.P., 1975. Note sur les premiers haploïdes spontanés découverts chez le *Coffea canephora* var. *robusta*. *Café Cacao Thé* 19 (3): 191-196.
- Duris D., 1985. Clones ou semences? Résultats d'essais comparatifs et multilocaux. 10th Conference of ASIC, Salvador, pp. 385-389.
- Gallais A., 1989. Théorie de la sélection en amélioration des plantes. Coll. Science Agronomique, Masson, Paris, 588 p.
- Knapp S.J., Bridges W.C., Birkes J. and D., 1990. Mapping quantitative trait loci using molecular marker linkage maps. *Theor Appl Genet* 79: 583-592.
- Lanaud C., 1981. Production de plantules de *C. canephora* par embryogenèse somatique réalisée à partir de culture *in vitro* d'ovules. *Café Cacao Thé* 25: 231-236.
- Lanaud C., 1987. Doubled haploids of cocoa (*Theobroma cacao* L.). 2. Observations of monogenic and polygenic characters. *Plant Breed.*, 99: 196-202.
- Lashermes P., Couturon E., Charrier A., 1993a. Doubled haploids of *Coffea canephora*: development, fertility and agronomic characteristics. *Euphytica*, In press.
- Lashermes P., Couturon E., Charrier A., 1993b. Combining ability of doubled haploids in *Coffea canephora*. *Plant Breed.*, In press.
- Lashermes P., Paillard M., Marmey P., Gavalda M.C., Couturon E., Petiard V., Charrier A., 1993c. Toward the construction of a genetic map in coffee. Poster abstracts, 15th Conference of ASIC, Montpellier, France.
- Leroy T., 1993. Diversité, paramètres génétiques et amélioration par sélection récurrente réciproque pour une plante tropicale pérenne, le caféier *Coffea canephora* P. Thèse de doctorat, ENSA de Rennes, 143 p.
- Leroy T., Montagnon C., Charrier A., 1993. Etude des paramètres génétiques chez *Coffea Canephora* P., 15th Conference of ASIC, Montpellier, France.
- Namkoong G. and Kang H., 1990. Quantitative genetics of forest trees. In: Jules Janick (ed) *Plant breeding reviews*, vol. 8, pp. 139-187. Timber press.
- Winton L.L., Stettler R.F., 1974. Utilization of haploidy in tree breeding. In: *Haploids in Higher Plant*, Proc of the 1st International Symposium. Univ of Guelph, Canada, pp. 259-273.

Summary

Doubled haploids (DH) of *Coffea canephora* were developed using haploid embryos that occur spontaneously in association with polyembryony. More than 750 DH's produced from various genotypes were brought under field conditions. Inbreeding depression was particularly severe on general vigor and reproductive aspects. Agronomic performances of hybrids involving different DH's were evaluated. Important heterosis was evidenced. Hybrid combinations had yields comparable to standard clonal varieties. Relative importance of additive and nonadditive genetic factors was estimated for different agronomic characters. Implications of such results for genetic studies and breeding of *Coffea canephora* are discussed.

TETRAPLOID INTERSPECIFIC HYBRIDS IN COFFEE BREEDING IN INDIA

M. S. SREENIVASAN, A. S. RAM, N. S. PRAKASH

Central coffee research institute, India

I N T R O D U C T I O N

Diploid species of Coffea L. as a source of resistance to leaf rust (Hemileia vastatrix B. et Br.) were well recognized a long time ago. This led to the search and discovery of spontaneous interspecific hybrids such as Kalimas, Kawisari, Devamachy and Hibrido de Timor. Besides this there is evidence in the literature indicating artificial generation of hybrids involving C. arabica and diploid species of Coffea such as C. liberica and C. canephora. These are being extensively utilized in the coffee breeding programmes in different countries. Present paper highlights the exploitation of interspecific hybrids in the coffee breeding programme in India and outlines the possibilities for future.

ORIGIN AND EVOLUTION

Spontaneous Interspecific Hybrids : Until 1900, C. arabica was the only species under cultivation in India. The ravages of leaf rust on arabica coffee in Sri Lanka prompted the Indian planters

to introduce other species of Coffea such as C. liberica, C. canephora and C. excelsa to combat the disease problem. Cultivation of these species together with C. arabica resulted in natural hybridization culminating in the appearance of spontaneous interspecific hybrids (Carvalho et al. 1969). Of the various hybrids spotted in India, S.26 (C. arabica x C. liberica) and Devamachy (C. arabica x C. canephora) are worth mentioned. Exotic Hibrido de Timor was added to the gene bank at CCRI during 1961.

Artificial Interspecific Hybrids : The importance of interspecific hybrids in breeding strains of coffee resistant to rust was recognized as early as the first half of the 19th Century (Srinivasan and Narasimhaswamy 1975). Mr. Hamilton of Chandrapore Estate was known to have successfully hybridized C. arabica and C. liberica producing the popularly known Hamilton hybrid. This was followed by the appearance of a series of hybrids known by names Jackson hybrid, Netraconda hybrid etc. being produced by several other planters. In spite of all these efforts, commercially viable plant material could not be evolved and the necessity of a systematised approach to resolve this problem was felt. As a result, the Mysore Coffee Experiment Station (present Central Coffee Research Institute, Balehonnur, India) was founded in the year 1925. Plant breeding group of the Institute has taken up the development of interspecific hybrids. Interspecific hybrids C. arabica x C. canephora and C. liberica x C. eugenioides are worth mentioned here as they led to the evolution of commercially cultivated selections in India.

EXPLOITATION

The first interspecific hybrid to be exploited in India was S.26, a collection from Doobla Estate. S.26 was reported to have been resistant to races I and II of H. vastatrix (Srinivasan and Narasimhaswamy 1975). First selfed progeny of this culture (S.288) was given for commercial cultivation by 1936-37 (Vishveshwara 1974). S.288 was indicated to manifest segregation which does not conform to the Mendelian ratios (Srinivasan and Narasimhaswamy 1975) giving rise to a majority of maternal types. To combine the quality characters found in Kents and the resistance of S.288,

hybridization was effected and selection exercised in the progenies to eliminate susceptible segregants. By 1947 seed from an F_2 family S.795, of this cross was given out for commercial cultivation. These early Indian selections carry SH_3 factor known to be present in C. liberica and thus differ from rest of the cultivated arabicas. These cultivars represent the coffee physiologic types G (S.288, SH_3 SH_5) and H (S.795, SH_2 SH_3 SH_5) (Rodrigues et al. 1975).

Later, Devamachy, a putative Robusta-Arabica hybrid was utilized in the plant breeding programme. S.881, a wild arabica from Rume Sudan was known for its horizontal resistance to rust (Eskes 1983). In an effort to combine the vertical resistance of Devamachy and horizontal resistance of S.881, hybridization was effected between them. Uniformly vigorous and highly resistant populations were evolved by exercising selection up to three generations and released for commercial cultivation. These populations have proven to be consistent high yielders also. One F_2 family from another cross S.333 x Devamachy was also exploited on account of its productivity and high resistance. Segregation behaviour of this line was shown in Table 1.

The discovery of Hibrido de Timor and its high vertical resistance (A-type) paved the way for its utilization in the coffee breeding programmes all over the World (Bettencourt 1973). Hibrido de Timor was utilized in producing several F_1 hybrids in India. Productivity of these hybrids was reported to be transgressive to the parents, thus manifesting a high magnitude of heterosis (Sreenivasan and Ram 1992). Observations on disease resistance of these hybrids are presented in table 1. Interestingly, the derivatives of reciprocal crosses manifested diverse patterns of resistance in the field conditions. Thus, F_1 of Hibrido de Timor (HDT) x Tafarikela exhibited 100 percent resistance while its reciprocal manifested only 68% resistance. Similarly, F_1 of HDT x Bourbon manifested 97 percent resistance in contrast to 59% resistance of the F_1 of Bourbon x HDT. F_1 hybrid of HDT x Geisha manifested 96 percent resistance while F_1 hybrids of S_{12}

Kaffa x HDT and S.795 x HDT showed 90% and 93% resistance respectively. Among these hybrids it is evident that the segregation load ranging between 3 and 10 percent is reflective of the segregation of HDT which fits into the complimentary gene action system. Moreover, HDT as the maternal parent appears to be imparting a greater degree of resistance to the progenies possible by the influence of cytoplasmic factors. By comparison, it can be seen that Devamachy hybrid progenies also exhibit a similar segregation behaviour (Table 1).

Artificial interspecific hybrids involving C. arabica and induced autotetraploid C. canephora were produced in Brazil as early as 1950 (Monaco 1977). The vigour and good adaptation to tropical low lands observed in these hybrids prompted other coffee growing countries also to undertake similar hybridization programmes resulting in the evolution of Arabusta hybrids (Capot 1972). However, in Brazil, repeated back crossing of the Arabusta hybrids to arabica cultivars Mundo-Novo and Caturra resulted in the development of Icatu populations (Monaco et al. 1974). A comparative study of C. arabica, Arabusta and the BC₁ and BC₂ progenies (to arabica) revealed that the quality traits in the F₁ and back-cross progenies are inferior to C. arabica (Van der Vossen and Owuor 1981). Slow improvement in quality was stated to be the major deficiency of the interspecific hybridization programme in improvement of arabica Coffee (Van der Vossen 1985). However, in India, C. arabica (2n = 4 x = 44) and C. canephora (2n = 2 x - 22) were crossed without involving doubling of chromosomes in C. canephora. The triploid F₁ was back-crossed to C. arabica to derive BC₁ and BC₂ progenies and selection was exercised in the BC₂ to derive selfed descendants which are released for commercial cultivation. These populations comprise plants of arabica phenotype with uniform, vigorous growth, compact clusters and high leaf rust resistance (Table 1). Quality characteristics of their produce was found to be on par with the arabica parent (Sreenivasan 1983).

Another interesting interspecific hybrid released for commercial cultivation in India is a descendant of the cross C. liberica x C. eugenioides. Spontaneous doubling of chromosomes in the F₁ hybrid was utilized to produce the commercial culture S.2464 (2n=4x=44) (Narasimhaswamy and Vishvashwara 1967, Reddy 1976). The hybrid shows good seed set upon selfing and cross pollination in both directions with C. arabica, thus showing reproductive stability. It was found to be performing well in marginal and sub-marginal coffee tracts and remained free from incidence of rust. (Table 1).

FUTURE POSSIBILITIES

Keeping the possible future challenges to the Industry in view, the following few lines of work is envisaged.

Catimor/Cauvery genotypes were found to be well adapted to the various coffee growing areas of India. Using this and other hybrids produced at CCRI a comprehensive Double Cross Hybrid programme is designed to evolve types with high adaptability, productivity and resistance. Twenty six double cross hybrids are thus produced and certain promising ones are under trial.

Incomplete resistance characterised by the non-sporulating and necrotic infections of H. vastatrix is observed in several of the hybrid lines in variable proportions. Characterisation of this resistance and evolving a transmission strategy for this trait will form the basis for breeding for durable resistance to leaf rust.

Horizontal resistance observed in Rume Sudan collection S.881 also requires to be characterised and studied in depth, in view of the high resistance observed in the Devamachy x S.881 descendants.

Besides the above a detailed survey to identify, collect & conserve the elite types in the existing spontaneous/artificial interspecific hybrids in an exclusive germplasm bank is contemplated. The survey also aims at collecting possible new genotypes of interspecific origin to serve as sources of resistance in future breeding.

TABLE 1 : Rust resistance pattern in the descendants of tetraploid interspecific hybrids.

HYBRID/PARENTAGE	RUST RESISTANCE (%)		
	Resistant	Incompletely Resistant	Susceptible
Spontaneous Interspecific Hybrids			
Devamachy x S.333	85.00-90.00	10.00-13.00	2.00 or less
Devamachy x S.881	100.00	-	-
Hibrido de Timor (HDT)	75.00	20.00	5.00
HDT x Tafarikela	100.00	-	-
Tafarikela x HDT	66.00	2.00	32.00
HDT x Bourbon	94.00	3.00	3.00
Bourbon x HDT	59.00	2.00	39.00
HDT x Geisha	86.00	10.00	4.00
S ₁₂ Kaffa x HDT	90.00	-	10.00
Artificial Interspecific Hybrids			
<u>C. arabiea</u> Kents x			
<u>C. canephora</u> S.274	85.00-90.00	0- 15.00	5.00-15.00
<u>C. liberica</u> x			
<u>C. eugenioides</u>	85.00-100.00	0-15.00	-

R E F E R E N C E S

- Bettencourt, A.J. 1973. Consideracoes gerais sobre o 'Hibrido de Timor'. Circular No 23, Instituto Agronomico, Campinas, Sao Paulo.
- Capot, J. 1972. L'amelioration du cafeier en Cote d' Ivoire. Les hybrides Arabusta. Cafe Cacao 16:3-16.
- Carvalho, A., Ferwerda, F.P., Frahm-Leliveld, J.A., Medina, D.M., Mendes, A.J.T., Monaco, L.C. 1969. Coffee : *Coffea arabica* L and *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. IN **Outlines of perennial crop breeding in the tropics**. (Eds. F.P. Ferwerda & F. Wit) pp. 189-241. H. Veenaman & Zonen N.V., Wageningen.
- Eskes, A.B. 1983. Incomplete resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). Ph.D. Thesis, Agricultural University of Wageningen.
- Monaco, L.C. 1977. Consequences of the introduction of coffee rust into Brazil. Annals of the New York Academy of Sciences. 287:57-71.
- Monaco, L.C., Carvalho, A. Fazouli, L.C. 1974. Melhoramento do cafeeiro : germoplasma do cafe Icatu e seu potencial no melhoramento. In **Resumos Segundo Congresso Brasileiro do Pesquisas Caffeeiros**, Pocos de Caldas, M.G. Brazil, p. 103.
- Narasimhaswamy, R.L., Vishveshwara .S 1967. Progress report on hybrids between diploid species of *Coffea* L. Turrialba 17: 11-17.
- Reddy, A.G.S. 1976. Cyto-morphological studies in three diploid species of *Coffea* and their hybrids and hybrid progeny, Ph.D. Thesis, University of Mysore.
- Rodrigues, C.J. Jr., Bettencourt, A.J., Rijo, L. 1975. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. Ann. Rev. Phytopathology 13: 49-70.
- Sreenivasan, M.S. 1983. Cyto-embryological studies of coffee hybrids. Ph.D Thesis, University of Mysore.
- Sreenivasan, M.S., Ram, A.S. 1992. Heterosis for yield in coffee. In **PLACROSYM X** (in press).

- Srinivasan, K.H. Narasimhaswamy, R.L. 1975. A review of coffee breeding work done at the Government Coffee Experiment Station, Balehonnur. *Indian Coffee* XXXIX: 311-321.
- Van der Vossen, H.A.M., Owuor, J.B.O. 1981. A programme of interspecific hybridization between arabica and robusta coffee in Kenya. *Kenya Coffee* 46: 131-137.
- Van der Vossen, H.A.M. 1985. Coffee selection and breeding. IN **Coffee : Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage.** (Eds. M.N. Clifford and K.C. Wilson) pp. 48-96. Avi Publishing Co. Inc., Westport.
- Vishveshwara, S. 1974. Coffee breeding in India. *Indian J. Genet.* 34A:101-109.

HETEROSIS AND COMBINING ABILITY IN COFFEE (*COFFEA ARABICA* L.)¹

BAYETTA-BELLACHEW², MESFIN AMEHA³, DEJENE MEKONNEN⁴

¹ Part of M.Sc. thesis submitted by the senior author to AUA

² Plant breeder, Institute of Agricultural Research, Jimma Research Centre, P.O. Box 192, Jimma, Ethiopia

³ Associate professor of plant breeding, Alemaya University of Agriculture (AUA), Debre Zeit Research Centre, P.O. Box 32, Debre Zeit, Ethiopia

⁴ Associate professor of plant breeding, former president of AUA, Alemaya, Ethiopia

INTRODUCTION

There is high genetic variability of arabica coffee (*Coffea arabica* L.) in Ethiopia (1,4,11,19) that offers immense possibilities for the development of improved varieties. Information about heterosis and combining ability in crosses among these indigenous variability is essential to maximize their use through hybrid development. At present, limited information of this type is available.

Mesfin (12) and Mesfin and Bayetta (13) evaluated a set of 5 x 5 diallel crosses among indigenous cultivars. They observed positive better-parent heterosis of as high as 60% for yield and 30% for components of yield. Srinivasan and Vishveshwara (18) obtained up to a maximum of 100% better-parent yield heterosis from a cross between directly introduced Ethiopian material and hybrid variety. Walyaro (20) reported better-parent heterosis of 10 - 209% for yield of fresh cherry and 8 - 300% for yield of clean coffee. In Brazil, however, heterosis in crosses among arabica coffee varieties was found to be low or lacking (2,9).

Estimates of the relative amount of general combining ability (GCA) and specific combining ability (SCA) effects play a vital role in planning appropriate breeding programme (5,6,10). In coffee no much work has been done in this regard. However, Mesfin (12) and Mesfin and Bayetta (13) reported highly significant SCA for yield and significant or highly significant GCA and SCA for components of yield and indicated the importance of both additive and nonadditive gene actions exploitable for yield improvement. Similarly, Walyaro (21) observed highly significant GCA and SCA for yield and 8 selected characters. He also noted that the proportion of GCA and SCA variances were roughly proportional for most of the characters.

The amount of hybrid heterosis depends largely on the genetic divergence of parental varieties (5,14). In other crops, for example, in maize (*Zea mays* L.) the effect of genetic diversity with respect to geographical origin (14); in wheat (*Triticum aestivum* L.) genetic diversity with respect to maturity group (7), geographical origin and morphological traits (33) of parents is well recognized. In coffee eventhough such cases are generally understood, no systematic work has been conducted. However, Watkins (22) while reassessing the results of hybridization experiments on indigenous coffee (12,13) noted maximum yield heterosis in crosses involving parents of different geographical origin and different phenotype.

In the present study, six parents selected based on yield, CBD resistance, geographical origin and

morphological characters were employed and the objectives were to : (1) measure the degree of heterosis for seedling characters (2), estimate the importance of GCA and SCA effects in the inheritance of variable characters and (3) determine whether parents of diverse geographical origin and morphological characters produce hybrids of greater heterosis.

MATERIALS AND METHODS

Six parents were chosen for this study; two from each of three geographical locations, viz., Illubabor (I), Kaffa (K) and Sidamo (S) regions based on yield potential, CBD resistance and morphological characters from germplasm bank at Jimma Research Centre (Table 1). Crosses were made among the parents using Griffin's (6) half dialled crossing system Model I Method 4. A cross was also made between 741 and F59 to include variety Ababuna as a check. Concurrently, the parental lines were selfed.

Table 1. Description of parental lines.

Parent	Code	Collection area	Altitude (cm)	Growth habit	Description					
					Inter-node length (cm)	Leaf size & shape	Leaf tip color	Fruit size & shape	CBD (%)	Rust (%)
74110	P1	Mettu, Illubabor	1710	C	2.1	S & N	G	La & R	1.72	1.45
74158	P2	Mettu, Illubabor	1710	MC	2.5	Lo & N	G	MLa & R	0.24	0.76
20071	P3	Bero/Maji, Kaffa	1575	MO	3.4	S & MB	G	Lo & N	5.00	64.00
221A71	P4	Kasi/Maji, Kaffa	1550	O	4.2	Lr & B	G	S & N	6.00	20.00
1377	P5	Wonago, Sidamo	1900	MO-O	3.8	Lr & VB	Br	Lo & B	3.50	18.00
1577	P6	Handido, Sidamo	1825	VO	4.4	Lo & B	Br	Mlo & MB	3.80	14.15

C = Compact; M = Medium; O = Open; V = Very; S = Small; N = Narrow; Lo = Long; Lr = Longer; B = Broad; Lt = Light; R = Round; Ob = Oblong; G = Green; Br = Bronze; La = Large

Polythene tube were prepared and filled with mixed media of forest soil and sand at the ratio of 2 : 1, respectively, and then arranged in four blocks against the direction of the morning and afternoon light. Seeds were sown using randomized complete block design in four replications with 10 seeds per plot. All nursery management practices were properly and uniformly applied to all plots through out the study period.

When the seedlings became seven months old, five uniform seedlings were selected per plot and tagged. Seven important seedling characters, viz., stem girth, height, internode length, shoot fresh and dry weights, shoot volume and leaf area were recorded from individual seedling following the established procedure.

Analysis of variance for F1 hybrids was performed for each character. The significance of differences between any pair of hybrid means was tested using LSD at 0.05 and 0.01 probability levels. Percentage heterosis of F1 hybrids over the mid-parent (MP) and better-parent (BP) were calculated. The significance of the deviation of the F1's from the MP and BP were determined using LSD. Combining ability analysis of variances and effects and the predominance of additive versus nonadditive gene actions were computed according to Griffing's (6) Model I Method 4 and Singh (18). The effect of parental diversity on hybrid heterosis was examined based on variations between the two parents of each hybrid in geographical origins and nine morphological characters following similar method to that of Falconer (5) and Watkins (22).

RESULTS AND DISCUSSIONS

The analysis of variance revealed highly significant differences between F1 hybrids for all the seven characters recorded (Table 2). The fact that the trial was conducted under fairly controlled nursery environment, the observed differences might be attributed more to genetic factors than to the environment.

Hybrid P1 x P5 consistently exhibited the highest mean performance for all characters except root volume (Table 3). Other hybrids like P3 x P4, P1 x P6, P1 x P4 and P5 x P6 were also accordingly among the top five hybrids, while P4 x P5, P4 x P6, P1 x P2 and P2 x P5 were the poorest ones for almost all characters. The over all mean of the 15 F1 hybrids, were, however, greater than the mean of the parents and there were at least 5 hybrids that exceeded the top parent and control for each character. In conformity to the previous findings (12, 13, 19, 21) these results showed the

apparent advantage of hybrids over their parents and the possibility to make further progress through hybridization among indigenous selections.

Table 2. Mean squares from the analysis of variance for seven seedling characters in coffee.

Source of variation	D.F	Mean squares						
		Girth (cm)	Height (cm)	Internode length (cm)	Shoot fresh wt. (gm)	Shoot dry wt. (gm)	Shoot volume (ml)	Leaf area (cm ²)
Blocks (B)	3	0.001	29.56	1.55	7.703	1.300	12.53	118.03
Genotypes (G)	14	0.012**	31.34**	1.17**	7.506**	0.680**	8.13**	86.65**
B X G	42	0.002	4.29	0.29	1.698	1.163	1.87	29.50
Error	240	0.002	2.31	0.18	0.834	0.088	0.74	13.25

** , Significant at 0.01 probability level.

The F1 hybrids exhibited positive mean heterosis over the MP and BP ranging from 6 to 24% and 3 to 18%, respectively (Table 4). Based on individual hybrids, the magnitude of BP heterosis ranged from -28% (P4 x P5) for internode length to 65% (P1 x P4) for shoot volume and out of the 15 hybrids at least 12 and 9 hybrids had positive MP and BP heterosis for any one of the characters, respectively. Among the hybrids P1 x P3, P1 x P4, P1 x P5, P1 x P6, P3 x P4 and P5 x P6 consistently exhibited a considerable amount of positive MP and BP heterosis followed by P2 x P4 and P3 x P5 for almost all characters.

Table 3. Mean performance of parents and their F1 hybrids of coffee for seven seedling characters.

Treatment	Girth (cm)	Height (cm)	Internode length (cm)	Shoot fresh wt. (gm)	Shoot dry wt. (gm)	Shoot volume (ml)	Leaf area (cm ²)
Hybrid							
P1 x P2	0.356	11.83	1.7	3.390	1.035	3.25	13.0
P1 x P3	0.369	13.65	1.9	3.912	1.321	3.72	15.3
P1 x P4	0.374	12.99	2.0	4.661	1.417	4.52	16.4
P1 x P5	0.391	14.40	2.2	4.715	1.473	4.28	18.4
P1 x P6	0.384	13.75	2.0	4.625	1.373	4.13	18.0
P2 x P3	0.383	11.85	1.6	3.307	1.056	3.09	13.0
P2 x P4	0.384	11.66	1.8	3.500	1.105	3.04	13.5
P2 x P5	0.354	12.46	1.7	3.497	1.083	3.24	13.6
P2 x P6	0.358	12.68	1.7	3.900	1.205	3.29	14.8
P3 x P4	0.360	13.88	2.0	4.642	1.421	4.56	17.0
P3 x P5	0.353	13.72	2.1	3.765	1.197	3.59	14.6
P3 x P6	0.331	12.93	1.8	3.549	1.090	3.08	14.4
P4 x P5	0.301	9.93	1.3	2.733	0.849	2.49	10.9
P4 x P6	0.326	11.01	1.5	3.380	1.029	2.95	13.7
P5 x P6	0.372	13.85	2.1	4.396	1.360	4.19	16.7
Mean	0.360	12.71	1.8	3.865	1.201	3.56	14.9
Parent							
P1	0.352	11.40	1.6	2.846	0.905	2.66	11.0
P2	0.364	11.62	1.6	3.358	1.034	3.28	11.6
P3	0.337	13.04	1.8	3.486	1.087	3.34	13.2
P4	0.306	9.42	1.3	2.807	0.886	2.68	11.8
P5	0.337	12.12	1.8	3.085	0.960	3.10	13.1
P6	0.335	11.46	1.6	3.224	0.996	2.89	12.3
Mean	0.339	11.51	1.6	3.134	0.978	2.99	12.2
Control							
741 x F59	0.348	12.19	1.9	3.666	1.140	3.45	15.7
741	0.333	12.31	1.9	2.720	0.850	2.42	12.0
F59	0.332	9.91	1.4	2.802	0.909	2.53	12.6
LSD							
0.05	0.028	0.94	0.3	0.566	0.184	0.53	2.3
0.01	0.036	1.24	0.4	0.774	0.242	0.70	3.0
C.V (%)							
	12.4	12.0	23.6	23.6	24.7	24.2	24.4

Table 4. Heterosis over the mid-parent (OMP) and better parent (OBP) for seven characters of coffee seedlings.

Hybrid Code	Heterosis (%)													
	Girth (cm)		Height (cm)		Internode length (cm)		Shoot fresh wt. (gm)		Shoot dry wt. (gm)		Shoot volume (cm)		Leaf area (cm ²)	
	OMP	OBP	OMP	OBP	OMP	OBP	OMP	OBP	OMP	OBP	OMP	OBP	OMP	OBP
P1 x P2	-1	-2	3	2	6	6	9	1	7	0	9	-1	15	12
P1 x P3	7	5	12**	5	12	6	24*	12	33**	22*	24**	11	26**	16
P1 x P4	14**	6	25**	14**	33**	25**	65**	64**	58**	57**	69**	69**	44**	39**
P1 x P5	13**	11**	23**	19**	29**	22**	59**	53**	58**	53**	49**	38**	52**	41**
P1 x P6	12**	9*	20**	20**	25**	25**	52**	44**	44**	38**	49**	43**	54**	46**
P2 x P3	9*	5	-4	-9*	-6	-11	-3	-5	-1	-6	-7	-8	6	-1
P2 x P4	15**	6	11*	0	20*	13	14	4	15	7	2	-8	15	14
P2 x P5	1	-3	5	3	0	-6	9	4	9	5	2	-1	10	4
P2 x P6	2	-2	10*	9*	6	6	19*	16	19*	17	7	0	23*	20*
P3 x P4	12**	7	24**	6	25**	11	48**	33**	44**	31**	52**	37**	36**	29**
P3 x P5	5	5	9*	5	17*	17*	15	8	17	10	12	8	11	11
P3 x P6	-2	-2	6	-1	6	0	6	2	5	0	-1	-8	13	9
P4 x P5	-7	-11**	-8	-18**	-19*	-28**	-7	-11	-8	-12	-14	-20**	-13	-17
P4 x P6	2	-3	6	-4	0	-6	12	5	9	3	6	2	13	11
P5 x P6	11**	10**	18**	14**	24**	17**	39**	36**	39**	37	40**	35**	32**	28**
Mean	6	3	11	4	12	6	24	18	23	17	20	13	22	18
Control (741 x F59)	5	5	18**	7	12	0	33**	31**	30**	25*	39**	36**	28**	25**

** significant at 0.05 and 0.01 probability levels, respectively.

It seemed that, in either one of the parents producing each of these heterotic hybrids, there may exist a concentration of favorable dominant genes for different characters. In other hybrids like P4 x P5 and P2 x P3 which showed negative heterosis for almost all characters, probably dominance was either lacking or interacted in the unfavorable direction. The appreciable amount of heterosis expressed by a large proportion of hybrids and their over all positive mean heterosis may indicate the presence of partial dominance to over dominant genes and probably some interactions in controlling expression of the characters studied. Kraljevic-Balalic *et al* (8) and Falconer (5) stated that if genes with none additive effects are predominantly involved the heterotic effect is expressed quite strongly and the potentiality of crossing become greatest to produce superior hybrids, supporting the suggestion made above.

The combining ability analysis of variance revealed highly significant GCA and SCA mean squares for all the seven seedling characters (Table 5) indicating that both additive and nonadditive gene actions were involved in controlling inheritance of these characters. This is in agreement with the earlier findings (12,13,21). The ratio of components of GCA to SCA variance further indicated the predominance of nonadditive gene action in all characters suggesting that most probably, hybridization is the proper breeding procedure to improve the characters. Nevertheless, since both additive and nonadditive gene actions were found important, a breeding methodology that can exploit the advantage of both types might be more effective to bring maximum improvement.

Table 5. Mean squares and variance component ratios of GCA and SCA for seven characters of coffee seedlings.

Source of variation	D.F	Mean squares						
		Girth (cm)	Height (cm)	Inter-node length (cm)	shoot fresh wt. (gm)	shoot dry wt. (gm)	Shoot volume (ml)	Leaf area (cm ²)
GCA	5	0.0006**	2.14**	0.06**	0.37**	0.035**	0.41**	5.23**
SCA	9	0.0007**	1.25**	0.06**	0.38**	0.034**	0.41**	3.79**
Error	240	0.0001	0.12	0.01	0.04	0.004	0.04	0.66
Component								
GCA		0.0001	0.5050	0.0125	0.0825	0.0078	0.0925	0.1425
SCA		0.0006	1.1300	0.0500	0.3400	0.0300	0.3700	3.1300
GCA/SCA		0.1667	0.4469	0.2500	0.2426	0.2600	0.2500	0.3650

Estimates of GCA and SCA effects are shown in Table 6. P1 was the best general combiner for all characters while P2 and P4 with negative GCA effects for six and seven of the characters, respectively, were the poorest general combiners. It would seem that P1 has a high concentration of desirable alleles at many loci and appears worthwhile to incorporate in indigenous coffee breeding programme. Infact, the other parents also could be considered when the characters in which they showed good GCA effect are desired for improvement.

Estimates of SCA effects of hybrids revealed similar trend of results with that of mean and heterosis analysis. The heterotic hybrids P1 x P4, P1 x P5, P1 x P6, P2 x P4, P3 x P4 and P5 x P6 exhibited positive SCA effects for all characters, while the hybrids P1 x P2, P1 x P3, P3 x P6, P4 x P5 and P4 x P6 with low or negative heterosis expressed negative SCA effects for all characters. Infact, the hybrids with highest percent heterosis did not prove to show the highest SCA effects. The hybrids that exhibited the highest SCA effects were accordingly P3 x P4 and P5 x P6, which were among the first five top heterotic hybrids for almost all characters. Similarly, Dubay and Lal (3), reported a close association between heterosis and SCA effects in peas. In general, it appeared that selection of cross combinations on the basis of mean performance and heterotic response may be reliable.

In this study, crosses between good general combiners did not prove to produce the best specific effects. The highest specific effects were frequently noted from crosses between average (positive GCA effect) and poor (negative GCA effect) general combiners and some times from crosses between good (higher GCA effect) x poor and poor x poor general combiners. This indicated that, probably the genetic interactions for best crosses for the characters studied are accountable to additive x dominance or dominance x dominance type of gene effects. Similar results have been reported in sunflower (16), rice (17) and linseed (15).

Table 6. Estimates of general combining ability effects (GCAE) of parents and specific combining ability effects (SCAE) of F1 hybrids in coffee seedlings.

Parent and hybrid	Combining ability effects						
	Girth (cm)	Height (cm)	Internode length (cm)	Shoot fresh wt. (gm)	Shoot dry wt. (gm)	Shoot volume (ml)	Leaf area (ml)
GCAE							
<u>Parent</u>							
P1	0.02	0.77	0.17	0.50	0.15	0.52	1.66
P2	0.01	-0.76	-0.16	-0.43	-0.13	-0.47	-1.62
P3	0.00	0.63	0.07	-0.04	0.02	0.06	-0.02
P4	-0.01	-1.02	-0.13	-0.10	-0.04	-0.06	-0.74
P5	-0.01	0.21	0.07	-0.06	-0.01	0.00	-0.07
P6	-0.01	0.17	-0.01	0.13	0.01	-0.04	0.78
S.E ($g_i - g_j$)	0.01	0.24	0.07	0.15	0.05	0.14	0.57
SCAE							
<u>Hybrid</u>							
P1 x P2	-0.03	-0.89	-0.14	-0.54	-0.19	-0.36	-1.94
P1 x P3	-0.01	-0.45	-0.16	-0.41	-0.05	-0.43	-1.24
P1 x P4	0.01	0.53	0.14	0.40	0.11	0.50	0.59
P1 x P5	0.02	0.71	0.14	0.41	0.13	0.20	1.92
P1 x P6	0.01	0.10	0.04	0.13	0.01	0.09	0.67
P2 x P3	0.02	-0.72	-0.16	-0.09	-0.04	-0.06	-0.16
P2 x P4	0.03	0.73	0.24	0.17	0.08	0.01	0.97
P2 x P5	-0.01	0.31	-0.06	0.12	0.02	0.16	0.39
P2 x P6	-0.01	0.56	0.04	0.34	0.12	0.24	0.74
P3 x P4	0.02	1.56	0.24	0.92	0.25	1.00	2.87
P3 x P5	0.00	0.18	0.14	-0.01	-0.01	-0.03	-0.21
P3 x P6	-0.02	-0.57	-0.06	-0.41	-0.15	-0.50	-1.26
P4 x P5	-0.04	-1.97	-0.46	-0.98	-0.30	-1.01	-3.19
P4 x P6	-0.01	-0.85	-0.16	-0.52	-0.14	-0.51	-1.24
P5 x P6	0.03	0.76	0.24	0.45	0.16	0.67	1.09
S.E ($S_{ij} - S_{ik}$)	0.01	0.42	0.12	0.25	0.08	0.24	0.99
S.E ($S_{ij} - S_{kl}$)	0.01	0.35	0.10	0.20	0.06	0.20	0.81

The degree of hybrid heterosis was examined interms of parental diversity (Table 7). Crosses involving parents of the same region and low morphological dissimilarity score exhibited low BP heterosis (-2 to 52% as compared to crosses involving parents of different regions and high morphological differences (-28 to 69%) and for all individual character studied, maximum heterosis was obtained from the later types of crosses. Indications are that, parental diversify with respect to geographical origin and morphological traits of parents may have potential utility to maximize heterosis. It should be, however, noted that crosses between genetically diverse parents did not always result in to good heterotic hybrids.

Results of this study have important implications in coffee breeding programme. In conformity to the previous studies (12,13), the present study showed the presence of appreciable amount of heterosis in crosses among indigenous cultivars. It also suggested the possibility to maximize heterosis by employing parents that originated from contrasting environments and that possess maximum phenotypic differences. The relative amount of additive and nonadditive gene actions recognized for different characters in this study, provided a good deal of information for planning proper coffee breeding programme. Furthermore, since Ethiopia is the centre of genetic diversity, the small group of parents used in this study do not represent all the genetic diversity available in the country. Therefore, more heterotic hybrids and best combining parents for any desirable trait could be obtained by crossing more genetically diverse parents and continued selection and hybridization may be very useful to efficiently utilize the available enormous genetic variability.

Table 7. Expression of heterosis in relation to differences in origin and morphology of parents.

Region	Hybrid Cultivar	Morphological dissimilarity score ⁺	Growth habit	Girth		Height		internode length		Heterosis (%) shoot fresh wt.		Shoot dry wt.		Shoot volume		Leaf area			
				OMP	OBP	OMP	OBP	OMP	OBP	OMP	OBP	OMP	OBP	OMP	OBP	OMP	OBP	OMP	OBP
I x I	P1 x P2	2	C x MC	-1	-2	3	2	6	6	9	1	7	0	9	-1	15	12		
K x K	P3 x P4	5	MO x O	12**	7	24**	6	25**	11	48**	33**	44**	31**	52**	37**	36**	29**		
S x S	P5 x P6	3	MO(O) x VO	11**	10*	18**	14**	24**	17*	39**	36**	39**	37**	40**	35**	32**	28**		
I x K	P1 x P3	7	C x MO	7	5	12**	5	12	6	24	12	23**	22*	24**	11	26**	16		
	P1 x P4	8	C x O	14**	6	25**	14**	33**	25**	65**	64	58**	57**	69**	69**	44**	39**		
	P2 x P3	5	MC x MO	9*	5	-4	-9*	-6	-11	-3	-5	-1	-6	-7	-8	6	-1		
	P2 x P4	8	MC x O	15**	6	11*	0	20*	13	14	4	15	7	2	-7	15	14		
I x S	P1 x P5	8	C x MO(O)	13**	11**	23**	19**	29**	22**	59**	53**	58**	53**	49**	38**	52**	41**		
	P1 x P6	7	C x VO	12**	9*	20**	20**	25**	25**	52**	44**	44**	38**	49**	43**	54**	46**		
	P2 x P5	7	MC x MO(O)	1	-3	5	3	0	-6	9	9	9	5	2	-1	10	4		
	P2 x P6	6	MC x VO	2	-2	10*	9*	6	6	19*	16	19*	17	7	0	23*	20*		
K x S	P3 x P5	3	MO x MO(O)	5	5	9*	5	17	17*	15	8	17	10	12	8	11	11		
	P3 x P6	3	MO x VO	-2	-2	6	-1	6	0	6	2	5	0	-1	-8	13	9		
	P4 x P5	3	O x MO(O)	-7	-11**	-8	-18**	-19*	-28**	-7	-11	-8	-12	-14	-20	-13	-17		
	P4 x P6	4	O x VO	2	-3	6	-4	0	-6	12	5	9	3	6	2	13	11		

** Significant at 0.05 and 0.01 probability levels, respectively.

I = Illubabor, K = Kaffa, S = Sidamo, C = Compact, MC = Medium compact, MO = Medium open, VO = Very open,

MO(O) = Medium open to open

+, Score 0 and 9 when the two parents of a hybrid are similar and dissimilar, respectively.

SUMMARY

Six indigenous coffee (*Coffea arabica* L.) lines viz., 74110 (P1) 74158 (P2), 20071 (P3), 221A71 (P4), 1377 (P5) and 1577 (P6) were crossed in a half-diallel fashion. The F1's and their parents were recorded for seven seedling characters to obtain estimates of heterosis and combining abilities. The F1's exhibited positive over all mean better-parent heterosis for all the characters studied ranging from 3 to 18%. Based on individual hybrids, the magnitude of heterosis ranged from -28% in P4 x P5 for internode length to 69% in P1 x P4 for shoot volume. For all characters studied, the highest better-parent heterosis were observed in certain crosses in which the two parents distinctly differ in their place of origin and morphological characters.

The combining ability analysis revealed that both additive and nonadditive genetic variances were important in controlling inheritance of the characters studied. However, in all characters, the non-additive genetic variances were predominant. These results appeared to suggest that a breeding methodology that can exploit the advantage of both additive and nonadditive genetic effects would be more effective to achieve maximum improvement.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are very grateful to Ato Tafesse Abera, Assistant Research Officer, and Ato Ashenafi Ayano, Ato Tadesse Benti and W/t Fantaye Mekonnen, Technical Assistants, for their heartful assistance during crossing, field management, data collection and summarization.

REFERENCES

1. Bayetta Bellachew and Mesfin Ameha. 1986. Variation among national coffee collections for some agronomic characters. First Ethiopian coffee symposium, Aug. 1986, IAR, Addis Ababa.
2. Carvalho, A. 1988. Principles and practice of coffee plant breeding for productivity and quality factors. pp 129-165. In : R.J. Clorke and R. Macrae (eds) coffee volume 4 : Agronomy. Elsevier applied science publishers, Ltd.
3. Dubey, R.S., and S.Lal. 1983. Combining ability in peas. Indian J. Genet. Pl. Breed., 43 : 314-317.
4. FAO. 1965. FAO Coffee Mission to Ethiopia (1964-65). FAO of the United Nations, Rome. pp 1-200.
5. Falconer, D.S. 1981. Introduction to quantitative genetics. Second edition. Longman group (FE) Ltd., Hong Kong, pp 1-340.
6. Griffing, B. 1956. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. Aust. J. Biol. Sci., 9 : 463-493.
7. Gyawali, K.K., C.O. Qualset, and W.T. Yamazaki. 1968. Estimates of heterosis and combining ability in winter wheat. Crop Sci., 8 : 322-324.
8. Kraljevic-Balalic, M., S.Borejevic and T. Cupino. 1976. Heterosis and combining ability for some yield components in bread wheat crosses. Eucarpia, VIII : 273-282.
9. Krug, C.A., and A. Carvalho. 1952. Coffee breeding. Rep. 13th Int. Hort. Congr., Brussels, pp 2-33.
10. Mathur, P.N., and J.R. Mathur. 1983. Combining ability for yield and its components in pearl millet. Indian J. Genet. Pl. Breed., 43 : 299-303.
11. Mesfin Ameha. 1980. Yield assesement of indigenous coffee collections grown at Jimma Research Station. Eth. J. Agric. Sci., 11 : 69-77.
12. Mesfin Ameha. 1982. Heterosis in crosses of indigenous coffee (*Coffea arabica* L.) selected for yield and resistance to coffee berry disease : I. At first bearing stage. Eth. J. Agric. Sci., IV : 33-43.
13. Mesfin Ameha and Bayetta Bellachew. 1983. Heterosis in crosses of indigenous coffee selected for yield and resistance to coffee berry disease : II. First three years. Eth. J. Agric. Sci., V : 13-21.
14. Moll, R.H., W.S. Salhuona, and H.F. Robinson. 1962. Heterosis and genetic diversity in varital crosses of maize. Crop Sci., 2 : 197-200.
15. Patil, V.D. and P.R. Chopde. 1983. Heterosis in relation to general and specific combining ability effects in linseed. India J. Genet. Pl. Breed., 43 : 226-228.

16. Ranga Rao, V. 1983. combining ability for yield, percent oil, and related components in sunflower. *Indian J. Genet. Pl. Breed* 43 : 68-75.
17. Shrivastava, M.N., and D.V. Seshu. 1983. Combining ability for yield and associated characters in rice. *Crop Sci.*, 28 : 741-744.
18. Singh, R.K., and B.D. Chaudhary. 1985. Biometrical methods in quantitative genetic analysis. Kalyani publishers, New Delhi, pp 1-318.
19. Sinivasan, C.S. and S. Vishveshwara. 1978. Heterosis and stability for yield in arabica coffee. *Indian J. Genet. Pl. Breed.*, 38 : 13-21.
20. Sylvain, P.G. 1958. Ethiopian coffee : its significance to world coffee problems. *Econ. Bot.*, 12 : 111-139.
21. Walyaro, D.J.A. 1983. Considerations in breeding for improved yield and quality in arabica coffee (*Coffea arabica* L.). Doctoral thesis, Wageningen, The Netherlands, pp. 1-119.
22. Watkins, R. 1985. Coffee (*Coffea arabica* L.) genetic resources and breeding (consultant report). Wye College (University of London), pp 1-117.
23. Winder, J.N., and K.L. Lebsack. 1973. Combining ability in durum wheat : I. Agronomic characteristics. *Crop Sci.*, 13 : 164-167.

STRUCTURE GÉNÉTIQUE DES CAFÉIERS AFRICAINS DIPLOÏDES BASÉE SUR LA FERTILITÉ DES HYBRIDES INTERSPÉCIFIQUES

J. LOUARN

ORSTOM, BP 434, Man, Côte-d'Ivoire

INTRODUCTION

Bridson et Verdtcourt (1988) qui viennent de redéfinir le genre *Coffea* récusent la classification de Chevalier (1947), la plus usitée jusqu'à présent. En particulier, ils n'accordent aucune valeur taxinomique pratique aux sous-sections proposées par cet auteur. L'absence de nouvelles propositions souligne la difficulté d'effectuer des regroupements chez les espèces de *Coffea* à partir des seuls caractères botaniques et rend nécessaire le recours à d'autres méthodes pour y parvenir.

Depuis 1975, nous développons en Côte d'Ivoire un programme d'hybridation interspécifique entre caféiers diploïdes africains (Louarn, 1982). Il a été entrepris avec pour double objectif :

- 1) de reconnaître différentes voies d'amélioration de l'espèce cultivée *C. canephora* ;
- 2) d'étudier les niveaux de différenciation entre espèces et d'établir une classification biosystématique de ces caféiers.

Nous venons de terminer une synthèse des travaux réalisés sur ces deux thèmes (Louarn, 1992). Le premier thème a fait l'objet d'une communication au 12^e colloque de l'ASIC (Louarn, 1987). Nous présentons ici les résultats en rapport avec le second : Ils concernent l'étude des hybrides interspécifiques entre douze espèces. Après avoir rapporté les grandes tendances de la réussite des croisements, nous présenterons la fertilité des hybrides F1. Les résultats seront discutés en rapport avec les comportements méiotiques de ces mêmes hybrides et les regroupements des espèces parentes.

MATÉRIEL VÉGÉTAL

1) Les espèces parentes

L'origine des taxons et le nombre de géniteurs intervenant dans le programme d'hybridation sont présentés dans le tableau 1. Il s'agit de :

- cinq espèces d'Afrique occidentale et/ou centrale : *C. canephora* Pierre, *C. congensis* Froehner, *C. humilis* Chev., *C. liberica* Hiern (var. *liberica* et var. *dewevrei* De Wild et Dur. codées respectivement LIB et DEW) et *C. stenophylla* Don ;
- cinq espèces d'Afrique de l'Est : *C. eugenioides* Moore, *C. pseudozanguebariae* Bridson, *C. racemosa* Lour., *C. sessiliflora* Bridson et *C. salvatrix* Swynn. et Phill ;
- une espèce de l'Angola : "*C. kapakata*" Hirshfeld, remplacée par Leroy (1980 a et b) dans le genre *Coffea*, alors que Chevalier (1947) la classait dans le genre monotypique *Psilanthopsis* (Chev.) ;
- un taxon indéterminé d'origine inconnue représenté par un arbre autofertile et sa descendance : ce taxon d'abord rapproché d'un échantillon incomplet de *C. brevipes* var *heterocalyx* Chev. par N. Hallé (in litt., 1976) n'a aucune affinité avec les représentants spontanés de l'espèce *C. brevipes* Hiern introduits du Cameroun. Nous y faisons référence ici sous l'appellation de *C. sp. X*.

Tous les taxons sont diploïdes avec $2n = 22$ chromosomes et, à l'exception de *C. sp. X*, ils sont auto-incompatibles.

Tableau 1 : Origine et diversité des géniteurs utilisés dans les croisements interspécifiques entre caféiers diploïdes africains (il s'agit de matériel d'origine spontanée quand le pays est cité).

Espèces	Code	Variabilité disponible		Nombre de géniteurs utilisés	
		Origines	Nombre de génotypes	Femelle	Mâle
de l'Ouest et du Centre					
<i>C. canephora</i>	CAN	Côte d'Ivoire	330	3	1
		Centrafrique	184	22	11
		Coll-IRCC*	>400	42	30
<i>C. congensis</i>	CON	Centrafrique	430	18	15
<i>C. humilis</i>	HUM	Côte d'Ivoire	354	6	mel*
<i>C. liberica</i>					
- <i>liberica</i>	LIB	Côte d'Ivoire	171	23	10
		Coll-IRCC	>50	30	21
- <i>dewevrei</i>	DEW	Centrafrique	576	46	31
		Coll-IRCC	>10	1	1
<i>C. stenophylla</i>	STE	Côte d'Ivoire	73	3	3
		Coll-IRCC	>10	10	6
de l'Est					
<i>C. eugenioides</i>	EUG	Kenya	996	93	42
<i>C. pseudozanguebariae</i>	PSE	Kenya	88	27	17
<i>C. racemosa</i>	RAC	Coll-IRCC	50	19	6
<i>C. salvatrix</i>	SAL	Coll-IRCC	>40	2	mel
<i>C. sessiliflora</i>	SES	Kenya	12+desc*	14	17
Autres					
<i>C. kapakata</i>	KAP	Coll-IRCC	1	1	1
<i>C. sp. X</i>	SPX	Coll-IRCC	1+desc	8	mel

*Coll-IRCC = collection IRCC ; desc = descendance; mel = mélange

2) Les hybrides F1

Les hybrides F1 sont issus de croisements contrôlés. Un bilan des croisements a été présenté au 10^e Colloque de l'ASIC (Louarn, 1982). Il est actualisé dans l'annexe A. Nous y donnons le nombre de descendance obtenues, le nombre de croisements réalisés et le rendement moyen des croisements en hybrides pour cent fleurs.

Au total 48 combinaisons interspécifiques sur les 66 possibles ont été réalisées entre les douze espèces (55/78 si on distingue les deux taxons de *C. liberica*). Parmi elles 17 (22) sont représentées par les deux sens de croisement. *C. canephora* et *C. congensis* sont hybridées avec tous les autres taxons. Deux espèces de l'Est *C. sessiliflora* et *C. racemosa* n'ont donné de descendances hybrides qu'entre elles ou lorsqu'elles étaient utilisées comme parent femelle avec les autres espèces.

Il n'y a pas d'obstacle majeur à l'obtention d'hybrides, la plupart des combinaisons entre les douze espèces semblent réalisables dans au moins un sens de croisement. Lorsque les combinaisons hybrides étaient peu vigoureuses, le greffage a permis de corriger ce handicap.

FERTILITE DES HYBRIDES F1

1) Viabilité pollinique

La viabilité pollinique est déterminée après coloration des gamétophytes mâles par le carmin acétique. Elle dépasse 80% chez les géniteurs utilisés dans les croisements. Elle est supérieure à 50% dans les descendances intraspécifiques, avec généralement une majorité d'individus au dessus de 80%.

La viabilité pollinique chez les hybrides est très variable entre les combinaisons (tab. 2). Elle va de la quasi stérilité jusqu'à des fertilités analogues à celle des parents. Trois combinaisons sont fertiles à sub-fertiles : *C. canephora* x *C. congensis*, *C. sessiliflora* x *C. racemosa* et *C. pseudozanguebariae* x *C. salvatrix*. Les autres sont moyennement fertiles à l'exemple de LIB x *C. canephora* ou entrent dans la catégorie peu fertile à quasi-stérile (moyennes inférieures à 20%) comme les hybrides *C. racemosa* x *C. canephora*. Quelques exemples de distribution du paramètre sont présentés dans la figure 1. Pour les combinaisons *C. canephora* x *C. congensis* et *C. sessiliflora* x *C. racemosa*, nous n'avons pas tenu compte de certaines descendances qui exprimaient des stérilités partielles liées à des géniteurs particuliers.

2) Fertilité femelle

La fertilité femelle est estimée à partir du coefficient de remplissage des fruits (CREM). CREM est le rapport du nombre de graines au nombre de fruits, il est potentiellement de 2 chez les caféiers fertiles. Ce paramètre synthétique de la fertilité est précisé par deux indices de stérilité : le taux de fruits à une écaille (FECA) et le taux de loges vides (TVID). CREM est le rapport du nombre de graines au nombre de fruits, il est potentiellement de 2 chez les caféiers fertiles. FECA est le rapport du nombre d'écailles au nombre de fruits et TVID le rapport du nombre de loges vides au nombre total de loges. La relation théorique entre CREM et les deux indices de stérilité est : $CREM = (2 - FECA) / (1 - TVID)$. Tous ces paramètres sont estimés après tranchage des fruits immatures (Louarn, 1992). Les valeurs moyennes des paramètres de fertilité femelle sont présentées dans le tableau 3. Pour les espèces les valeurs de CREM vont de 1,3 chez le taxon LIB à 1,8 chez *C. eugenioides*. Elles ne dépassent pas 50% pour FECA. Elles sont inférieures à 8% pour TVID sauf chez LIB où elles atteignent 16%.

Huit combinaisons hybrides ont surtout été étudiées. Elles recouvrent la gamme de viabilité pollinique de niveau suffisant pour permettre une interpollinisation par type d'hybride. Les valeurs moyennes de CREM varient entre combinaisons de 0,8 à 1,6. Elles sont comparables à celles des populations parentales pour les hybrides *C. canephora* x *C. congensis* et *C. sessiliflora* x *C. racemosa* (>1,4). Elles s'en écartent pour les hybrides LIB x DEW entre les deux taxons de *C. liberica* (1,2) et ce malgré de faibles proportions de loges vides. Chez les autres combinaisons, à l'exemple des hybrides LIB x *C. canephora*, on observe de l'ordre d'une graine par fruit en moyenne (CREM<1,05) du fait de valeurs élevées pour FECA (70% à 91%) et TVID (18% à 27%). Les hybrides *C. pseudozanguebariae* x DEW et LIB x *C. stenophylla* sont ici les moins fertiles (CREM<0,9).

Toutes les combinaisons étant considérées, les niveaux de viabilité pollinique sont dans l'ensemble confirmés par les niveaux de fructification. Seuls les hybrides *C. eugenioides* x *C. kapakata* qui ne fructifient pratiquement pas malgré des viabilités polliniques en moyenne de 35% s'écartent de ce schéma.

Tableau 2 : Viabilités polliniques moyennes des combinaisons hybrides F1

Hybrides	Nb. de pieds	VP		Hybrides	Nb. de pieds	VP		Hybrides	Nb. de pieds	VP	
		m	s			m	s			m	s
Afr. O et C				(O et C) x E				Autres			
CAN x CON	117	80	17	SES x CAN	17	10	7	CAN x KAP	8	53	7
LIB x CON	172	68	16	SES x CON	2	11	-	KAP x DEW	1	30	-
CON x DEW	35	60	13	SES x DEW	4	18	13	EUG x KAP	39	29	11
LIB x CAN	146	53	15	SES x STE	1	10	-	SES x KAP	15	8	7
CAN x DEW	43	45	17	RAC x CAN	33	<5	-	PSE x KAP	4	14	6
LIB x DEW	33	44	20	RAC x CON	3	12	-	KAP x SAL	20	(2)	
STE x DEW	33	42	15	RAC x DEW	2	16	-	CAN x SPX	12	8	7
LIB x STE	44	40	21	PSE x CAN	5	11	8	EUG x SPX	23	19	9
HUM x LIB	7	51	15	PSE x CON	2	8	-				
HUM x STE	12	37	10	PSE x DEW	61	18	10				
STE x CAN	4	38	15	PSE x LIB	1	28	-				
HUM x CAN	1	32	-	CAN x SAL	10	(1)					
Afr. E				EUG x CAN	96	12	9				
SES x RAC	67	75	11	EUG x CON	54	15	10				
PSE x SAL	71	72	9	EUG x DEW	35	<9	-				
SES x PSE	35	56	8	EUG x LIB	25	<5	-				
RAC x PSE	18	32	12	EUG x STE	15	<5	-				
SES x EUG	19	19	7								
PSE x EUG	13	16	8								
EUG x SAL	4	14	6								

VP = viabilité pollinique ; nb = nombre ; m = moyenne ; s = écart type.

Afr. O et C = Afrique de l'Ouest et du Centre ; Afr. E = Afrique de l'Est

(1) pas de pollen ; (2) pas de fleurs

Tableau 3 : Variation des paramètres de fertilité femelle chez les espèces et les hybrides.

Matériel végétal	Nb de pieds	CREM		FECA %		TVID %	
		m	s	m	s	m	s
Taxons							
<i>C. canephora</i>	99	1,40	0,20	48	20	7,9	4,2
<i>C. congensis</i>	74	1,57	0,14	37	15	3,8	2,2
<i>C. eugenioides</i>	149	1,76	0,11	18	9	3,1	2,4
DEW	53	1,50	0,17	42	16	5,4	4,0
LIB	33	1,26	0,18	50	16	16,0	6,8
Hybrides							
CAN x CON	1170	1,56	0,18	32	16	7,4	5,9
SES x RAC	80	1,39	0,14	58	13	2,4	2,2
LIB x DEW	36	1,21	0,13	73	13	4,7	2,5
LIB x CAN	475	1,05	0,17	71	12	18,3	10,5
CON x DEW	50	1,05	0,16	71	12	18,6	7,2
LIB x CON	83	0,99	0,12	77	11	19,8	8,6
PSE x DEW	38	0,89	0,08	91	5	18,4	6,0
LIB x STE	181	0,86	0,15	82	8	27,5	11,4

CREM : coefficient de remplissage des fruits

FECA : taux de fruits ayant une écaille

TVID : taux de loges vides

m et s : moyenne et écart type

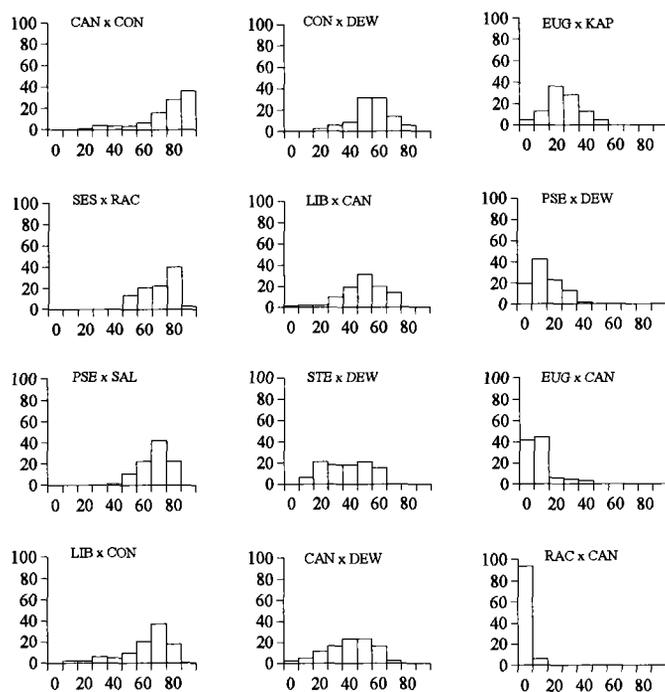


Figure 1 : Distribution des viabilités polliniques chez les combinaisons hybrides

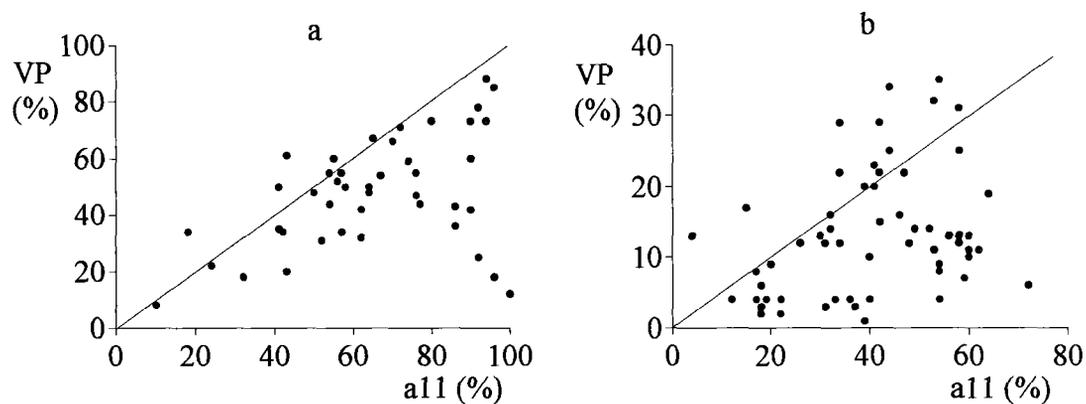


Figure 2 : Relations entre la viabilité pollinique (VP) et les montées de onze chromosomes en anaphase 1 (a11) chez les hybrides entre : a) les espèces de l'Ouest et du Centre (courbe théorique $y=x$) ; b) ces espèces et celles de l'Est y compris *C. eugenoides* (courbe théorique $y=0,5x$).

RELATIONS ENTRE LA VIABILITE POLLINIQUE ET LE COMPORTEMENT MEIOTIQUE

Les relations entre la viabilité pollinique et la régularité méiotique ont été observées dans 22 combinaisons interspécifiques. Elles ont surtout été étudiées chez les hybrides entre espèces de l'Ouest et du Centre, et ceux entre les espèces de l'Est (y compris *C. eugenioides*) et les autres caféiers. La régularité méiotique est estimée en anaphase 1 par les montées de onze chromosomes aux pôles des cellules mères du pollen.

Chez les hybrides entre espèces de l'Ouest et du Centre, la viabilité pollinique est le plus souvent liée à la régularité méiotique (fig. 2a). La situation est différente chez les hybrides entre les espèces de l'Est et les autres caféiers : à leur niveau la viabilité pollinique est généralement au moins inférieure de moitié par rapport à la régularité en anaphase 1 (fig. 2b). Dans ce dernier cas, les résultats suggèrent des différences de structure entre les génomes rapprochés. La présence de nombreux gamètes non réduits ou une intense récupération des chromosomes traînants observée en anaphase 2 permettent d'expliquer les quelques écarts à ce schéma.

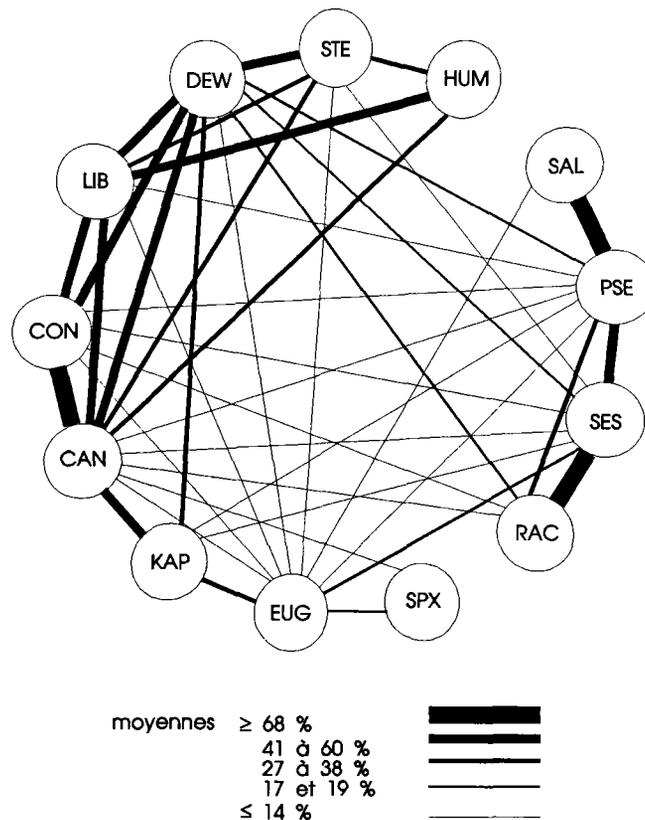


Figure 3 : Viabilité pollinique des hybrides F1 entre caféiers diploïdes africains.

DISCUSSION-CONCLUSION

En dehors des résultats d'hybridation entre neuf espèces (Carvalho et Monaco, 1968), les informations sur les hybrides interspécifiques entre caféiers diploïdes africains se limitaient jusqu'à présent au comportement cytogénétique de quelques combinaisons impliquant généralement *C. canephora* (Sybenga, 1960 et Charrier, 1978 pour une revue ; Louarn, 1987).

La synthèse de nos résultats rassemblés ici sur la fertilité des hybrides interspécifiques entre caféiers africains diploïdes permet de proposer des regroupements entre les espèces parentes. Ces regroupements sont effectués sur la base de viabilités polliniques moyennes relevant du niveau peu fertile à quasi stérile pour les combinaisons hybrides intergroupes. Trois groupes principaux en rapport avec l'origine géographique des espèces sont mis en évidence (fig. 3) :

- le groupe de l'Ouest constitué par les cinq espèces d'Afrique occidentale et centrale : *C. canephora*, *C. congensis*, *C. liberica* (taxons LIB et DEW), *C. humilis* et *C. stenophylla* ;
- le groupe du Centre-Est constitué par l'espèce d'altitude *C. eugenoides*, spontanée sur la dorsale est-africaine ;
- le groupe de l'Est et du Sud-Est constitué par les espèces de basse et moyenne altitude de la façade est-africaine : *C. sessiliflora*, *C. racemosa*, *C. pseudozanguebariae* et *C. salvatrix*.

C. kapakata originaire de l'Angola montre des affinités avec le groupe de l'Ouest en particulier avec *C. canephora*. Le taxon non identifié d'origine inconnue *C. sp. X* qui n'a été étudié qu'au travers des combinaisons avec *C. canephora* et *C. eugenoides* n'est pas encore clairement positionné.

Les différences de structure génomique mises en évidence entre les caféiers de l'Ouest et les deux groupes de l'Est confortent ces regroupements. L'étude méiotiques des hybrides entre *C. eugenoides* et les autres caféiers de l'Est est à effectuer pour rechercher une éventuelle différence de structure entre ces deux ensembles.

Dans le groupe de l'Ouest, le haut niveau de fertilité des hybrides F1 *C. canephora* x *C. congensis* suggère une très grande affinité entre les parents. Les deux taxons sont proches au plan morphologique, ils pourraient n'exprimer que des différences écotypiques. La confirmation des résultats sur la fertilité dans les générations ultérieures, en particulier au niveau des hybrides F2, permettrait d'envisager leur regroupement sous un même nom d'espèce. Par comparaison, les autres hybrides intra-groupe de l'Ouest montrent globalement un comportement homogène caractérisé par des niveaux plutôt moyens de régularité méiotique et de fertilité. En marge des relations interspécifiques dans ce groupe nous relèverons le mauvais comportement d'ensemble des hybrides intraspécifiques entre les deux taxons de *C. liberica* (*var. liberica* et *var. dewevrei*). Difficiles à réaliser en particulier quand DEW est le parent femelle, ils montrent un niveau de fertilité très moyen. Ceci soulève le problème de ces deux taxons considérés comme des espèces par (Chevalier, 1947) et regroupés sous un seul binôme par Bridson (1985).

Dans le groupe de l'Est et du Sud-Est, deux combinaisons hybrides à fertilité élevée, *C. sessiliflora* x *C. racemosa* et *C. pseudozanguebariae* x *C. salvatrix*, préfigurent deux pôles de regroupement. A ces deux sous-groupes d'affinité sont attachées des caractéristiques phéno-physiologiques distinctes. *C. sessiliflora* et *C. racemosa* sont caractérisés par la précocité des floraisons (sixième jour après le déclenchement), la rapidité de maturation des fruits (de l'ordre de deux mois) et des teneurs relativement élevées en caféine (respectivement 0,6% et 1% de la matière sèche). Chez *C. pseudozanguebariae* et *C. salvatrix*, les floraisons sont plus tardives (huitième jour), les délais de fructification plus longs (3 et 6 mois) et les teneurs en caféine très faibles à faibles (0,02% et 0,2%). Sur la base des relations entre *C. pseudozanguebariae* et les espèces à maturation rapide, les deux sous-groupes se distinguent par la réussite des croisements dans un seul sens et le niveau de fertilité moyen à faible des hybrides F1. La nature de la différenciation entre les deux sous-groupes reste à préciser.

C. eugenoides assimilée ici à un groupe pose un problème en soi. A Madagascar, les hybrides d'une origine imprécise de cette espèce avec *C. canephora* et *C. liberica* (Louarn, 1976 et non publié) avaient des comportements très différents de ceux relevés ici. Ils étaient moyennement fertiles et n'exprimaient pas de différences de structure entre génomes, ce qui conduisait à rattacher cette population au groupe de l'Ouest. Les résultats obtenus avec le matériel végétal *C. eugenoides* provenant du Kenya nous ont conduits à émettre l'hypothèse d'une différenciation intraspécifique chez cette espèce (Louarn, 1992).

En définitive nos résultats sur la fertilité des hybrides interspécifiques de première génération vont dans le sens d'une structure en deux groupes principaux pour les douze espèces de caféiers africains diploïdes étudiées ici. Ils s'accordent avec les grandes lignes de la classification de 1942 proposée par Chevalier (1942) qui prenait en compte la distribution géographique des espèces : les caféiers africains y sont scindés en deux sections *Eucoffea* et *Mozambicoffea*. Les *Eucoffea* correspondent ici au groupe de l'Ouest, les *Mozambicoffea* au groupe de l'Est et du Sud-Est. Cette classification s'oppose à celle proposée en 1940 par ce même auteur (Chevalier, 1940 et 1947) qui

regroupait les caféiers africains en une seule section, *Eucoffea*, et cinq sous-sections (dont les *Mozambicoffea*) toutes représentées dans notre étude. Chevalier (1947) était indécis quant à la position de *C. eugenioides* qu'il avait d'abord rattaché aux *Mozambicoffea*, cette espèce étant généralement considérée comme plus proche de *C. canephora* et *C. congensis* (Lebrun, 1941 ; Bridson, 1982). Nos analyses confirment ces ambiguïtés pour *C. eugenioides* et soulignent son originalité.

Globalement, parmi les caractéristiques biologiques discriminantes directement appréciables entre les *Eucoffea* et les *Mozambicoffea*, celles liées à la phénologie de la reproduction semblent fondamentales : les délais de maturation des fruits sont beaucoup plus courts chez les *Mozambicoffea* (2 à 7 mois contre 8 à 14). Notons que Cros et al. (1993) distinguent les deux groupes sur la base des quantités d'ADN nucléaire : la taille du génome est plus petite chez les espèces ayant les plus courts délais de maturation des fruits.

Berthaud (1986) arrive aussi à l'hypothèse de deux groupes en s'appuyant sur des considérations biogéographiques. Avec Anthony (1992), ils associent la répartition de la diversité actuelle des caféiers africains aux régions phytogéographiques (White, 1979), région guinéo-congolaise et façade orientale, et à l'existence de refuges forestiers ayant échappé aux régressions de la forêt au quaternaire récent (Maley, 1987).

Les travaux que nous venons de présenter reposent sur la diversité récoltée dans la zone littorale orientale, la région guinéenne, la région congolaise et l'est de la cuvette zaïroise. Des prospections récentes effectuées par l'ORSTOM au Cameroun et au Congo ont permis de collecter des caféiers relevant d'un autre centre de diversité centré sur le Gabon (Anthony et al., 1985 ; de Namur et al., 1987). En dehors des espèces étudiées ici et de *C. brevipes* retrouvé au Cameroun, huit nouvelles formes non identifiées et de rang spécifique ont été introduites en collection en Côte d'Ivoire. L'évaluation en cours de ces matériels montre leurs particularités à l'exemple de la forme autofertile *C. sp.* originaire de "Moloundou" (Anthony, 1992). Ces nouveaux caféiers pourraient représenter une ligne de différenciation originale par rapport au groupe de l'Ouest. L'étude des premiers hybrides interspécifiques où ils interviennent est en cours.

Références Bibliographiques

- ANTHONY F., 1992. Les ressources génétiques des caféiers. Collecte, gestion d'un conservatoire et évaluation de la diversité génétique. Travaux et Documents de l'ORSTOM, 81, 320p..
- ANTHONY F., COUTURON E., NAMUR C. de , 1985. Les caféiers sauvages du Cameroun : résultats d'une mission de prospection effectuée par l'ORSTOM en 1983. 11ème Colloque de l'A.S.I.C., Lomé (Togo), 495-505.
- BERTHAUD J., 1986. Les ressources génétiques pour l'amélioration des caféiers africains diploïdes : évaluation de la richesse génétique des populations sylvestres et de ses mécanismes organisateurs. Conséquences pour l'application. Travaux et Documents de l'ORSTOM, 188, 372 p..
- BRIDSON D., 1982. Studies in *Coffea* and *Psilanthus* (*Rubiaceae* subfam. *Cinchonoideae*) for part 2 of Flora of Tropical East Africa : *Rubiaceae*. Kew Bulletin, 36, 817-859.
- BRIDSON D., 1985. The lectotypification of *Coffea liberica* (*Rubiaceae*). Kew Bulletin, 40, 805-807.
- BRIDSON D., VERDCOURT B., 1988. *Coffea*. in Flora of Tropical East Africa. Rubiaceae (Part 2), R. M. Polhill ed., A. A. Balkema (Rotterdam), 703-723.
- CARVALHO A., MONACO L. C., 1968. Relations génétiques de espèces seleccionadas de *Coffea*. Cafe, 4, 3-19.
- CHARRIER A., 1978. La structure génétique des caféiers spontanés de la région malgache (*Mascarocoffea*). Leurs relations avec les caféiers d'origine africaine (*Eucoffea*). Mémoires ORSTOM, 87, 223 p..
- CHEVALIER A., 1940. Nouveau groupement des espèces du genre *Coffea* et spécialement de celles de la section *Eucoffea*. Rev. Bot. Appl., 18, 827.
- CHEVALIER A., 1942. Les caféiers du globe. II) Iconographie des caféiers sauvages et cultivés, et des Rubiacées prises pour des caféiers. in Encyclopédie biologique, P. Lechevalier ed. (Paris), 36 p., 158 pl..
- CHEVALIER A., 1947. Les caféiers du globe. III) Systématique des caféiers et faux caféiers. Maladies et insectes nuisibles. in Encyclopédie biologique, 28, Fas. III, P. Lechevalier ed. (Paris), 356 p..
- CROS J., GAVALDA M. C., CHABRILLANGE N., RECALT C., DUPERRAY C., HAMON S., 1993. Variations of the total nuclear DNA content within african *Coffea* species (*Rubiaceae*). Communication au XV^e congrès de l'ASIC, Montpellier (France).

- LEBRUN J., 1941. Recherches morphologiques et systématiques sur les caféiers du Congo. Publ. I.N.E.A.C., Hors Série, 184 p..
- LEROY J. F., 1980a. Evolution et taxogenèse chez les caféiers. Hypothèse sur leur origine. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences (Paris), 291, 593-596.
- LEROY J. F., 1980b. Les grandes lignées de caféiers. 9ème Colloque de l'A.S.I.C., Londres (Grande Bretagne), 473-477.
- LOUARN J., 1976. Hybrides interspécifiques entre *Coffea canephora* Pierre et *C. eugenioides* Moore. Café-Cacao-Thé, XX, 33-52.
- LOUARN J., 1982. Bilan des hybridations interspécifiques entre caféiers africains diploïdes en collection en Côte d'Ivoire. 10ème Colloque de l'A.S.I.C., Salvador de Bahia (Brésil), 375-383.
- LOUARN J., 1987. Possibilités d'amélioration de l'espèce cultivée *Coffea canephora* Pierre par hybridation interspécifique avec les caféiers africains diploïdes : données cytogénétiques sur les hybrides F1. 12ème Colloque de l'A.S.I.C., Montreux (Suisse), 441-452.
- LOUARN J., 1992. La fertilité des hybrides interspécifiques et les relations génomiques entre caféiers diploïdes d'origine africaine (Genre *Coffea* L. sous-genre *Coffea*). Thèse d'Etat, Paris XI (Orsay), 200 p..
- MALEY J., 1987. Fragmentation de la forêt dense humide africaine et extension des biotopes montagnards au quaternaire récent : nouvelles données polliniques et chronologiques. Implications paléoclimatiques et biogéographiques. in Palaeoecology of Africa and surrounding islands, 18, J. A. Coetzee ed., A. A. Balkema (Rotterdam), 307-334.
- NAMUR C. de, COUTURON E., SITA P., ANTHONY F., 1987. Résultats d'une mission de prospection des caféiers sauvages du Congo. 12ème Colloque de l'A.S.I.C., Montreux (Suisse), 397-404.
- SYBENGA J., 1960. Genetics and cytology of coffee. A literature review. Bibliographia Genetica, 19, 217-316.
- WHITE F., 1979. The guineo-congolian region and its relationships to other phytochoria. Bull. Jard. bot. nat. Belg., 49, 11-55.

Résumé

48 combinaisons interspécifiques entre douze espèces de caféiers diploïdes africains ($2n = 22$ chromosomes) ont été réalisées. La fertilité des hybrides F1 est très variable entre les combinaisons : elle va de la quasi stérilité jusqu'à des fertilités analogues à celles des parents. Sur la base de viabilités polliniques faibles chez les hybrides intergroupes, trois groupes d'espèces recouvrant les distributions géographiques sont mis en évidence : le groupe Ouest (Afrique occidentale, centrale et Angola) ; le groupe du Centre Est constitué par *C. eugenioides* (dorsale est-africaine) ; le groupe de l'Est et du Sud-Est (façade est-africaine). La différenciation entre le groupe Ouest et les deux autres groupes fait intervenir des différences de structure entre génomes. Nos résultats rejoignent les grandes lignes de la classification de Chevalier (1942) qui partageait les caféiers africains en deux sections : *Eucoffea* et *Mozambicoffea*. Ils montrent l'originalité de *C. eugenioides*, espèce que cet auteur avait du mal à situer et dont la position reste à préciser. Parmi les caractéristiques biologiques discriminantes de ces deux grands groupes de caféiers, celles liées à la phénologie de la reproduction semblent fondamentales : les délais de maturation des fruits sont beaucoup plus courts chez les *Mozambicoffea*.

Abstract

48 interspecific combinations between twelve african diploid coffee species ($2n = 22$ chromosomes) were obtained. Between combinations, all situations are observed from near sterility to similar species fertility. Three species groups, in relation with geographical distributions, are brought to the fore on the basis of poor pollen stainability in intergroup hybrids : Western group (West and Central Africa, Angola), Central-eastern group constituted by *C. eugenioides* (east-african dorsal) and Eastern and South-eastern group (east-african lowlands). Differentiation between Western group and two other groups include structural hybridity. Biosystematic classification which can be deduced from is closely akin to Chevalier's botanical classification (1942) where african diploid species were divided in two sections : *Eucoffea* and *Mozambicoffea*. Our results show originality of *C. eugenioides* classed with difficulty by this author. Among discriminant biological characteristics between two sections, reproduction phenology seems fundamental : fruit maturation delays are shorter in *Mozambicoffea*.

Annexe A : Réussite des croisements entre les douze espèces de caféiers africains diploïdes en distinguant les deux taxons de *C. liberica* (nombre de descendances obtenues / nombre de croisements réalisés ; rendement moyen en hybrides pour 100 fleurs).

mâl. fem.	Taxons de l'Ouest et du Centre										Taxons de l'Est						Autres	
	CAN	CON	HUM	LIB	DEW	STE	EUG	PSE	RAC	SAL	SES	KAP	SPX					
CAN	-	112/132 27,5 (a)	0/10	12/49	18/45	2/27	13/65	2/8	0/10	2/3	0/12	2/5	5/14					
CON	12/17 19,0 (a)	-	1/4 1,0	2/5 5,8	17/22 12,2	3/13 0,6	9/20 1,6		0/4	1/2 1,3	0/4	0/2	2/7 1,4					
HUM	3/5 1,9		-	3/3 1,9	1/3 0,6	1/1 25,2												
LIB	81/131 8,2	21/40 5,2	0/10	-	(3/11) 7,7	14/31 11,1	12/21 10,2		0/2				0/14					
DEW	9/177 0,05	4/52 0,13	0/7	(6/9) 3,7	-	13/20 2,9	14/41 0,6	0/3	0/7		0/2		0/9					
STE	2/25 0,09	1/7 0,16		13/21 7,9	4/5 1,6	-			0/4	0/1			0/3					
EUG	59/126 0,8	28/68 1,4		2/2 6,1	47/49 13,4	15/19 9,6	-	8/8 7,9	0/4	3/3 6,1	0/10	7/7 25,1	8/8 25,8					
PSE	7/15 0,9	2/14 0,3		1/2 0,6	5/5 18,8	2/9 1,3	6/9 4,3	-	0/4	5/5 30,0	0/33 (b)	3/5 5,3	0/2					
RAC	5/12 0,7	2/3 0,7		0/8	1/21 0,01	0/1	0/17 0,1	5/10 2,7	-	0/1	7/8 9,8	0/1						
SAL	0/1				0/1		0/1			-								
SES	5/5 5,8	13/26 5,3	1/4 0,8	1/3 0,5	5/13 0,8	2/14 0,07	3/3 11,7	8/20 1,1 (b)	2/2 87,2	0/3	-	1/4 9,2	1/3 1,3					
KAP	1/6 0,6	3/3 8,6			0/3 (*)	0/2	5/5 26,2	0/1 (**)		2/2 7,1		-	1/1 18					
SPX	0/2	2/2 0,9		0/2	0/1		3/3 11,7			1/1 26,2		1/1 6,6	-					

mâl. = parent mâle ; fem. = parent femelle

(a) Berthaud, communication personnelle ; (b) Anthony, 1992 ; (*) des hybrides ont été obtenus après pollinisation extensive.

(**) des hybrides ont été trouvés dans des semis.

BREEDING EFFORTS TO IMPROVE COFFEE PRODUCTION IN GHANA

Y. ADU-AMPOMAH, B.Sc. (Ghana), Ph. D (Hull), V. A. MARTINSON, E. DASI, R. S. AMONOO

Cocoa Research Institute of Ghana, P.O. Box 8, Tafo-Akim, Ghana

INTRODUCTION

About three quarters of coffee produced in Africa is the diploid coffee canephora var robusta. Ghana's coffee is as in the rest of West Africa, predominantly of the robusta variety originating from various parts of East and West Africa. Even though this does not compare favourably with the allotetraploid c. arabica in terms of flavour and caffeine content, it is vigorous, better adapted to our lower altitudes, more resistant to diseases (especially Hemileia Vastatrix) and requires less care (Krug and Poerk, 1968). Thus, our approach is that, to boost Ghana's coffee production, farmers should be encouraged to cultivate robusta coffee. However, the yields of robusta coffee varieties currently being cultivated in the country are very low. The highest recorded yield of local robusta up to 1975 was 2000kg/ha (Ampofo et al 1975) and this was even under experimental conditions. This low yields could be due to unsatisfactory management; but it seems that as has been observed in other countries, the planting material needs marked improvement.

Our breeding programme is aimed at producing high yielding robusta coffee adaptable to our local environment. This is the only way to achieve our projected targets short of subjecting large expanse of our land to the cultivation of the existing poor yielding robusta in the country. Another objective is also to improve the cup-quality of our coffee by developing arabica type coffee which is also adapted to our environment.

This paper therefore reports on recent breeding attempts being made at CRIG to develop improved coffee for local farmers. The programme is in two phases running concurrently. The first is development of improved robusta and the second is development of interspecies hybrids to be used either as varieties in themselves or as parents in further breeding programmes.

MATERIALS AND METHODS

Robusta

Introductions (Museum plot)

Five sets of F1 seeds from selected robusta parents were introduced from the Ivory Coast to Ghana in 1977. These were coded A to E and planted at Afosu sub-station in a randomised complete block design, in 1978. Two local robusta F and G were also included. These were assessed for their suitability to local conditions by looking at early bearing, yield and tolerance to drought. The plants reaction to drought was assessed only in 1983 when there was severe drought leading to leaf scorching, defoliation and drastic reduction in yield. The plant response to drought during this season was scored on a scale of zero to five. Zero to one indicated high resistance, two to three moderate resistance and four to five severely affected by drought.

Further selection for robusta

Selections from individual trees in the museum plot of introduced robusta were planted out in two trials in 1983 and 1984 and designated clonal trials 1 and 2 respectively. The aim was to identify individual plants with good performance.

Clonal Trial I

Selections were based on initial vegetative growth of selected seedling plants from the introduced and local erect robusta (A-F). The selected plants were multiplied clonally and selections from each introduction were bulked together so that there were six types representing A to F. These were planted in a randomised complete block design experiment comprising six replications, with each treatment comprising 30 plants. These were assessed for early bearing and yield.

Clonal Trial II

Clones from this trial were selected from mother plants of the introduced robusta on the basis of early growth and five years yield. Selections from an erect local robusta (F) was also included as a check. Unlike the clonal trial I, clones from each selected seedling plant was taken as a variety. This trial was laid out with 15-tree plots each surrounded with a single row of guard and in four replications using randomised complete block design.

Coffee progeny trial

Individual trees that combined easiness of establishment with high yields from clonal trial II were crossed in all possible combinations and also crossed onto two local robusta. The progenies are being assessed in two progeny trials. The characters being assessed are growth, yield components and yield.

DEVELOPMENT OF INTERSPECIES HYBRIDS

Induction of tetraploid robusta

Axillary buds of six-month old seedlings and terminal buds of four-leaved seedlings were treated with 1.0% colchicine in 10% glycerin. The buds were covered with pieces of cotton wool which were moistened twice daily for three consecutive days.

Identification of polyploids was made from leaf characters as described by Capot *et al* (1968). Those selected had darker, thicker leaves with L/B ratios ranging from 1.43 to 1.94 in the treated areas. Cuttings were subsequently collected from the affected shoots and propagated. Controlled pollinations on those propagated showed that they were self-incompatible as observed by Vander Vossen and Owuor (1981). Fertility in general was low and the incidence of pea berry high.

Arabica parent

The Arabica at CRIG, listed as Arabica 1 to 6, were received from the Ivory Coast in 1978 with the following descriptions: Arabica

1. Caturary rogo of Brazilian origin
2. Mixed seed of C. Arabica from Ethiopia
3. Yellow C. Arabica var Amorelo
4. Caturra amovelo from Brazil
5. C. Arabica, typica from San Berna
6. C. Arabica, Mundo Novo 379/19 (Brazil).

Interspecies Crosses

The initial problem with the hybridization work at CRIG was the non-synchronisation of flowering. However, successful crosses were made between six fertile tetraploid robusta plants and Arabica 2, 3 and 5. Percentage sets recorded thirty days after pollination was between 18.52 to 66.67. In earlier crosses the arabica was used as the female parents, since as in allo-tetraploid, it was more likely to have regular meiotic divisions and to produce fertile ovules for seed formation than the auto-tetraploid robusta. However, subsequent crosses involved the use of the tetraploid robusta as the female parent. The argument in favour of using the tetraploid robusta as female was that, being self-incompatible, it was less likely to produce self seed accidentally. The hybrids were planted in a nursery and hybrids were selected visually from leaf characters.

A comparison of the arabica parents, the arabusta (F1) and second generation progenies (F2) derived from open pollinations of the arabusta were made by planting those in the field using a randomised complete block design of four replications and 30 tree plots. A comparison of backcrosses, arabusta and the arabica parents in terms of growth were also made.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Table 1 is the data on the variation in growth, yield and drought resistance in the introduced and local robusta. In all the characters assessed there are wide variations within and among the populations and this is quite discernible in the yield of fresh berry per tree. This is not unexpected as seedling plants were used for the trial. However, the significant observation is that in almost all the characters assessed the introduced plants are more superior than the local selection except in the response to drought (Table II) where the two local selections (F and G) are comparable to the two best introduced selections (D and E). This data thus highlight the poor nature of our local robusta in terms of vigour and yield and the need to improve upon it.

In the first clonal trial, Table III indicates that the selections from A and E clearly exhibit early beariness than those from B, C and D whilst again those from the local selection (F) are late in bearing. Though variation in

yield was observed within and between groups the minimum yield per tree and the yield per hectare were markedly improved in this trial than the introduced trial. The selection of high yielding trees and bulking them together appear to be the reason for this improvement.

In the second clonal trial clones from tree numbers A129, B191, E152, E138 and E139 recorded the highest yields and these were also easy to establish as shown by the girth measurements (Table IV). As an interim measure, these have been multiplied and bulked together for supply to farmers for planting. Preliminary yield estimates from field trials for 3 years indicate that at a planting population of 1280 trees/ha, 3 tons/ha of robusta coffee could be obtained from this variety. This is a significant improvement over our local planting material which gives around 0.8 tons/ha under similar conditions. In the mean time these selected trees have been crossed in all possible combinations and also crossed to few local selections and planted as first and second progeny trials. The aim is to take advantage of the hybrid vigour that might result and also broaden the genetic base.

Results from crossing the selected clones in all possible combinations (Table V) indicate that all the clones are self-incompatible as would be expected in robusta. Clones from A, B and E are all cross compatible but all the selected clones from E (ie. E152, E138 and E139) are all cross-incompatible. Thus, in bulking the clones for farmers, it is being recommended that clones A129, B191 and one of the selected E clones should be bulked together at a time.

TABLE V

DIALLELE CROSS OF SELECTED CLONES

	A 129	B 191	E 152	E 138	E 139
A 129	0	X	X	X	X
B 191	X	0	X	X	X
E 152	X	X	0	0	0
E 138	X	X	0	0	0
E 139	X	X	0	0	0

0 = Incompatible cross

X = Compatible cross

INTERSPECIES HYBRIDIZATION PROGRAMME

Table VI compares the arabica parents, the interspecies hybrids (F1) and open pollinated interspecies hybrid progenies (F2) in terms of vigour, fruit set and pea berry produced. The F1 hybrids appear more vigorous with higher yielding potential than the parent arabica as shown by the growth parameters and the number of flowers per node. These could be due to heterosis. However, the high yielding potential in the F1 hybrids could hardly be attained in view of their very low fruit set and high pea berry production. It was hoped that these characters could be improved in the open pollinated F2 progenies but no significant improvement were achieved as

could be observed from the results. The percentage berry set in the cross where the female parent was Arabica is however higher in both the F1 hybridss and F2 progenies than where the induced tetraploid robusta was the female. This is likely to be due to a more regular meiotic divisions in the allo-tetraploid than the auto-tetraploid. Nevertheless, a wide range of recombinations with varying degrees of Arabica and Robusta characters have been observed in both the F1 hybrids and the open pollinated F2 progenies. Initial growth data (Table VII) on backcrosses show relatively higher growth rate in the backcrosses than either their arabica parents or the arabusta progenies. If this is a reflection on yield (Carvalho *et al.*, 1961; Dhaliwal, 1965; Fernie, 1965) then a significant improvement would have been attained.

TABLE I
VARIATION IN GROWTH AND YIELD IN
INTRODUCED AND LOCAL ROBUSTA

Introduction code	Origin	Span of		Fresh berry kg/ tree	Yield based on 5yrs. data	
		Girth of stem (cm) at 3yrs.	laterals (cm) at 3yrs.		Yield kg/ha.	100-bean wt. (g)
A	Ivory Coast	23	86	0.83-31.4	2662	13.9
B	"	23	80	0.7-29.5	2956	14.3
C	"	18	69	1.6-16.6	1983	12.0
D	"	20	77	0.5-23.5	2608	15.2
E	"	24	88	0.4-29.5	3526	15.8
F	Ghana	16	61	0.8-6.1	1132	11.8
G	"	16	65	0.3-10.9	1111	11.6

TABLE II
RANKING OF INTRODUCED AND LOCAL
ROBUSTA FOR RESISTANCE TO DROUGHT

Introduction code	% of plants in each rank		
	0 - 1 (resistant)	2 - 3 (moderately resistant)	4 - 5 (Severely affected)
A	13.6	61.0	25.4
B	12.1	70.7	17.2
C	38.2	47.3	14.5
D	18.2	74.6	7.2
E	30.2	66.1	3.5
F	48.9	45.1	5.0
G	44.7	48.2	7.1

TABLE III

GROWTH AND YIELD DATA FOR THE
LEFT CLONAL TRIAL

Source of selection	Girth of stem at 2 yrs. (cm)	% bearing after 2 years	Yield based on 5 yrs. data	
			Fresh berry kg/tree range	Yield kg/ha.
A	24	81	6.6-33.1	2920
B	22	69	10.2-31.7	2960
C	19	44	8.0-20.1	2200
D	20	50	5.1-21.8	3100
E	22	86	12.8-32.4	3770
F	15	26	3.1-12.8	1340

TABLE IV

GROWTH AND YIELD DATA FOR
THE RIGHT CLONAL TRIAL

Source of selection	Selected tree No.	Girth of stem at 2 yrs. (cm)	Yield based on 5 yrs. data	
			Fresh berry kg/tree range	Yield kg/ha.
A	120	26	16-27.7	3320
	101	21	8.2-17.1	2400
	115	18	7.1-10.7	2420
B	191	18	12.9-30.6	2890
	170	15	12.1-15.9	2270
	96	19	7.2-11.9	2120
C	180	20	7.5-19.9	2220
	179	19	8.0-12.1	1970
D	46	16	5.5-24.8	1920
	35	16	2.1-11.5	1440
	48	17	4.0-8.2	1220
E	152	25	16.5-34.7	3400
	138	23	21.2-29.7	3800
	139	25	14-27.9	3700
F	74	14	2.0-14.1	1100
	131	17	1.0-7.2	700
	141	14	3.1-4.0	650

TABLE VI

COMPARISON OF ARABICA, ARABUSTA (F1) AND
ARABUSTA PROGENIES (F2) IN TERMS OF GROWTH
FRUIT SET AND PEA BERRY FORMATION

	Girth of stem (cm)	Span of lateral branches (cm)	No. of flowers per node	% fruit set after selfing	Pea berries
Arabica parents					
Arabica 2	14	42.1	16	65	13
Arabica 3	13	50.7	14	60	21
Arabica 5	16	56.7	18	60	15
F1 hybrids (Arabusta)					
Robusta 13 x Arabica 3	20	77	25	0	86.4
Robusta 20 x Arabica 3	21	81	25	0	88.2
Robusta 12 x Arabica 5	24	72	22	0	84.0
Arabica 2 x Robusta 20	20	73	20	4	71.4
Arabica 2 x Robusta 10	22	75	26	5	76.2
F2 (Open pollinated Arabusta)					
Robusta 13 x Arabica 3	18	68	20	8	72.7
Robusta 20 x Arabica 3	21	74	16	3	74.9
Robusta 12 x Arabica 5	16	66	17	2	77.1
Arabica 2 x Robusta 20	20	70	21	10	73.6
Arabica 2 x Robusta 10	20	61	12	15	78.8

TABLE VII

COMPARISON OF BACKCROSS ARABUSTA (F3) AND
THEIR ARABICA PARENTS IN TERMS OF GROWTH

Arabica parents	Girth of stem	Span of lateral branches at 18 months
Arabica 2	16	60
Arabica 3	14	54
Arabica 5	17	60
Arabusta		
Robusta 20 x Arabica 2	19	82
Arabica 2 x Robusta 20	23	77
Arabica 2 x Robusta 10	20	79
Backcross		
Arabica 2 x (Robusta 20 x Arabica 2)	21	80
Arabica 2 x (Arabica 2 x Robusta 20)	23	88
Arabica 2 x (Arabica 2 x Robusta 10)	26	82

Acknowledgement

We are grateful to Mr. P.E. Dautey for the collection of data and Mr. J.N. Krofa for helping in the typing of the manuscript. This paper is published with the permission of the Executive Director of CRIG.

REFERENCES

1. Ampoto, S.I. and Ofori, F. (1975). Ann. Rep. Cocoa Research Institute of Ghana.
2. Capot, J; Dupautex, B. and Darandean, A. (1968). Coffee selection in the Ivory Coast; Chromosome duplication and hybridisation. *Cafe,cacao*, The (Paris) 12, 114-126.
3. Carvalho, A., Scaranari, H.J., Antunes, H. and Monaco, L.C. (1961). Melhoramento do cafeeiro. XXII - Resultados obtidos no ensaio de selecoes campinas (coffee breeding XXII - Results from the regional coffee selection trial from campinas). *Bragantia*, 20 (30) 711-740.
4. Dhaliwal, T.S. (1965). Progress report of the project coffee breeding in Puerto Rico 1954-1965. University of Puerto Rico, Agric. Expt. Sta. Rio Piedras. Puerto Rico. Miscellaneous publication No. 53.
5. Fernie, L.M. (1965). Coffe breeding in Tangayika. (First session of the technical working party on coffee production and protection. FAO Rio de Janeiro. October 1965.
6. Kruq, C.A. and de Poerk, R.A. 1968. World Coffee Survey, Agricultural Studies FAO, Rome.
7. Vander Vossen, H.A.M. and Owuor, J.R.O. (1981). A programme of interspecific hybridization between Arabica and Robusta coffee in Kenya. *Kenya Coffee*, 46, 131-7.
8. Walyaro, D.J. and Van Der Vossen, H.A.M. (1977). Pollen longevity and artificial cross-pollination in Coffea arabica. *Euphytica*, 26; 225-231.

SUMMARY

Ghana's coffee production has been progressively going down with below 2,000 tons being produced in 1984. This decline is mainly due to poor yields being encountered by farmers. Though this could partly be due to unsatisfactory farm management, it seems the major factor is poor planting materials. Breeding attempts being made to help rectify the situation include the development of high yielding robusta and arabusta coffee. The arabusta programme is mainly to improve the quality of our coffee. So far some robusta selections have been made which give about 3 tons/ha. This is a significant improvement over the local robusta which gives 0.8 tons/ha under similar conditions.

First (F1) and second (F2) generations of arabusta coffee have exhibited wide variations in most agronomic aspects such as flowering time, fruit maturation and plant structure in the field. Also, the presence of genotypes with high yielding capacity makes this programme very important in Ghana as such genotypes are being exploited either as varieties in themselves or as parents for further breeding programmes. Backcross to the arabica parent has shown some improvement in establishment and vigour which might be a reflection on yield improvement. This paper reports attempts being made at developing high yielding robusta and arabusta coffee to meet the farmers requirements in Ghana.

AMÉLIORATION GÉNÉTIQUE DES CAFÉIERS EN PAPOUASIE-NOUVELLE-GUINÉE

Historique, stratégie

P. CHARMETANT (*), J. M. KIARA, T. KUKHANG D.

CIC-Coffee Research Institute, P.O. Box 105 Kainantu E.H.P., Papua New Guinea
(*) CIRAD-CP, 12, square Pétrarque, 75116 Paris, France

INTRODUCTION

La caféiculture en Papouasie - Nouvelle Guinée (PNG) commença vers 1930. La variété "Blue Mountain" de Jamaïque fut mise en culture à Wau (DASF, non publié). Peu après, la culture se développa dans les Highlands à partir de Blue Mountain et de Bourbon, exclusivement en plantations européennes. La station d'Aiyura fut créée en 1937. On établit des essais variétaux dans la région des Highlands. Parmi les introductions d'Afrique de l'est, "Arusha" s'avéra la mieux adaptée et fut distribuée dès la fin des années 50. C'est une sélection "Tanganyika Résistant à la Sécheresse" avec des feuilles larges et des jeunes feuilles bronze.*

La sélection continua jusque vers 1975 (DASF, Annual Reports), et la variété Mundo Novo surpassa les introductions antérieures: c'est une des premières sélections dans un hybride naturel Bourbon x Typica. Caturra, bien que n'ayant pas été proprement testée à haute densité, fut adoptée avec succès par certaines plantations vers 1980.

Alors que la rouille orangée n'avait pas encore envahi le pays (Shaw, 1968), on mit en sélection des "différentiels" du CIFIC. Certains hybrides du Portugal, dont deux Catimor furent introduits en 1975 sans être évalués à cette époque.*

La PNG est un petit producteur avec des exportations annuelles de l'ordre de 60 000 tonnes (plus de 95% d'Arabica) dont plus de 70% sont le fait de petits planteurs. Bien qu'il soit difficile d'avoir une estimation exacte de la répartition des variétés, il est communément admis qu'Arusha représente plus de la moitié du café produit.

Tableau 1: Liste des hybrides résistants à la rouille orangée (principalement Catimor) introduits en Papouasie Nouvelle Guinée de 1975 à 1990

Date Origine	Numéro PNG	Généalogie	Commentaires
1975 PORTUGAL	PNI071 PNI072 PNI073 PNI074 PNI075 PNI076 PNI077 PNI078 PNI079	HW26/5-4- H373/44- H419/20- H419/25- H420/2- H420/10- H486/76- H502/25- T5159-	Catimor F3? "Bourbor" "Mundomor" "" ""(tous grands) "" Hybride complexe "" "" Catimor F3?
1985 1986 1987 1988 AUSTRALIE	PNI081 PNI082 PNI083 PNI084 PNI085	T8660-KM41- CIFC7960-KM47- CIFC7961-KM48- CIFC7962-KM49- CIFC7963-KM50-	T8660: Catimor F5 KM:Kamerunga (Qnsland) CIFCXXX:Catimor F5 voir ci-dessous
1986 1989 CIFC PORTUGAL	PNI091 PNI092 PNI093 PNI094	CIFC7960- CIFC7961- CIFC7962- CIFC7963-	Tous dérivés de HW26/5-3-45-
1986	PNI095	CIFC7958-	CIFC7958: Catimor F4
1986 KENYA	PNI086 PNI087 PNI088 PNI089 PNI090	B10.86- B10.89- B10.90- B10.127- B10.130-	Catimor F3 et F4? Origine Colombienne Résistance CBD moyenne à élevée (Kenya)
1990 COSTA RICA	PNI105 à PNI125	(18 lignées)	Catimor F2 à F6 Origines Portugaise et Colombienne

INTRODUCTION ET SELECTION DE CATIMOR

Le Coffee Research Institute (CRI), maintenant division de la CIC, fut fondé en 1986 juste avant que la rouille orangée ne se soit largement répandue dans le pays. Une de ses premières tâches fut donc d'introduire et de sélectionner des variétés résistantes (Tableau 1).*

1. Van der Vossen (1985) avait sélectionné des arbres de "type Catimor" dans les introductions de 1975 (Tableau 1). 45 descendances furent installées en 1987 dans un essai de sélection. Deux d'entre elles ont été repérées après la récolte 1992 pour leur homogénéité et leur productivité et doivent être confirmées.

2. Quatre lignées Catimor F6 sélectionnées par le CIFC furent introduites d'Australie et directement du Portugal. Leur sélection, sur station de 1987 à 1991 (Figure 1) et en essai multilocal, déboucha sur la distribution de 3 d'entre elles (Kiara, 1992). Leur réaction à l'antracnose n'est pas connue.*

3. Du Kenya furent introduites 5 lignées Catimor d'origine colombienne (Kiara, 1989) dont la résistance au CBD est moyenne à élevée (CRS, Ruiru, 1980). Leurs premières productions furent très satisfaisantes (Kiara, 1991). En 1992, PNI089 seule maintint un haut niveau de productivité associé à une relative homogénéité (Figure 2), ce qui confirme les résultats antérieurs (Kiara, 1992). Une confirmation multilocale sera entreprise à partir d'un petit nombre d'arbres sélectionnés. La sélection individuelle dans les autres lignées nécessite une année supplémentaire.

4. Afin d'élargir la base de sélection, 18 lignées Catimor F4 à F6 d'origines colombienne et portugaise ont été introduites du Costa Rica en 1990 et sont en cours d'évaluation.

LE PROGRAMME D'AMELIORATION EN COURS

Le CRI, en coopération avec le CIRAD, démarra un programme d'Amélioration Génétique en 1990. Après évaluation des priorités et du matériel disponible, une stratégie fut définie et mise en oeuvre.*

Buts

Les utilisateurs sont surtout les plantations "villageoises", mais aussi "industrielles" (plus intensives). La rouille orangée est une menace pour les altitudes moyennes. L'antracnose des baies* pourrait avoir un impact majeur en haute altitude, si elle est introduite. Le scolyte des grains*, les cigales et les nématodes, qui affectent déjà certains pays producteurs, doivent être pris en compte. La nécessité du drainage grève les coûts de production. Enfin, la qualité du café est un critère particulièrement important quand les cours sont bas.*

Figure 1: Catimor Portugal Productions, Aiyura (3 répétitions)

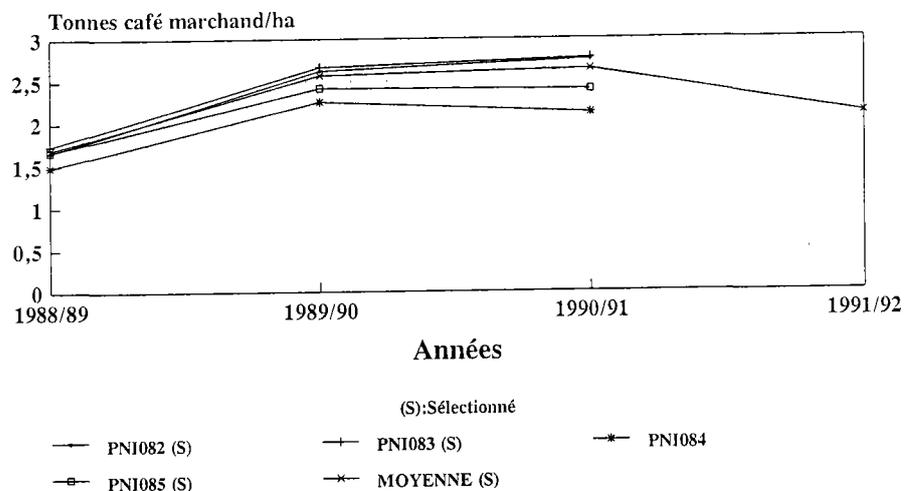
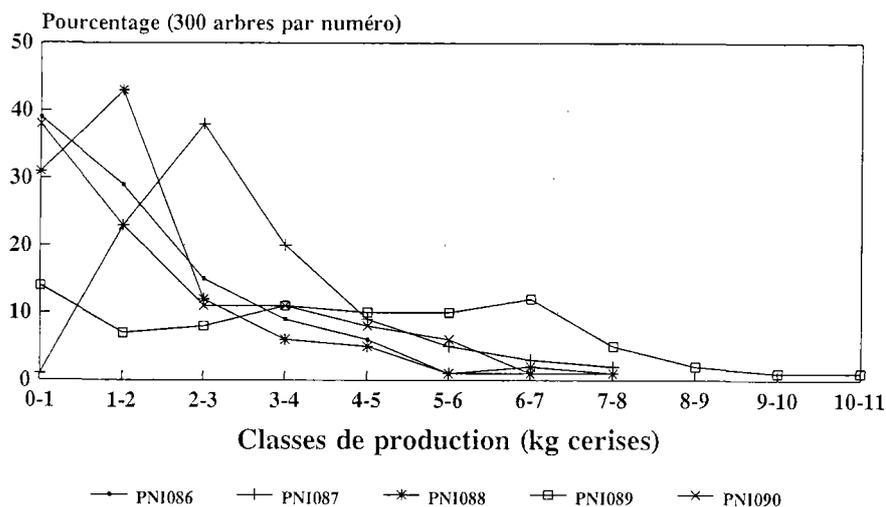


Figure 2: Catimor du Kenya Distribution de la récolte, Aiyura 1992



Ressources génétiques

Soixante-dix variétés ont été introduites avant 1975 des principaux pays producteurs. Leur évaluation et leur description précise sont en cours. Des arbres représentatifs sont multipliés végétativement (Charmetant, 1990, 1992, van Haaren, 1955) et progressivement installés dans une collection. Depuis 1990, la variabilité a été sensiblement augmentée par l'introduction de 55 variétés, dont 14 d'Ethiopie (prospection IRCC/ORSTOM, 1966) et Rume Sudan (possible source de résistance à l'antracnose).

Stratégie

Le but du schéma général (Figure 3) est de combiner des résistances génétiques (Anthracnose, Rouille...) avec un port nain, une productivité et une qualité améliorées.

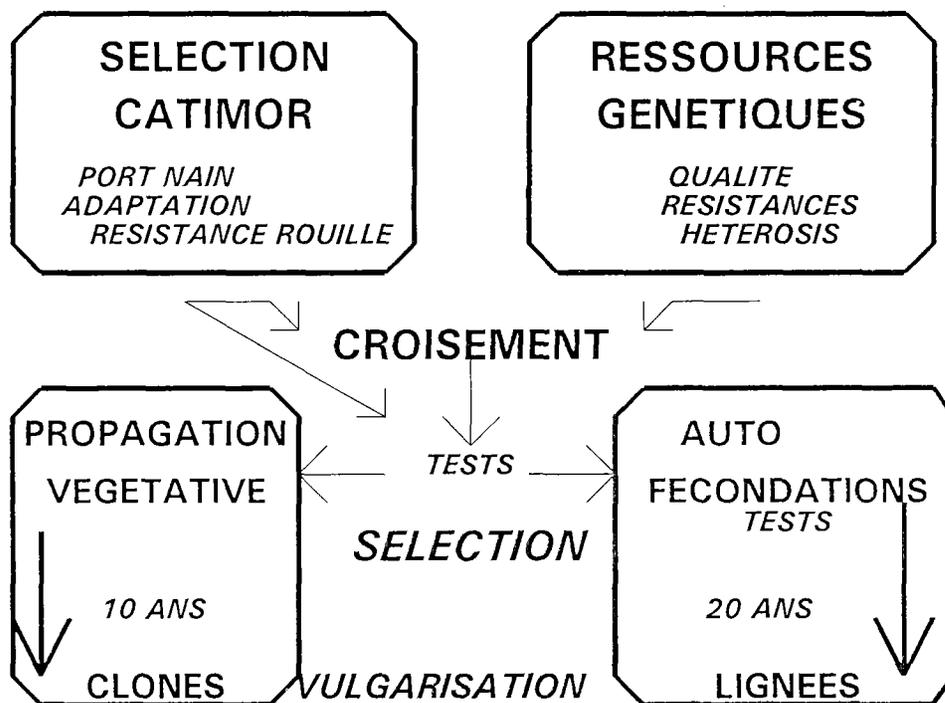
- 1. La poursuite de la sélection Catimor doit fournir à court terme des lignées vulgarisables. C'est une source de résistance spécifique et partielle forte à la rouille orangée, et modérée à l'antracnose. Le port nain est adapté aux fortes densités de plantation.*
- 2. L'amélioration génétique des caractéristiques majeures se fera en exploitant la variabilité disponible, en fonction des résultats d'un essai diallèle en cours (évaluation de l'héritabilité des caractères). La création d'hybrides interspécifiques est envisagée.*
- 3. Par croisement, on obtiendra alors des hybrides combinant port nain et autres caractéristiques recherchées. Un essai à parents constants Catimor doit permettre d'évaluer cette voie. L'intérêt de ce type de schéma est évoqué par Walyaro (1983), en particulier pour améliorer les résistances génétiques.*
- 4. Les meilleurs hybrides obtenus peuvent être fixés par autofécondations sur plusieurs générations. Cependant, la multiplication végétative par micropropagation étant opérationnelle au CRI, une sélection clonale sera beaucoup plus rapide.*

LES CAFEIERS DE BASSE ALTITUDE

Historique

Les premières introductions de Robusta ont sans doute été faites au début du siècle depuis l'Indonésie. En 1953, des semences de 5 clones de Besuki (Indonésie) furent introduites à Keravat (Nouvelle Bretagne). Une sélection de clones et de descendances fut entreprise (DASF, Rapports Annuels).*

**Figure 3: Amélioration de
Coffea arabica en
Papouasie Nouvelle Guinée**



Comme en Indonésie (Cramer, 1957), les chiffres de productivité avancés sont relativement faibles, mais, en PNG, cela peut être attribué à des pratiques culturelles inadaptées. Des champs semenciers polyclonaux furent installés dans les principales régions productrices. On peut donc penser que la plupart du Robusta (3% de la production nationale) provient de matériel "Besuki". Il est réputé de bonne qualité (traitement par voie humide, grosses fèves). La province Est Sepik est la principale région productrice (Harding, 1985).

En 1987, une plantation introduisit des semences de Besuki et d'Afrique de l'Ouest. Les travaux de sélection ont cessé depuis les années 70. Le CRI reprend maintenant cette activité à Madang.

Stratégie

Pour compenser le prix d'achat réduit du Robusta, il faut viser une amélioration de la productivité et de la qualité. Il n'y a pas de problème parasitaire important.

Une sélection individuelle dans le matériel d'Afrique de l'Ouest a permis de mettre en place un essai comparant des clones et leurs descendances. Ce matériel combine probablement des génotypes "guinéens" et "congolais" (Berthaud, 1985).

Sachant que certains Catimor se comportent bien en Nouvelle Calédonie (IRCC, 1990), au Vanuatu et aux Iles Salomon (non publié), les lignées disponibles en PNG seront testées à Madang. On en espère une amélioration sensible de la qualité. Du fait de l'altitude, ce café ne devrait cependant pas concurrencer l'arabica des Highlands.

De plus, une introduction de sélections Robusta de l'IRCC fournira du matériel amélioré à comparer avec le matériel local. Du résultat des essais dépendra la méthode de multiplication (boutures ou semences).

A plus long terme, l'étude d'hybrides interspécifiques dans le cadre du programme arabica devrait permettre d'améliorer aussi les caféiers de basse altitude.

CONCLUSION

*La sélection dans une culture pérenne est une entreprise de longue haleine. Elle implique l'évaluation précoce d'un grand effectif de plants (Carvalho, 1988). Sachant que l'exploitation des ressources génétiques du genre *Coffea* commence seulement, "les perspectives d'amélioration, par des méthodes conventionnelles ou avancées, sont grandes" (van der Vossen, 1985). Le travail en cours et à venir est rendu possible par l'expérience accumulée tant en PNG que dans les autres pays.*

*** NOTES**

Scolyte des grains ou CBB: Hypothenemus hampei Ferr.

Anthracnose des baies ou CBD: causée par Colletotrichum coffeanum Noack sensu Hindorf.

CIC: Coffee Industry Corporation Ltd (PNG).

CIFC: Centro de Investigação das Ferragens do Cafeeiro, Oeiras, Portugal. (Centre de Recherche sur la Rouille Orangée).

CIRAD: Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement.

Rouille Orangée des caféiers: causée par Hemileia vastatrix.

DASF: Ministère de l'Agriculture, PNG (Maintenant D.A.L.).

REFERENCES

- Berthaud J., 1986. Propositions pour une nouvelle stratégie d'amélioration des caféiers de l'espèce C.canephora, basée sur les résultats de l'analyse des populations sylvestres. ASIC, 11ème Conférence, Lomé, p. 445-452.
- Carvalho A., 1988. Principles and Practice of Coffee Plant Breeding for Productivity and Quality Factors: Coffea arabica. In: Coffee vol.4, Agronomy.(Elsevier Applied Science, England). p.129-165.
- Charmetant P., 1990. Vegetative propagation at Aiyura. Preliminary report. PNG Coffee Vol.9 No 1, p. 23-26.
- Charmetant P., 1992. Cuttings Trial. Coffee Research Report N° 13. ISBN 9980-85-916-4, 26 p.
- Cramer, P.J.S., 1957. A review of literature on Coffee Research in Indonesia. Int.Am.Inst.of Agr.Sci.,Turrialba, Costa Rica, 262 p.
- D.A.S.F. Annual Reports 1959 to 1969. Dept. of Agriculture & Livestock, Port Moresby, Papua New Guinea.
- I.R.C.C. Nouvelle Calédonie/ ADRAF Filière Café. 1991. Rapport annuel 1990. 93 p.
- Kiara J.M., 1989. Introduction of the rust resistant Catimor varieties as a strategy for better Coffee Rust management. PNG Coffee Vol.8 No 1, p.41-58.
- Kiara J.M., 1991. Progress Report to Coffee Research Advisory Committee.(diffusion restreinte).
- Kiara J.M., 1992. Introduction, Field Evaluation and adaptability of Rust Resistant Catimor Coffee Varieties in Papua New Guinea. CIC-Coffee Research Institute. Coffee Research Report No 14. ISBN 9980-85-917-2. 144 p.
- Harding P.E., 1985. The main coffee areas of Papua New Guinea. PNG Coffee Vol.4 p.19-23.
- Shaw D.E., 1968. Coffee rust outbreaks in Papua from 1892 to 1965 and the 1965 eradication campaign. Research Bull. No 2 (Plant Pathology series), PNG DASF.
- van Haaren A.J.H., 1955. The vegetative propagation of Coffea arabica. PNG Agr.Journ. 10: p.43-53.
- van der Vossen H.A.M., 1985. Coffee Selection and Breeding. In: Coffee, Botany, Biochemistry and Production of beans and beverage.ISBN 0-7099-0787-7. p. 48-96.
- van der Vossen H.A.M., 1986. Report on Coffee Breeding in Papua New Guinea to the Coffee Research Institute at Aiyura. PNG Coffee Vol.5 No 1, p.40-56.
- Walyaro D.J.A., 1983. Considerations in breeding for improved yield and quality in arabica coffee. Doctoral thesis, Wageningen, The Netherlands. 121 p.

CHARMETANT P. (*), KIARA J.M., KUKHANG T. D.
Coffee Research Institute, P.O. Box 105, Kainantu E.H.P.
Papouasie Nouvelle Guinée (*) CIRAD-CP, France

**L'amélioration génétique des caféiers en Papouasie-Nouvelle Guinée.
Historique, stratégie.
Résumé**

Le développement de la caféiculture en Papouasie Nouvelle Guinée est évoqué, ainsi que les principaux résultats de la sélection de Coffea arabica et de C. canephora.

Les auteurs exposent la situation actuelle et la stratégie adoptée par le Coffee Research Institute en matière d'Amélioration Génétique. Depuis l'extension de la rouille orangée à l'ensemble de la zone caféière, en 1986, l'adaptation locale de la variété Catimor a été étudiée. On tente maintenant d'étudier l'héritabilité des caractères dans les conditions de P.N.G.. On pourra ainsi exploiter par croisements la variabilité observée chez les génotypes sauvages issus de prospections (résistances, hétérosis) pour constituer une large base de sélection afin de préparer l'avenir.

L'amélioration des caféiers en basse altitude comporte l'étude de l'adaptation des Catimor et la sélection dans l'espèce C. canephora.

**Coffee Breeding in Papua New Guinea. History, strategy.
Abstract**

The development of coffee growing in Papua New Guinea is reported. The main results of selection (Coffea arabica and Coffea canephora) are presented.

In the field of Plant Breeding, the authors discuss the actual situation and the strategy developed by the Coffee Research Institute. After a major Coffee Leaf Rust outbreak in 1986 Catimor adaptation to P.N.G. conditions was studied. An attempt is now being made to study the heritability of the characters. The variability found in wild coffee genotypes will then be used through crosses in order to ensure a wide genetic base for future selection (resistances, heterosis).

Coffee Breeding for low altitudes involves the study of Catimor adaptation and a further selection within C. canephora.

INFLUENCE DES TRAITEMENTS CONTRE LA CARENCE EN ZINC DU CAFÉIER ARABICA SUR L'ANTHRACNOSE DES FRUITS (*COLLETOTRICHUM COFFEANUM* NOACK)

C. LAMBOT, L. GAHIRO

Programme de Recherches sur le caféier Arabica
Institut des Sciences Agronomiques du Burundi, ISABU, B.P. 795, Bujumbura, Burundi

INTRODUCTION

L'excès de café sur le marché mondial et les chutes de prix qu'il entraîne, contraignent les pays producteurs à orienter leur politique de production vers un café de haute qualité afin de garantir leurs recettes à l'exportation.

Le Burundi a réalisé un effort considérable pour améliorer son outil technologique de production du café. Des améliorations spectaculaires du café exporté ont été obtenues par un effort soutenu au niveau de toute la filière (Vincent, 1991).

L'ISABU (Institut des Sciences Agronomiques du Burundi), participe à cet effort d'amélioration de la qualité du café par des recherches sur les facteurs agronomiques qui peuvent l'influencer ainsi que sur les processus technologiques susceptibles d'être améliorés. Une étude fondamentale est également menée sur les goûts indésirables pouvant déprécier la qualité.

La carence en zinc est un facteur agronomique qui joue un rôle négatif important sur la qualité du café. Les essais entrepris sur l'étude de cette carence ont montré que dans certains cas il pouvait y avoir une interaction entre les traitements de correction et l'anthracnose des fruits (*Colletotrichum coffeanum* Noack). Les symptômes et les dégâts provoqués par l'anthracnose peuvent être fortement augmentés par les traitements de correction de la carence en zinc. Une recherche a ainsi été entreprise pour comprendre les mécanismes pouvant lier la correction de la carence en zinc par des applications foliaires et l'anthracnose des fruits.

LE PROBLEME DE LA CARENCE EN ZINC

La carence en zinc apparait comme un problème majeur de la culture du caféier dans les régions du centre et de l'est du Burundi. Dans le Kirimiro au centre du pays, trois caféiers sur quatre présentent des symptômes de carence et 13% sont considérés comme fortement carencés. Les analyses foliaires ont permis de confirmer cette carence, tandis que les analyses pédologiques ont mis en évidence le très faible niveau de zinc dans le sol (Lambot, 1989).

L'identification de la carence à partir des symptômes visuels est aisée. Elle affecte la croissance des feuilles, des rameaux et des fruits. Les feuilles présentent le plus souvent les signes d'une chlorose internervienne des limbes qui prennent l'aspect d'une mosaïque formée de très petites plages jaunâtres délimitées par un réseau de fines nervures vertes. Elles sont anormalement petites, très étroites et lancéolées; elles peuvent également se courber et prendre la forme d'une faucille (Coffee Research Foundation, 1977).

Des essais ont été installés en milieu paysan afin de déterminer l'impact économique de la carence en zinc sur la production des caféiers et la qualité du café produit ainsi que la meilleure technique de lutte à appliquer.

Les pulvérisations foliaires de chélate de zinc, de sulfate de zinc ou d'oxyde de zinc permettent d'éliminer rapidement les symptômes de carence et d'augmenter les teneurs en zinc des feuilles. Par contre les applications sur le sol de chélate ou de sulfate de zinc se révèlent après quatre ans encore inefficaces à corriger les symptômes de carence et les teneurs en zinc des feuilles. Après cinq années de pulvérisation de chélate de zinc sur des caféiers carencés, aucune augmentation moyenne de production n'a pu être enregistrée. Elles ont toutefois un effet important sur la qualité du café par une amélioration considérable des caractéristiques techniques et qualitatives des fruits.

Suivant les années, les fruits des caféiers traités sont plus lourds de 8 à 16 % et contiennent 14 à 28 % de caracolis en moins. Le rendement au dépulpage, calculé par le rapport entre le poids du café en parche sèche et le poids des fruits, peut être amélioré certaines années de 4 à 5,5 %. La couleur du café marchand est plus foncée et bleutée tandis que la qualité de la liqueur est très nettement améliorée.

Un effet indésirable des pulvérisations de produit à base de zinc sur les caféiers a toutefois été observé. L'antracnose des fruits augmente significativement sur les caféiers traités, mais les raisons de cette plus forte incidence de la maladie restaient à découvrir.

LE PROBLEME DE L'ANTHRACNOSE DES FRUITS

Antracnose est un terme qui regroupe les maladies à lésions nécrotiques brunes ou noires, parfois déprimées et de forme quelconque mais nettement limitée, rencontrées sur les feuilles, les rameaux et les fruits (Firman et Waller, 1977).

L'antracnose du caféier Arabica est connue depuis longtemps sur les feuilles et les rameaux. Par contre ce n'est qu'en 1922 que l'antracnose des baies (Coffee berry disease-CBD) fut découverte sur le mont Elgon dans l'ouest du Kenya (Mac Donald, 1926). Son apparition serait liée à une mutation d'une souche non pathogène de Colletotrichum spp. (Nutman et Roberts, 1960). Limitée d'abord à l'ouest du Great Rift Valley, elle gagna par la suite l'Est du Rift en 1939. Le Zaïre, l'Ouganda, la Tanzanie et le Rwanda furent progressivement atteints. Elle fit son apparition au Burundi avant les années soixante (Buyckx, 1962), et reste actuellement limitée au continent africain.

Les symptômes d'antracnose apparaissent occasionnellement sur les feuilles, les jeunes pousses et les fleurs, mais les plus dommageables surviennent sur les fruits, plus particulièrement sur les drupes vertes en croissance. Avant que l'endocarpe ne durcisse, de petites taches brun foncé à noires, nettement déprimées, arrondies à ovales, s'étendent rapidement et peuvent recouvrir l'entièreté de la drupe attaquée. Celle-ci tombe ou demeure sur l'arbre, noircie ou desséchée (Perreux, 1988).

L'antracnose des baies (CBD) est provoquée par un champignon connu sous le nom de Colletotrichum coffeanum Noack (Nutman et Roberts, 1960; Hindorf, 1970; Firman et Waller, 1977) qui est la forme conidienne de Glomerella cingulata (Stenem) Spauling et Schrenk. La souche responsable des dégâts sur fruits est distincte de celles provoquant des dégâts sur les feuilles et les rameaux. Elle a été nommée Colletotrichum coffeanum Noack sensu Hindorf.

L'antracnose des fruits est conditionnée par un climat frais et humide. Elle est donc en principe limitée aux hautes altitudes où le microclimat est particulièrement frais.

L'écorce des arbres constitue la source primaire d'inoculum mais elle émet de faibles quantités de spores. Ce sont les baies infectées qui représentent la source principale et efficace d'inoculum composé essentiellement par la souche virulente.

A courte distance, les spores sont disséminées par les gouttes de pluie alors que le vent, l'homme et les animaux assurent la dispersion à longue distance. En plus de leur action sur la germination, l'infection et la dissémination, la pluie et la température sont les principaux facteurs de l'expansion de la maladie. Par ailleurs, une floraison étalée, des branchages touffus créant un microclimat humide, une récolte incomplète et un contrôle chimique mal conduit, avec des fongicides inadéquats ou en faible concentration, ou des traitements fongicides inachevés favorisent la persistance du parasite (Gahiro, 1991).

L'antracnose des fruits est susceptible d'occasionner d'énormes pertes en production. A son apparition au Kenya, elles ont été évaluées à 75 % de la production (Mac Donald, 1926). Ainsi des plantations entières ont été abandonnées dans certains districts du Kenya et de l'Ethiopie (Firman et Waller, 1977).

D'après Foucart et Brion (1963), qui étudièrent le problème de l'antracnose, trois zones peuvent être distinguées au Rwanda et au Burundi; des zones saines dont l'altitude est inférieure à 1600 m ou supérieure à 1800 m, des zones endémiques avec des possibilités de phases épidémiques dont l'altitude est comprise entre 1600 m et 1800 m et une zone épidémique correspondant à la vallée de la Mukungwa au Rwanda. Plusieurs enquêtes menées au Burundi ont permis de démontrer que si l'antracnose n'est pas un problème grave au niveau national, elle peut toutefois ravager presque la totalité de la production de certaines plantations situées dans des zones favorables au champignon. Les pourcentages de fruits malades observés dans les deux principales régions caféières du pays ont révélé des pourcentages moyens de fruits malades variant de 3,7 à 18,6 % selon les années (ISABU, 1990 et ISABU, 1991). Toutefois sur certaines collines les caféiers portaient plus de 70% de fruits malades d'antracnose un mois avant la récolte.

Les traitements fongicides effectués au moyen de l'oxychlorure de cuivre (Cuproxol 50 PM) à la dose de 8 kg/ha et répétés huit fois au cours de la saison culturale permettent d'augmenter les productions de 88 à 200 % (Bagambake et Perreaux, 1987). L'augmentation de production obtenue est imputable à un meilleur contrôle des maladies fongiques (*Hemileia vastatrix* et *Colletotrichum coffeanum*) mais aussi à un effet tonique du cuivre. Malgré ces résultats très encourageants, seules les méthodes culturales de lutte restent recommandées au Burundi en raison des contraintes majeures rencontrées pour l'application des traitements phytosanitaires en milieu paysan. Elles consistent en une récolte sanitaire des fruits malades ou momifiés ainsi que la sélection de variétés de caféiers plus résistants.

RELATION ENTRE LE TRAITEMENT DE LA CARENCE EN ZINC ET L'ANTHRACNOSE DES FRUITS

Essais en champ

MÉTHODOLOGIE

Afin de corriger les symptômes de déficience en zinc, des traitements correcteurs ont été essayés par pulvérisation foliaire et application de zinc au sol. Ces traitements ont été appliqués dans deux essais séparés, installés dans des parcelles paysannes de caféiers. Les caféiers avaient entre trois et cinq ans au début de l'essai.

Le premier essai qui démarra en 1987, compare un témoin à une parcelle traitée tout d'abord par pulvérisation avec du chélate de zinc pendant trois ans et ensuite avec du sulfate de zinc pendant trois années également. Le chélate de zinc (Chelal Zn) et le sulfate de zinc heptahydrate ont été appliqués respectivement à raison de 4 l/ha et 4 kg/ha répétés deux fois pendant l'année culturale à trois mois d'intervalle. Les parcelles élémentaires comportaient un nombre de caféiers variant de 21 à 67 caféiers, l'essai était mené en blocs aléatoires complets avec 32 répétitions.

Le deuxième essai a débuté en 1988, il compare cinq traitements de correction de la carence en zinc à un témoin. Les traitements consistent en des applications foliaires ou au sol de sulfate de zinc heptahydrate, d'oxyde de zinc et de chélate de zinc (Chelal Zn). Les doses appliquées en pulvérisation foliaire étaient de 4 kg ou 4 l/ha pour chacun des produits, les applications étant répétées deux fois dans le courant de l'année culturale. Les applications au sol du sulfate de zinc étaient réalisées à la dose annuelle de 25 kg/ha, celles de chélate de zinc étaient réalisées à la dose annuelle de 6 l/ha. Les parcelles élémentaires comportaient 14 ou 15 caféiers, l'essai était mené en blocs aléatoires complets avec 10 répétitions.

Les pulvérisations étaient effectuées deux fois dans le courant de chaque année culturale, la première application un mois après la floraison et la deuxième trois mois plus tard.

Les symptômes d'antracnose sur fruits ont été observés pendant 2 ans dans le premier essai et une année dans le deuxième essai. Cinq caféiers productifs étaient choisis au hasard au centre de chaque parcelle élémentaire. Une branche plagiotrope primaire était choisie à même hauteur sur les cinq caféiers et identifiée par un signe distinctif. Les nombres de fruits totaux et malades étaient alors comptés mensuellement sur chaque branche.

RÉSULTATS

Les moyennes des comptages et les analyses de la variance sont présentés au tableau 1. Les moyennes ont été soumises au test de comparaison multiple de Newman et Keuls.

Tableau 1
Pourcentages mensuels moyens de fruits anthracosés dans les deux essais

Objets	Nov.	Déc.	Jan.	Fév.	Mars	% de fruits tombés entre novembre et mars
Essai 1						
Témoin	0,1	2,1	4,7	4,8	8,3	35
Chélate/feuille	0,1	5,3	13,7	10,9	12,5	43
F obs	0,0 NS	5,3*	9,7*	10,2*	3,7 NS	36,6*
C.V. rés.%	249,4	146,5	124,2	96,9	82,1	36,6
Essai 2						
Témoin	0,1	1,4	8,8	6,4	9,6	38
Sulfate/feuille	0,2	3,8	15,3	13,9	17,9	51
F obs	1,5 NS	5,6*	7,3*	9,8**	12,9**	15,8***
C.V. rés.%	375,0	153,5	78,4	93,4	66,4	27,3
Essai 2 (détail)						
Témoin	0,1	0,9	0,1	0,5 b	0,2	10 b
Chélate/sol	0,0	0,4	0,1	0,9 b	0,5	10 b
Sulfate/sol	0,1	1,9	2,6	2,1 ab	0,3	10 b
Chélate/feuille	0,1	1,8	1,3	1,4 ab	3,0	12 ab
Sulfate/feuille	0,2	2,0	1,8	2,8 ab	3,0	14 ab
Oxyde/feuille	0,1	3,8	4,4	4,7 a	4,0	20 a
F obs	1,1 NS	1,5 NS	1,5 NS	2,7*	2,2 NS	2,8*
C.V. rés.%	201,4	173,7	245,7	143,0	198,6	56,5

Les caféiers qui reçoivent des traitements par pulvérisation foliaire présentent significativement plus d'antracnose que les caféiers témoins et ceux recevant des applications au sol. Cette incidence plus forte de l'antracnose se marque tout au long de la saison de fructification mais aussi au moment de la récolte où la proportion de fruits malades est plus importante pour les caféiers traités par voie foliaire (figure 1).

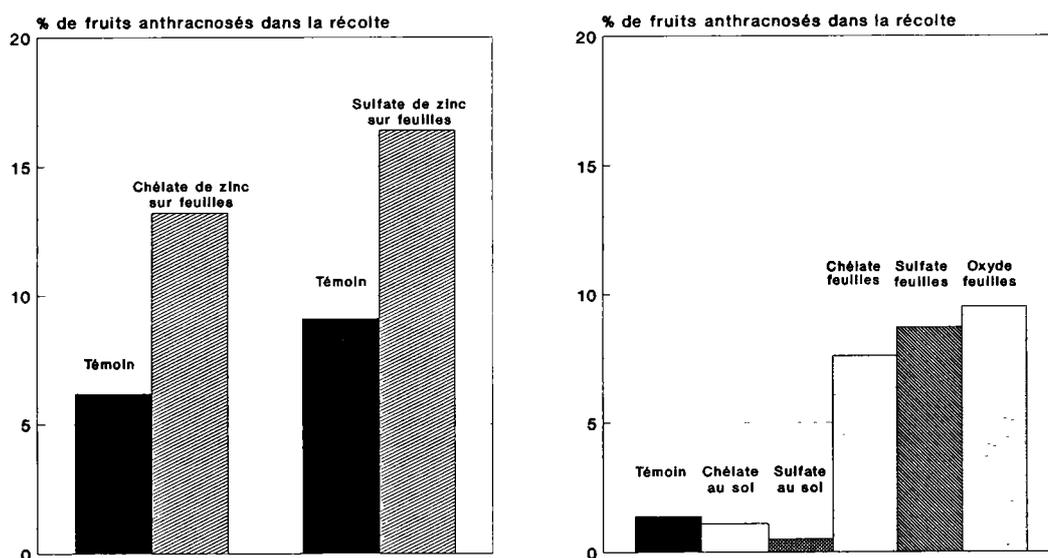


Figure 1 : Pourcentages de fruits anthracosés dans la récolte des deux essais

Essais au laboratoire

Les observations faites au champ permettent d'avancer deux hypothèses principales pouvant expliquer l'augmentation d'antracnose des fruits sur les caféiers traités par pulvérisation foliaire : soit la sensibilité des fruits au champignon peut être modifiée par les applications foliaires, soit les produits appliqués ont une action sur le champignon.

Des essais ont été menés en laboratoire pour vérifier ces hypothèses. Les résultats satisfaisants obtenus au champ pour le contrôle de la carence en zinc et le coût avantageux du produit, ont déterminé le choix du sulfate de zinc pour les expérimentations au laboratoire.

Evaluation de la sensibilité des fruits

MÉTHODOLOGIE

La sensibilité des fruits a été évaluée selon la technique d'inoculation in vitro décrite par Van Der Graaf (1981). Cinquante drupes saines sont prélevées au hasard dans les parcelles élémentaires des essais au champ et stérilisées à l'eau de javel 2% pendant 5 minutes puis rincées à l'eau distillée. Les fruits sont placés dans des boîtes plastiques hermétiques dans une enceinte confinée à une température variant de 22 à 23 °C et éclairée 12 h/jour. Une suspension conidienne composée de 10 isolats est obtenue par lavage du mycélium à l'eau distillée, puis par filtration à travers une toile à fines mailles. La concentration, calculée à la cellule Thoma, est ajustée à 10^6 conidies/ml.

Une goutte de $\frac{1}{2}$ 20 μ l de la suspension est déposée sur chaque fruit. La goutte doit rester un minimum de 24 h pour assurer la germination et la pénétration du tube germinatif dans les drupes. Les fruits sont observés 12 jours après l'inoculation, ceux présentant des symptômes importants et pouvant être considérés comme malades sont comptés séparément.

Les deux essais au champ ont été observés par cette méthode. Le nombre de traitements du deuxième essai a été réduit à trois, à savoir le témoin, le sulfate appliqué aux feuilles et le sulfate appliqué au sol. Les fruits ont été prélevés à deux stades de croissance, en février et en avril et comparés selon un dispositif en blocs aléatoires complets avec trois répétitions. Chaque répétition comportait cinquante fruits au même stade de développement.

RÉSULTATS

Tableau 2
Pourcentages de fruits avec symptômes importants, 12 jours après inoculation

Objets	Essai 1		Objets	Essai 2	
	Stade de croissance			Stade de croissance	
	Fév.	Avril		Fév.	Avril
Témoin	23,9 a	89,7	Témoin	25,9 a	52,8
SF	17,0 b	95,7	SF	17,7 b	52,3
			SS	11,9 c	51,8
F.obs	20,8*	2,6 NS		151,6***	0,01 NS
C.V. rés.%	9,1	4,8		5,4	15,1

SF : Sulfate de zinc sur feuilles
SS : Sulfate de zinc au sol

La sensibilité des fruits au champignon est plus forte en avril lorsque les fruits arrivent à un stade de jaunissement précédant la maturation. Les différences significatives observées en février entre les pourcentages moyens de fruits malades des traitements ne se répètent pas en avril. Les différences du mois de février pourraient résulter du développement plus rapide des fruits provenant des caféiers traités avec le sulfate de zinc. La sensibilité des fruits étant fortement dépendante de leur stade de développement, l'essai d'inoculation est considérablement influencé par ce facteur.

Malgré le meilleur résultat obtenu avec les fruits traités au sulfate de zinc, il n'est pas possible de conclure sur d'éventuelles différences de sensibilité des fruits.

Influence du sulfate de zinc sur le champignon

L'action du sulfate de zinc heptahydrate sur *Colletotrichum coffeanum* Noack a été évaluée de deux façons distinctes: par mélange de sulfate de zinc dans le milieu de culture du champignon et par application directe du sulfate de zinc sur le champignon en croissance.

MÉTHODOLOGIE

Dans la première méthode, le milieu de culture composé de PDA (Potato dextrose agar) a été mélangé à du sulfate de zinc à plusieurs concentrations. Les concentrations de sulfate de zinc étudiées ont varié de 10 à 1000 ppm, la concentration appliquée au champ étant de 4000 ppm.

Le mélange de sulfate de zinc et de PDA est stérilisé à 120 °C par autoclave et ensemencé par deux disques de 4 mm de diamètre du mycélium du champignon prélevé sur milieu de culture. Les boîtes de pétri sont placées ensuite dans un incubateur à \pm 25°C. La croissance et la sporulation du champignon sont appréciées après des périodes de 5, 8, 10, 12 et 14 jours d'incubation par mesure du diamètre de la colonie et par comptage du nombre de conidies à l'hématocymètre Thoma. Les conidies étaient extraites par lavage du mycélium avec de l'eau distillée et filtration.

Dans la deuxième méthode, le milieu de culture était composé de malt-agar (5 g de malt extract + 5 g de agar-agar + 250 ml H₂O). Une solution de 2,5 ml de sulfate de zinc était appliqué directement sur le champignon en croissance dans les boîtes de pétri. Cette application est effectuée 4, 6 et 8 jours après l'ensemencement des boîtes. Les concentrations de 4000 et 2000 ppm de sulfate de zinc ont été comparées. La sporulation du champignon était mesurée après 10 et 12 jours de croissance.

Pour chaque traitement étudié, quatre répétitions ont été réalisées. Les mesures de croissance de la colonie étaient effectuées sur les quatre répétitions, tandis que les observations portant sur la sporulation étaient effectuées sur deux boîtes de pétri.

RÉSULTATS

La croissance du champignon est considérablement ralentie par la présence de sulfate de zinc dans le milieu de culture. En écartant la concentration de 1000 ppm pour laquelle la croissance et la sporulation ont été nulles, l'analyse statistique indique que les concentrations de 400 ppm à 10 ppm ont des moyennes différentes pour la croissance et la sporulation et ceci pour toutes les périodes d'observation. L'effet dépressif se manifeste déjà à la plus petite concentration étudiée. La sporulation du champignon est fortement diminuée lorsque le sulfate de zinc est placé dans le milieu de culture, elle est nulle à la dose de 400 ppm (tableau 3).

Tableau 3
Croissance et sporulation des colonies en présence de sulfate de zinc dans le milieu
Diamètre (ϕ) d'accroissement mesuré en cm, sporulation en 10⁶ conidies/ml (S)

Concentrations	Nombre de jours après ensemencement									
	5		8		10		12		14	
	ϕ	(S)	ϕ	(S)	ϕ	(S)	ϕ	(S)	ϕ	(S)
Témoin	2,7		4,9		6,6	(3,3)	7,2	(3,5)	7,7	(5,2)
10 ppm	2,5		4,6		6,2	(2,4)	6,8	(3,1)	7,2	(3,5)
100 ppm	2,2		3,9		5,4	(2,2)	6,0	(2,9)	6,8	(2,5)
400 ppm	0,0		0,0		0,6	(0,0)	0,8	(0,0)	1,0	(0,0)
1000 ppm	0,0		0,0		0,0	(0,0)	0,0	(0,0)	0,0	(0,0)

Tableau 4

Croissance et sporulation des colonies avec application de sulfate de zinc sur le champignon

Diamètre (ϕ) d'accroissement mesuré en cm, sporulation en 10^5 conidies/ml (S)

Jour de l'application/ concentrations	Nombre de jours après ensemencement					
	4	6	8	10		12
	ϕ	ϕ	ϕ	ϕ	(S)	(S)
Témoin	2,1	3,4 a	4,4 a	5,4 a	(2,3) b	(3,6) d
Jour 4 2000 ppm	---	3,1 a	3,5 c	3,7 e	(4,0) a	(6,5) b
4000 ppm	---	2,7 b	3,0 d	3,2 f	(4,7) a	(8,1) a
Jour 6 2000 ppm	---	---	4,1 b	4,7 c	(2,5) b	(3,8) d
4000 ppm	---	---	3,9 b	4,4 d	(3,0) b	(5,6) c
Jour 8 2000 ppm	---	---	---	5,1 ab	(2,5) b	(3,0) d
4000 ppm	---	---	---	4,9 b	(2,3) b	(3,0) d
F. obs		12,7**	56,7***	106,9***	20,2**	75,9***
C.V. rés. %		6,5	3,9	3,4	9,9	6,7

L'effet dépressif sur la croissance du champignon se manifeste une fois encore lorsque le sulfate de zinc est appliqué directement sur le champignon. Par contre dans ce cas précis, la sporulation du champignon est considérablement augmentée. L'augmentation de la sporulation apparaît après environ six jours, tandis que l'effet dépressif sur la croissance est très rapide et peut être mesuré seulement deux jours après l'application du sulfate de zinc sur le champignon (tableau 4).

Les données des tableaux 3 et 4 sont illustrées par la figure 2.

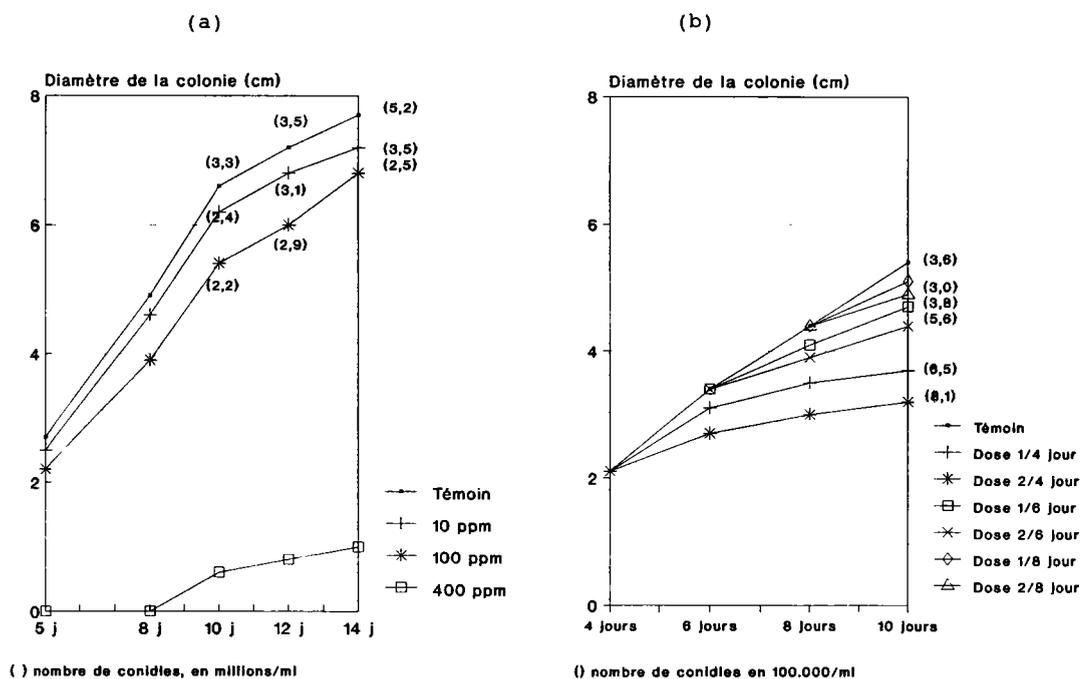


Figure 2 : Influence du sulfate de zinc sur la croissance et la sporulation de *Colletotrichum coffeanum* par - (a) incorporation au milieu de culture
- (b) application sur le champignon en croissance

CONCLUSIONS

Sur caféier Arabica, les pulvérisations foliaires de produits contenant du zinc, sous forme de sulfate, de chélate ou d'oxyde peuvent provoquer des augmentations importantes des symptômes et des dégâts d'antracnose des fruits. Les applications au sol de sulfate ou de chélate n'ont pas cet effet d'intensification de la maladie.

Les expérimentations menées en laboratoire avec le sulfate de zinc ont démontré que l'effet d'aggravation de la maladie observé au champ est la conséquence d'une sporulation exacerbée du champignon. Cette augmentation de la sporulation apparaît lorsque le champignon est pulvérisé par du sulfate de zinc. Paradoxalement, le sulfate de zinc présente un effet fongicide qui ralentit la croissance du champignon sans toutefois arriver à le tuer. L'effet d'augmentation de la sporulation ne se manifeste que lorsque le produit est appliqué sur le champignon en croissance. Le sulfate de zinc mélangé au milieu de culture, a un effet dépressif sur la croissance et la sporulation du champignon. Par contre, si le produit est appliqué directement sur le champignon, sa croissance est freinée et sa sporulation stimulée.

Des observations analogues ont été obtenues par Biratu et al. (1990) qui ont démontré in vitro que le champignon soumis à une pression fongicide a tendance à sporuler plus intensément. Cette réaction du champignon à la pression fongicide impose le recours à un programme de lutte avec des applications répétées à 3 ou 4 semaines d'intervalle. Sept ou huit applications sont ainsi nécessaires pour couvrir la période de fructification.

La sensibilité des fruits provenant des caféiers traités par pulvérisation foliaire ou par application de zinc au sol peut paraître diminuée par rapport à celle des caféiers non traités. Mais cet effet bénéfique est probablement la résultante d'un développement plus rapide des fruits traités qui modifie temporairement leur sensibilité au champignon.

Les pulvérisations foliaires de zinc augmentent l'inoculum d'antracnose dans les caféières. Ces pulvérisations ne sont pas envisageables dans des zones sensibles à l'antracnose sans une association à un programme de lutte fongicide adapté. Un mélange du fongicide avec le zinc pourrait alors être appliqué. Dans les zones sensibles à l'antracnose, la réalisation des traitements de correction de la carence en zinc par pulvérisation foliaire est donc conditionnée par l'application simultanée d'un programme de lutte fongicide contre l'antracnose.

Le recours à une variété de caféier Arabica résistante à l'antracnose nécessitera de nombreuses années de sélection. La résistance totale n'est d'ailleurs probablement pas possible. Dans le meilleur des cas, le remplacement du verger caféicole par une variété tolérante est une solution à long terme.

En dehors d'une lutte fongicide associée aux traitements de correction de la carence en zinc, les applications de zinc au sol constituent la voie de traitement la plus réaliste. Elle est malheureusement plus difficile à réaliser que la voie foliaire, et plus lente à manifester ses effets bénéfiques sur la disparition des symptômes. Les modalités de son application sont encore à l'étude et devront être précisées même si les premiers résultats obtenus sont encourageants.

L'étude menée à la fois en champ et en laboratoire a démontré que la plus grande prudence s'impose lorsque des traitements phytosanitaires ou correcteur de carence sont envisagés dans les caféières. Des effets totalement inattendus peuvent apparaître et remettre totalement en question des traitements pourtant efficaces. Les expérimentations en laboratoire sont un complément indispensable aux essais au champ pour comprendre les mécanismes d'action des produits sur le champignon.

BIBLIOGRAPHIE

- Bagambake, D. et Perreaux, D. (1987). Programme de recherche sur les maladies du caféier. ISABU, Rapport annuel 1987/88, Programme défense des végétaux.
- Biratu, T.; Hulluka, M. and Hindorf, H. (1990). In vitro evaluation of fungicides against coffee berry disease (CBD), Colletotrichum coffeanum. Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent, 55 (3a), p 975-982.
- Buyckx, E.J.E. (1962). Précis des maladies et des insectes nuisibles rencontrés sur les plantes cultivées au Congo, au Rwanda, au Burundi. La division de Phytopathologie et d'Entomologie agricole, INEAC.
- Coffee Research Foundation (1977). An atlas of coffee pests and diseases. Ed. by The Coffee Board of Kenya, p 55 et 145.
- Firman, I.D. and Waller, J.M. (1977). Coffee berry disease and other Colletotrichum diseases of coffee; C.M.I. Kew, Surrey, Endgland, pp 53.
- Foucart, G. et Brion, L. (1963). La lutte contre les ennemis du caféier d'Arabie au Rwanda. Bull. d'Inf. de l'INEAC, XII, 1-6, p 141-152.
- Gahiro, L. (1991). Contribution à l'étude de l'antracnose et de la rouille orangée du caféier d'Arabie (Coffea arabica). Essais de criblage variétal pour la résistance. Faculté des Sciences Agronomiques du Burundi, Bujumbura, Mémoire de fin d'étude, pp 59.
- Hindorf, H. (1970). Colletotrichum spp. isolated from Coffea arabica L. in Kenya 77, p 328-331.
- ISABU (1990). Enquête sur la sévérité de l'antracnose du caféier (Colletotrichum coffeanum Noack) dans la SRD Kirimiro (1989-1990). ISABU, polycopié, pp 19.
- ISABU (1991). Programme café et programme défense des végétaux. ISABU, Rapport annuel 1989/90, pp 88.
- Lambot C. (1989). Le problème de la carence en zinc sur caféier Arabica au Burundi. ASIC, 13 ème colloque, Païpa, 1989, p 573-581.
- Mc.Donald, J. (1926). A preliminary account of a disease of green coffee berries in Kenya. Transactions of the British Mycological Society 11 : 145-154.
- Nutman, F.J. and Roberts, F.M. (1960). The stimulating effect of some fungicides on Glomerella cingulata in relation to the control of C.B.D. Ann. appl. Biol., 64, p 335-344.
- Perreaux, D. (1988). Maladies et Ravageurs In La culture du caféier d'Arabie au Burundi. Publication du Service Agricole n°14, AGCD, Bruxelles, p 144-165.
- Van Der Graaf, R.A. (1981). Selection of arabica coffee types resistant to coffee berry disease in Ethiopia. Department of Phytopathology. Agricultural University, Wageningen, The Netherlands, pp 110.
- Vincent, J.C. (1991). Innovation technologique et qualité. Un exemple d'amélioration spectaculaire : le café Arabica au Burundi. Asic, 14 ème Colloque, San Francisco, p 545-565.

RESUME

La carence en zinc apparait comme un problème majeur de la culture du caféier dans les régions du centre et de l'est du Burundi. Elle a une influence négative importante sur la qualité du café. Les essais entrepris sur l'étude de cette carence ont montré que dans certains cas il pouvait y avoir une interaction entre les traitements de correction et l'antracnose des fruits (Colletotrichum coffeanum Noack). Les symptômes et les dégâts provoqués par l'antracnose peuvent être fortement augmentés par les traitements de correction de la carence en zinc. Une recherche a ainsi été entreprise pour comprendre les mécanismes pouvant lier la correction de la carence en zinc par des applications foliaires et l'antracnose des fruits.

Les essais réalisés au laboratoire ont démontré que le sulfate de zinc, utilisé pour les pulvérisations foliaires possède un effet fongicide qui ralentit la croissance du champignon mais peut dans certains cas stimuler sa sporulation. Cette sporulation exacerbée provoquerait ainsi une augmentation de l'inoculum au champ, favorisant la propagation de la maladie.

Dans certains cas, la sensibilité des fruits provenant des caféiers traités par pulvérisation foliaire ou par application de zinc au sol peut paraître diminuée par rapport à celle des caféiers non traités. Mais cet effet bénéfique est probablement la résultante d'un développement plus rapide des fruits traités qui modifie temporairement leur sensibilité au champignon.

Dans les zones sensibles à l'antracnose, la réalisation des traitements de correction de la carence en zinc par pulvérisation foliaire est donc conditionnée par l'application simultanée d'un programme de lutte fongicide contre l'antracnose. En dehors d'une lutte fongicide associée aux traitements de correction de la carence en zinc, les applications de zinc au sol constituent la voie de traitement la plus réaliste. Elle est malheureusement plus difficile à réaliser que la voie foliaire, et plus lente à manifester ses effets bénéfiques sur la disparition des symptômes. Les modalités de son application sont encore à l'étude et devront être précisées même si les premiers résultats obtenus sont encourageants.

SUMMARY

Zinc deficiency has appeared as a major problem for coffee production in the central and eastern regions of Burundi where it has had an important detrimental impact on coffee quality. Trials of foliar zinc applications to alleviate this deficiency have been promising, but in certain cases, foliar zinc application has resulted in an increased incidence of anthracnose of the fruit (Colletotrichum coffeanum Noack). Research was begun to investigate the mechanisms linking foliar zinc treatment and anthracnose of the fruit.

Laboratory experiments showed that zinc sulfate applied as a foliar spray had a fungicidal effect that slowed the growth of anthracnose fungus but which also, in certain cases, stimulated sporulation. This sporulation would increase the fungal inoculum in the field, thus favoring the propagation of the disease.

In some cases, fruit from trees treated by foliar zinc spray or by the addition of zinc to the soil appeared less susceptible to anthracnose than fruit from untreated trees. However, this beneficial effect is probably the result of more rapid fruit development on the treated trees which temporarily modifies their sensitivity to the fungus.

In zones affected by anthracnose, the realization of a foliar zinc spray to correct zinc deficiency is thus conditional upon the simultaneous application of a fungicide against anthracnose. Other than this combined zinc-fungicide foliar application, the addition of zinc to the soil constitutes the most realistic treatment of zinc deficiency. Unfortunately soil application is more difficult to accomplish than foliar application, and it is slower to demonstrate beneficial effects in alleviating symptoms. Zinc application methods are being studied and should be refined even if the first results obtained are encouraging.

ÉTUDE DE LA VIRULENCE ET DE L'AGRESSIVITÉ D'ISOLATS D'*HEMILEIA VASTATRIX* BERK. ET BR. COLLECTÉS SUR *COFFEA CANEPHORA* et CATIMOR

F. HOLGUIN ¹, D. BIEYSSE ², A. ESKES ², R. MULLER ²

- (1) Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, Mexique. Thésard du CIRAD-CP, Montpellier, France
(2) Centre International de Recherches en Agronomie pour le Développement - Cultures Pérennes, Montpellier, France

1. INTRODUCTION

Les dégâts provoqués par la rouille orangée, maladie défoliante du caféier due à *Hemileia vastatrix* Berk. et Br., sont, d'une manière générale, surtout importants sur *Coffea arabica*. L'espèce *Coffea canephora*, dont on voit progressivement qu'elle constitue un groupe complexe, présente par sa nature allogame, une grande variabilité qui se traduit, entre autres, par l'existence de degrés très variés de sensibilité à ce pathogène allant jusqu'à la résistance totale. Cette espèce est considérée globalement comme une source de résistance.

L'étude de la génétique de la résistance de *C. arabica* conduite en particulier par le CIFC, Portugal (Rodrigues, 1975), a montré l'existence chez la plante, d'un système de cinq gènes majeurs de "sensibilité exclusive" désignés par SH1, SH2, SH3, SH4, SH5 correspondant gène pour gène aux gènes de virulence du pathogène v1, v2, v3, v4, v5.

En revanche, la connaissance de la génétique de la résistance de *C. canephora* est moins avancée. Peu de plantes différencielles ont été identifiées pour servir de base à l'étude des relations hôte-parasite chez cette espèce (Eskes, 1989). Cependant, grâce à l'hybride interspécifique entre les deux espèces, connu sous le nom d'Hybride de Timor, résistant jusqu'à aujourd'hui à toutes les races connues du pathogène, on peut penser que le *C. canephora* possède une série de gènes de sensibilité exclusive différents de ceux du *C. arabica*, et que l'on peut désigner par SH6, SH7, etc... L'introgression de ces gènes chez le *C. arabica* par croisement entre l'hybride de Timor et le Caturra a conduit à la création des Catimor qui constituent pour l'heure une solution pratique pour le contrôle de la maladie. Ce résultat global est loin d'apporter toutes les explications utiles à la compréhension de la résistance des canephora. De plus, les attaques repérées sur certains clones de *C. canephora* vulgarisés en Côte d'Ivoire font penser qu'une sélection de races du pathogène adaptées à ces génotypes s'est réalisée (Montagnon, 1993). En Ouganda et à Madagascar, des races d'*Hemileia vastatrix* adaptées aux variétés locales semblent apparaître.

Il est donc important d'approfondir les connaissances relatives aux mécanismes de résistance à la rouille orangée, du *C. canephora*. C'est l'objectif de ce travail qui se propose d'étudier la virulence et l'agressivité d'un certain nombre d'isolats d' *H. vastatrix* d'origine géographique variée, prélevés sur *C. canephora* et ses dérivés, et d'analyser leur expression chez les Catimor en vue de gérer de façon optimale les facteurs de résistance nouvellement identifiés.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. ETUDE DE LA VIRULENCE

2.1.1. Matériel végétal

Pour étudier les réactions différentielles, une gamme d'hôtes a été constituée : les caractéristiques des génotypes utilisés dans les plans d'inoculations sont brièvement indiquées dans le Tableau 1.

La race II d'*H. vastatrix* utilisée provient du CIFC. Les isolats "sauvages" ont été récoltés au champ dans différentes zones géographiques comme indiqué dans le Tableau 2. Les spores ont été prélevées sur des taches sporulantes soit *in situ*, soit sur feuilles cueillies au champ et rapportées au CIRAD-CP à Montpellier. Dans la mesure des disponibilités, l'isolat a été multiplié sur la plante sur laquelle il a été récolté. Si celle-ci n'était pas disponible, la multiplication a été effectuée sur des génotypes sensibles génétiquement proches de la plante mère, ou sur d'autres hôtes sensibles tels que *C. racemosa* et *C. arabica* Matari (β). Tous les isolats ont fait l'objet d'une purification (inoculum monopustulaire) et ont été conservés dans l'azote liquide.

2.1.2. Méthode d'inoculation

Les inoculations ont été réalisées par pulvérisation d'une suspension d'urédo-spores (1 mg/ml) sur des disques de feuilles souples et douces au toucher de 2 cm de diamètre. Une série de 11 inoculations et 2 répétitions de chaque combinaison génotype-isolat ont été réalisées. Lors de chaque inoculation deux témoins arabica, le Caturra amarillo et le Matari ont été utilisés.

2.1.3. Appréciation de la virulence

La désignation du type de réaction correspond à la description de l'échelle de 0 à 9 proposée par ESKES (1983).

- TR : Très Résistant, degrés 0 et 1, absence de sporulation,
- R : Résistant, degrés 2 et 3, absence de sporulation, légère décoloration
- MR : Moyennement Résistant, degrés 4 et 5, 50 % de taches sporulantes,
- MS : Moyennement Sensible, degrés 6 et 7, 50 à 95 % de taches sporulantes,
- S : Sensible, degrés 8 et 9, sporulation sur plus de 95 % des taches.

La lecture a été réalisée disque par disque tous les 3 - 4 jours et la note maximale a été retenue pour chaque inoculation. Le développement de certaines plantes comme *C. canephora* "Malangsari" et "Sumatra", n'ayant toujours pas permis de disposer d'un nombre suffisant de feuilles par individu au bon stade de sensibilité, chaque inoculation a comporté un mélange de feuilles de plusieurs plantes.

Tableau 1. Génotypes utilisés dans l'étude de la virulence.

GENOTYPE	PROVENANCE	REMARQUES ET BASE GENETIQUE (si connue)
<i>Coffea arabica</i>		
Caturra Amarillo	Colombie	Groupe E (SH5)
S1934	Indonésie	Descendance de S795. Possède SH3 (Kukhang,1991)
AB3	Indonésie	SH5
SA 41, 61 et 96	Indonésie	F2 (S1934 x AB3). SH3 ? 1 plante par descendance
-Matari, 849/1 -Dille&Alghe, 128/2 -DK 1/6, 32/1 -S288-23,33/1 -S286-7,35/2 -S12 Kaffa,635/2 -H. de T,1343/269 -H420/10 -Geisha,87/1 -S4 Agaro,110/5 -S12 Kaffa,635/3 -S353 4/5,34/13	CIFC PORTUGAL	Groupe β (SH ?) Groupe α (SH 1) Groupe D (SH 2,5) Groupe G (SH 3,5) Groupe G (SH 3,5) Groupe Y (SH 4) Groupe R (SH 6) Groupe I (SH 6,?) Groupe C (SH 1,5) Groupe J (SH 4,5) Groupe W (SH 1,4,5) Groupe H (SH 2,3,5)
<i>Coffea canephora</i>		
Clones107,126,181, 182,197,202,375	Cameroun	Sensibilité élevée ou variable à la rouille
Kouillou 35	Madagascar	Très sensible à la rouille
Kouillou 66-13	Brésil	Collection FAO
"Malangsari" et "Sumatra".	Indonésie	Descendances récoltées sur des plantes sensibles. 10 plantes testées par descendances.
Hybrides interspécifiques		
Congusta HA et HB	Madagascar	Hybrides entre <i>C.canephora</i> et <i>C.congensis</i>
Arabica Timor Timor	Indonésie	3 plantes issues d'une population locale semblable à l'hybride de Timor.
C41	Indonésie	Catimor T8660 (10 plantes testées)
C47	Indonésie	F7 d'une population CIFC 7960, 61, 62 et 63 (10 plantes testées)
Catimors T8658, T8664, T8667	Indonésie	Catimors F5 à F7 sélectionnés au Brésil (2 plantes du T 8658 et du T 8664, 4 plantes du T 8667)
T11670 et T16671	Indonésie	Catimors provenant de Colombie (7 plantes du T11670 et 6 plantes du T16671)
Catimor Random	Indonésie	Groupe de 9 plantes de Catimor.
Hybride de Timor	Indonésie	S2 issu de l'HDT 832/1 introduit du Brésil. Cinq plantes testées
<i>C.humilis</i> , <i>C.racemosa</i>	Côte d'Ivoire	Sensibles à toutes les races connues

Tableau 2 : Lieux de prélèvement et origine des isolats d'*H. vastatrix*

ISOLATS	LIEUX DE PRELEVEMENT ET DESIGNATIONS ORIGINALES	VARIETES D'ORIGINE
Rob107	Bingerville, Côte d'Ivoire	<i>C. canephora</i> clone 107
Rob197	"	<i>C. canephora</i> clone 197
RobBIN	"	Population de <i>C. canephora</i>
RobDIVO	DIVO, Côte d'Ivoire	"
AraGUI	Macenta, Guinée	Petite population de <i>C. arabica</i> au milieu de <i>C. canephora</i>
RobCAM	N'Kolbisson, Cameroun	<i>C. canephora</i>
ConHB	Madagascar	<i>C. congesta</i> clone HB
RobK35	Madagascar	Kouillou clone 35
IndCTR 1	Java, Indonésie	Catimor
IndCTR 2	Java, Indonésie	Catimor
IndUSDA	Sumatra, Indonésie	Variété de <i>C. arabica</i> d'Ethiopie
Race II	CIFC - PORTUGAL	Souche de référence

2.2. AGRESSIVITE DES ISOLATS D'*Hemileia vastatrix*

La mesure de l'agressivité d'une série d'isolats a été réalisée sur les génotypes Caturra amarillo (SH5) et Matari (SH?) 849/1 qui appartient au groupe de résistance β , tous les deux sensibles à la plupart des races de rouille. La quantité de spores disponibles pour quelques isolats étant très faible, la technique d'inoculation par dépôts de gouttes a été retenue car elle est très économe en spores. Les isolats utilisés ont été IndCTR1, IndCTR2, et IndUSDA provenant d'Indonésie, Rob197, RobDIVO, RobBIN, RobCAM et AraGUI provenant d'Afrique de l'ouest, et la race II fournie par le CIFC.

Chaque couple caféier-isolat a été évalué avec 21 disques provenant de plusieurs feuilles. Chaque disque a été inoculé avec deux gouttes. L'évaluation de l'intensité des symptômes a été faite avec l'échelle d'Eskes (cf. supra.) en faisant des relevés tous les deux jours du 10^{ème} jour après l'inoculation jusqu'au quarantième. Les paramètres utilisés dans cet essai pour évaluer l'agressivité ont été: le pourcentage d'infections réussies, la période de latence (nombre de jours pour arriver à 50% des taches sporulantes) et l'indice d'intensité de la maladie (I.I.M.) (LEGUIZAMON, 1983). Toutes les données ont été comparées par l'analyse de variance en utilisant un modèle totalement randomisé. La séparation des moyennes a été faite avec le test de Newman et Keuls au seuil de 5%.

3. RESULTATS

3.1. ETUDE DE LA VIRULENCE

L'ensemble des types de réactions observées est présenté dans le Tableau 3. Lors d'inoculations réalisées sur une population de plantes, différents types de réactions ont pu être enregistrés, ils sont indiqués de la façon suivante TR/MR par exemple.

3.1.1. Isolats provenant d'Afrique

On peut apprécier des réactions différentielles nettes entre les isolats et les génotypes de *C. canephora*, ce qui montre que chaque isolat possède un patrimoine de virulence particulier et qu'il peut être différencié par certains génotypes de *canephora*. Les isolats Rob107 et Rob197 sont les plus virulents, capables d'attaquer quatre génotypes de *C. canephora*. La sensibilité élevée des clones 107, 181 et 375 enregistrée au champ a été confirmée avec ces inoculations. Les différents génotypes de *C. canephora* sont apparus résistants à la race II. Seul le Robusta 181 présente une réaction moyennement sensible à l'égard de la race II. Aucun génotype des hybrides interspécifiques ou des Catimors ne s'est montré sensible aux isolats africains de *C. canephora*.

Sur les génotypes de *C. arabica* tous les isolats sauf ConHB et RobK35 ont provoqué des réactions de sensibilité sur Caturra et Matari. L'isolat Rob107 a provoqué une réaction de sensibilité sur SA96 et sur la plante différentielle du groupe C, indiquant qu'il porte le gène v1 de virulence. Une réaction type TR ou R a été obtenue sur le différentiel du groupe G.

Tous les isolats d'Afrique ont provoqué des réactions de sensibilité sur *Coffea humilis* et sur *C. racemosa*.

3.1.2. Isolats provenant de Madagascar.

L'isolat ConHB attaque les clones de Congusta HA et HB et quelques clones de *C. canephora* (Tableau 3). Les types de réaction sur *C. arabica* indiquent que les isolats ConHB et RobK35 sont avirulents sur Caturra Amarillo. Sur Matari l'isolat ConHB a provoqué des réactions MS. Cela révèle que ces deux isolats n'ont pas le gène v5 de virulence. Les plantes d'hybrides de Timor et Catimor donnent toutes des réactions de résistance. *C. humilis* et *C. racemosa* sont sensibles à ces isolats.

3.1.3. Isolats provenant d'Indonésie.

En ce qui concerne l'isolat IndUSDA, il a provoqué des réactions de sensibilité sur certaines clones de *C. canephora* : sur le clone 107 une réaction S, et sur les clones 181 et 375 une réaction MS. Cet isolat a produit des réactions TR ou R sur les Catimors testés, une réaction S sur Caturra Amarillo, Matari et AB3. Sur la plante différentielle du groupe C il a provoqué des réactions S, ce qui signale la présence du gène v1 de virulence. Il a entraîné des réactions S sur SA41 et SA96, et TR sur S1934.

Les isolats IndCTR1 et IndCTR2 ont provoqué des réactions du type MS sur le clone 107 et IndCTR1 des réactions S sur le clone 181 et MS sur le clone 375. L'isolat IndCTR2 a produit une réaction MR sur le clone 182. Ces isolats ont provoqué des réactions MR avec une légère sporulation sur le Congusta HB.

L'isolat IndCTR1 a provoqué des réactions type MS sur quelques plants Catimor Random Indonésie (CRI) et sur le Catimor T8667. Sur le Catimor T11670 (4.4)Y, il a produit une réaction MR. L'isolat IndCTR2 a provoqué des réactions S sur les Catimors random, T8667, sur la plante 152 de T11670, et des réactions type MS sur la plante 241 de T16671 et de type MR sur la plante 637 de T16671. Ces résultats indiquent que IndCTR2 est toutefois plus virulent sur des Catimor et l'Hybride de Timor.

Tableau 3. Type de réaction obtenu avec les isolats de différentes origines géographiques sur les différents génotypes de caféiers.

GENOTYPES	ISOLEMENTS											
	AFRIQUE					MADAG.			INDONESIE			CIFC
	ROB DIVO	ROB BIN	ROB CAM	ROB 197	ROB 107	ARA GUI	CON HB	ROB K35	IND USDA	IND CTR1	IND CTR2	RaceII
<i>C. canephora</i>												
107	TR	S	MS	S	S	S	R	TR	S	MS	MS	R
181	R	MR	MS	MS	MS	S	S	S	MS	S	*	MS
375	*	MR	R	*	MS	R	S	*	MS	MS	*	*
197	TR	TR	TR	S	S	TR	TR	*	TR	TR	TR	TR
182	TR	R	R	MS	R	R	TR	TR	TR	TR	MR	TR
MALANGSARI	TR	TR	MR	TR	TR/R	TR/MR	TR/R	*	TR/R	TR	*	TR
INDONESIE	*	*	TR	TR	TR/S	TR	*	TR	TR	TR	TR	TR
126	R	*	TR	*	MR	TR	*	*	*	*	*	R
202	*	TR	*	TR	R	TR	TR	*	TR	TR	*	TR
C66-13	R	R	R	*	MR	TR	R	*	*	*	*	R
SUMATRA	*	*	TR	TR	*	TR	*	TR	TR	TR	TR	TR
Hybrides interspécifiques												
HA	TR	TR	R	TR	R	TR	S	*	R	R	*	TR
HB	TR	TR	TR	R	R	TR	S	*	R	MR	MR	TR
H. DE TIMOR	TR	TR	TR	TR	TR/R	TR	TR	TR	TR/R	TR/R	TR/S	TR
AET	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR	*	TR
Catimors												
CRI	TR	TR	TR	TR/R	TR/R	TR	TR	TR	TR/MR	TR/MS	TR/R/S	TR/MR
C41	TR	TR	TR	*	TR/R	*	TR	TR	TR	TR/R	TR/R	TR
C47	TR	TR	TR	*	TR	*	TR	TR	TR	TR	TR	TR
T5269	*	TR	TR	*	TR	*	TR	TR	TR	TR	*	TR
T8658	*	TR	*	TR	TR	TR	TR	*	TR	TR/R	TR/R	TR
T8664	TR	TR/R	TR/R	*	*	*	TR	TR	TR	TR/R	TR/S	TR
T8667	TR	TR	TR	TR	TR/R	TR	TR	TR	TR/MR	TR/S	TR/S	TR/MS
T11670(4.4)Y	TR	TR	*	TR	TR	TR	TR	*	TR	TR/MR	*	TR/R
T11670	*	*	*	TR	TR	TR	TR	*	TR	TR	TR/S	TR
T16671	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR	TR/MS	TR
<i>C. arabica</i>												
Caturra Ao.	S	S	S	S	S	S	TR	TR	S	S	S	S
Gpe. α	*	*	*	TR	*	*	TR	*	*	*	S	*
Gpe. β	S	S	S	S	S	S	MS	R	S	S	S	S
Gpe. C	TR	R	TR	TR	S	R	TR	TR	S	S	S	TR
Gpe. G	TR	TR	R	TR	TR	TR	TR	TR	TR	S	*	TR
Gpe. H	*	*	TR	*	*	TR	*	*	TR	*	*	*
AB3	*	S	*	S	S	S	*	*	S	S	S	S
S1934	*	*	*	TR	TR	TR	*	*	TR	S	*	TR
SA 41	*	*	*	TR	TR	TR	*	*	S	S	*	TR
SA 61	*	*	*	*	*	*	*	*	*	S	*	*
SA 96	*	*	*	*	S	*	*	*	S	S	*	*
Coffea sp.												
<i>C. humilis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>C. racemosa</i>	S	S	S	S	S	S	S	MS	S	S	S	S

S = sensible MS = moyennement sensible MR = moyennement résistant R = résistant TR = Très résistant
* = Absence de confrontation

Sur la série de *C. arabica* inoculée, ces isolats provoquent des réactions type S sur Caturra amarillo et Matari. L'isolat IndCTR1 produit des réactions de type S sur les plantes différentielles des groupes G et C, indiquant qu'il possède les gènes v1 et v3 de virulence au moins. L'isolat IndCTR1 a provoqué aussi des réactions de sensibilité sur les génotypes S1934, SA41, SA61, SA96, et sur AB3. Sur le groupe d'hybrides de Timor cet isolat a donné de réactions type TR. Enfin l'isolat IndCTR2 a provoqué des réactions de sensibilité sur les plants différentiels G, C, D, α et J, indiquant qu'il possède les gènes de virulence v1, v2, v3, et v4 au moins. IndCTR2 induit des réactions type R sur le génotype SA41. On a observé qu'il est virulent sur le groupe différentiel 1 (résultats non montrés dans le tableau), qui est attaqué seulement par la race XXIX qui a entre autres le gène de virulence v6. Cependant l'isolat IndCTR2 n'a pas attaqué le différentiel du groupe R (SH6). Ce type de comportement a déjà été observé avec des isolats collectés sur des Catimors en Inde, et il a été conclu qu'il s'agissait d'une nouvelle race (Varzea, 1989). Le plus notable de l'isolat CTR2 est qu'il provoque des réactions de type S sur quelques plantes de l'hybride de Timor, ce qui laisse supposer une nouvelle race possédant une charge en gènes de virulence très large.

3.2. ETUDE DE L'AGRESSIVITE

3.2.1. Pourcentage d'infections réussies.

Les isolats ont entraîné des pourcentages d'infection significativement différents sur les deux génotypes Caturra amarillo et Matari (Tableau 4). La variété Caturra amarillo présente dans presque tous les cas, excepté avec les isolats IndCTR1 et IndUSDA, une fréquence d'infection significativement supérieure à la fréquence d'infection observée sur le génotype Matari. Les différences les plus importantes sont notées entre le Caturra Amarillo et le Matari avec les isolats d'origine africaine, tout particulièrement l'isolat RobCAM et l'isolat Rob197 où la différence atteint 54 %. Sur le génotype Caturra, la fréquence d'infection varie de 100 % à 76,14 % soit un étalement des valeurs de 23,86 % alors que sur Matari l'écart entre les valeurs est de 69 %.

3.2.2 Période de latence.

Les périodes de latence enregistrées avec les différents isolats sur Caturra amarillo forment 5 groupes distincts significativement différents. Les isolats IndUSDA, IndCTR1, IndCTR2, induisent la période de latence la plus courte comprise entre 16 et 18,5 jours, tandis que la plus longue est de 33,17 jours avec l'isolat Rob197 (Tableau 5).

Avec le caféier Matari, deux groupes seulement sont différenciés, le premier avec une période de latence de 17,67 à 21,33 jours et le second avec une période de latence de 27,67 à 32,17 jours.

Le classement des deux génotypes à l'aide de la période de latence est identique pour chaque isolat, mais en général la période de latence est plus courte sur le Caturra amarillo.

3.2.3 Index d'intensité de la maladie.

L'I.I.M. détermine très nettement deux groupes (Tableau 6), les isolats IndUSDA, IndCTR1, IndCTR2, et RaceII qui se traduisent par de fortes attaques sur les deux génotypes, et les autres isolats induisant les réactions d'une sensibilité moyenne. L'interaction isolat-génotype est très forte. Sur le Caturra amarillo, l'intensité minimum a été de 0,48 avec l'isolat RobCAM alors qu'elle est seulement de 0,18 avec l'isolat 197 sur Matari.

Tableau 4 : Pourcentage d'infections réussies de 8 isolats d'*Hemileia vastatrix* inoculés sur *Coffea arabica* var. Caturra Amarillo et Matari.

Isolat	Caturra Ao.	Matari	Différence ²
IndUSDA	97,57 ab ¹	88,33 ab	NS
IndCTR1	100 a	95,14 a	NS
IndCTR2	95,14 ab	80,67 abc	*
Race II	97,57 ab	66,57 bc	*
RobBIN	97,57 ab	57,00 c	**
RobDIVO	90,43 ab	59,57 c	**
RobCAM	76,14 b	26,14 d	**
Rob197	80,86 ab	26,14 d	**
Moyennes	91,91 A	62,37 B	**

¹ Les lettres différentes indiquent des différences significatives entre isolats par génotype au seuil de 5% selon le test de Newman et Keuls.

² Différences significatives entre variétés.

Tableau n°5 : Période de latence de 8 isolats d'*Hemileia vastatrix* inoculés sur *Coffea arabica* var. Caturra Amarillo et Matari.

Isolat	Caturra Ao	Matari	Diff ²
IndUSDA	16,00 a ¹	17,67 a	**
IndCTR1	18,17 a	19,33 a	NS
IndCTR2	18,50 a	21,33 a	*
Race II	22,33 b	27,67 b	*
RobBIN	26,33 c	28,67 b	*
RobDIVO	30,00 d	28,67 b	NS
Rob197	33,17 e	32,17 b	NS
RobCAM	29,67 d	30,60 b	NS
Moyenne	24,27 A	25,76 B	*

¹ Les lettres différentes indiquent des différences significatives entre isolats par génotype au seuil de 5% selon le test de Newman et Keuls.

² Différences significatives entre variétés.

Tableau 6 : Indice d'intensité de la maladie obtenu en inoculant 8 isolats d'*Hemileia vastatrix* sur *Coffea arabica* var. Caturra Amarillo et Matari.

ISOLAT	Caturra Ao	Matari	Diff
IndUSDA	0.98 a	0.88 a	*
IndCTR1	1.00 a	0.95 a	NS
IndCTR2	0.93 a	0.77 ab	*
Race II	0.91 a	0.61 bc	*
RobBIN	0.78 b	0.42 c	***
RobDIVO	0.64 c	0.45 c	**
RobCAM	0.48 d	0.20 d	**
Rob197	0.53 cd	0.18 d	**
Moyenne	0.78 A	0.56 B	**

Les lettres différentes indiquent des différences significatives au seuil de 5% selon le test de Newman et Keuls.

En règle générale, dans les confrontations isolats/génotypes, le classement par ordre d'agressivité croissante des isolats sur les deux génotypes est le suivant :

IndUSDA, IndCTR1, IndCTR2, RaceII, RobBIN, RobDIVO, RobCAM, Rob197.

A l'intérieur de ce classement, trois groupes d'isolats apparaissent.

Groupe 1 : IndUSDA, IndCTR1, IndCTR2 ; quel que soit le critère considéré, ce groupe s'est révélé le plus agressif. Ces trois isolats sont originaires d'Asie et récoltés sur USDA 62 et Catimors.

Groupe 2 : Race II . Cette race forme un groupe intermédiaire corrélé, selon le critère analysé au groupe 1 le plus agressif ou au groupe 3 le moins agressif.

Groupe 3 : RobBIN, RobDIVO, RobCAM, Rob197 ; ces isolats sont les moins agressifs sur les deux génotypes.

DISCUSSION GENERALE

Dans la gamme d'hôtes étudiée représentant 40 génotypes, les isolats d'Indonésie prélevés sur les Catimors se sont révélés les plus virulents car ils ont induit des réactions de sensibilité avec sporulation dans 50 % des combinaisons testées. Ce groupe est suivi par les isolats prélevés sur *C.canephora* avec 23 % de combinaisons sensibles et enfin le groupe d'isolats issus de Congusta donnant seulement 12 % de combinaison sensibles.

Cela signifie que les isolats indonésiens possèdent un ensemble de gènes très large comportant v5 associé à des gènes supplémentaires v6 ? v7 ? v8 ? v9 ? conférant à ces isolats un très large spectre de virulence. Ce résultat est en accord avec les analyses des nouvelles races décrites par RODRIGUES (1993) et récoltées sur Catimor en Inde où de nouvelles races ont été décrites.

A l'intérieur de cette analyse globale des réactions de virulence, on peut mettre en évidence une adaptation très forte des isolats corrélés à leur origine de prélèvement. Ainsi, les isolats originaires de Madagascar attaquent uniquement les Congusta sur lesquels ils ont été prélevés, le caféier Matari, deux clones de canephora, et les deux espèces *C. humilis* et *C. racemosa*. Aucun des Catimors testés ne présente de symptômes de sensibilité vis-à-vis de ces isolats. De la même façon, les isolats issus des *C. canephora* induisent des réactions de résistance sur les Catimors et le groupe d'hybrides interspécifiques.

Il est vraisemblable que les systèmes de gènes de virulence aient évolué localement en fonction des génotypes présents dans une zone géographique, les supports génétiques disponibles entraînant la diversification du pathogène et cette spécialisation, comme cela a été évoqué par MULLER (1985). Par ailleurs ces résultats mettent en évidence une relation différente entre virulence et agressivité selon l'origine des isolats. Les isolats d'Indonésie définis comme étant les plus virulents sont aussi les plus agressifs. En revanche les isolats originaires d'Afrique qui possèdent moins de gènes de virulence se sont montrés moins agressifs. Il existe vraisemblablement une spécificité et une adaptation des gènes de virulence. Les isolats indonésiens ont apparemment développé, par mutations successives, un jeu de gènes de virulence très large et plus pathogène car confrontés en plantation à des génotypes de type Catimor présentant une large gamme de gènes de résistance dont l'efficacité a été surmontée (MULLER, 1984).

CONCLUSION

Cette étude des relations hôte/parasite montre, comme cela avait été suggéré par Berthaud, 1982, puis Montagnon, 1993, l'existence de races différentes de la race II attaquant *C. canephora*. Ces races peuvent être identifiées à l'aide de plantes différentielles sur lesquelles les isolats ont été prélevés.

Par ailleurs, elle permet de dire que les isolats provenant d'Indonésie sont plus virulents que les isolats originaires de Madagascar et d'Afrique. De plus, les isolats attaquant les Catimors peuvent attaquer *C. canephora*, mais les isolats pathogènes sur *C. canephora* ne le sont pas sur Catimors.

L'agressivité élevée constatée chez les isolats prélevés sur les Catimors, semble corrélée avec leur charge en gènes. Cette observation est différente de celle décrite par FAGIOLI et al, pour le système *H. vastatrix/Coffea arabica* où l'agressivité était inversement corrélée au nombre de gènes présents chez le parasite.

La diversité génétique de l'hôte semble, comme on pouvait le craindre, engendrer la diversification du pathogène ce qui rend précaire la résistance spécifique et ce d'autant plus que comme il vient d'être dit, l'agressivité semble pour les races du pathogène adaptées aux Canephora, fonction du nombre de gènes de virulence.

Existe-il d'autres relations virulence/agressivité dans le complexe isolats de Catimor/*C. arabica*/*C. canephora* ?

Ces premiers résultats ne permettent pas de répondre de façon définitive mais ces nouvelles relations feront l'objet d'une étude plus approfondie.

BIBLIOGRAPHIE

- BERTHOUD J., LOURD M., 1982. La résistance à *Hemileia vastatrix* des caféiers de l'espèce *Coffea canephora* de Côte d'Ivoire. Etude de la transmission de ce caractère par croisements contrôlés. *Garcia de Orta*, 9(1-2), 89-96. Lisboa.
- ESKES, A. B., 1989. Resistance. In: *Coffee rust: Epidemiology, Resistance, and Management*. A. C. Kushalappa and A. B. Eskes (Ed's.). CRC Press, Florida. pags. 171-291.
- ESKES, A. B. 1991. Breeding for durable resistance of arabica coffee to coffee rust (*Hemileia vastatrix*). Final consultancy report of two missions carried out in Indonesia. IRCC/CIRAD. 46 p.
- FAGIOLI G., BERRY D., BIEYSSE D., 1990. Recherche sur la résistance incomplète à *Hemileia vastatrix* Berk et Br. dans un groupe de géotypes de *Coffea arabica* d'origine éthiopiennes. *Café, Cacao, Thé*, vol. XXXIV, n°2, avril-juin.
- KUKHANG, T. 1991. Etude du gène de résistance spécifique SH3 et évaluation de la résistance à la rouille orangée (*Hemileia vastatrix* Berk.et Br.) chez les caféiers (*Coffea* spp.) hybrides interspécifiques. DEA "Biologie et Agronomie". Université de Rennes I, ENSA de Rennes. 35 p.
- LEGUIZAMON, C. 1983. Contribution à la connaissance de la résistance incomplète du caféier à *Hemileia vastatrix*. Thèse 3ème cycle, 183 p. USTL, Montpellier.
- MONTAGNON, C. et T.LEROY. 1993. Résultats récents sur la résistance de *Coffea canephora* à la sécheresse, la rouille orangée et au scolyte des branchettes en Côte d'Ivoire. 15ème Colloque Scientifique International sur le Café. Résumés. Montpellier. ASIC (Paris).
- MULLER, R.A. 1984. Quelques réflexions à propos de la sélection de variétés de caféiers résistants à la rouille orangée (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.). *Café, Cacao, Thé*, vol. XXVIII, n°1, janv-mars 1984.
- MULLER, R.A. 1985. Quelques idées relatives au problème de la sélection de variétés de caféier résistantes à la rouille orangée (*Hemileia vastatrix* B.et Br. 11ème Colloque Scientifique International sur le Café. Lomé. ASIC (Paris). pags. 615-623.
- RODRIGUES JR., C. J., A. J. BETTENCOURT, and LUISETTE RIJO. 1975. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. *Annu. Rev. Phytopathol.* 13:49-65.
- RODRIGUES JR., C.J.; V.M.P. VARZEA; I.L. GODINHO; S. PALMA and R.C. RATO. 1993. New physiologic races of *Hemileia vastatrix*. 15ème Colloque Scientifique International sur le Café. Résumés. Montpellier. ASIC (Paris).
- VARZEA, V.; C.J. RODRIGUES JR.; J.E.DO PASSO and S. PALMA. 1989. New rust genotypes and a new coffee genotype in Catimor 45. 13ème Colloque Scientifique International sur le Café. Paipa. ASIC (Paris), 745-748.

RESUME: ETUDE DE LA VIRULENCE ET DE L'AGRESSIVITE D'ISOLATS D'*Hemileia vastatrix* COLLECTES SUR *Coffea canephora* ET CATIMOR.

En général il existe peu d'information sur les relations entre races d'*Hemileia vastatrix* et génotypes de *Coffea canephora*. L'objectif de ce travail était d'étudier le comportement de quelques isolats collectés sur *C. canephora* en Afrique (Cameroun, Côte d'Ivoire, Guinée), sur Congusta et Kouillou à Madagascar et sur Catimor (Caturra Amarillo X Hybride de Timor) en Indonésie.

Les isolats d'Afrique ont provoqué des réactions de sensibilité sur certains clones de *C. canephora*, sur *C. arabica* cv. Caturra amarillo et Matari, mais pas sur les génotypes de Congusta et de Catimor.

Les isolats de Madagascar attaquent également certains clones de *C. canephora* mais ne se développent pas sur Caturra Amarillo. Les isolats provenant d'Indonésie attaquent Caturra Amarillo et Matari, plusieurs Catimors et quelques génotypes de *C. canephora*. Un de ces isolats a sporulé sur quelques plantes descendantes de l'Hybride de Timor 832/1. Les isolats prélevés sur *Canephora* sont moins agressifs et plus variables que ceux prélevés sur Catimor, lorsqu'ils sont inoculés sur Caturra Amarillo et Matari. Pour les isolats adaptés au *C. canephora* et ses dérivés, l'agressivité croissante paraît corrélée à l'accumulation de gènes de virulence contrairement au phénomène observé sur *C. arabica*.

ABSTRACT: VIRULENCE AND AGGRESSIVENESS STUDY OF *Hemileia vastatrix* ISOLATES FROM *C. canephora* AND CATIMOR.

In general, there is few information about *H. vastatrix* races attacking *C. canephora* genotypes. This paper objective was to study the behaviour of several african isolates collected on *C. canephora* (Cameroun, Ivory Coast, Guinea), on Congusta and Kouillou from Madagascar, and on Catimor (Caturra Amarillo X Hybride of Timor) from Indonesia. The african isolates provoked sensibility reactions on certain *C. canephora* clones from Ivory Coast, on *C. arabica* cv. Caturra Amarillo and Matari, but not on the Congusta and Catimors genotypes. The Madagascan isolates also attacked certain *C. canephora* clones, but were avirulent to Caturra Amarillo. The Indonesian isolates show a very broad virulence spectrum, attacking Caturra Amarillo, Matari, several Catimors, some *Canephora* genotypes, and, in one case, a few plants descending from Hybrid of Timor 832/1. We have found that isolates collected from *C. canephora* in Africa are less aggressive and more variable than isolates collected on Catimors in Indonesia, when they were inoculated on Caturra Amarillo and on Matari. The increasing aggressiveness of the isolates adapted to *C. canephora* and its related hybrids seems to be in relation with the accumulation of genes of virulence, in opposition with the phenomenon observed on *C. arabica*.

RESUMEN: ESTUDIO DE LA VIRULENCIA Y DE LA AGRESIVIDAD DE AISLAMIENTOS DE *Hemileia vastatrix* COLECTADOS SOBRE *C. canephora* Y CATIMOR.

En general existe poca información acerca de las razas de *H. vastatrix* que atacan genotipos de *C. canephora*. El objetivo de este estudio fué estudiar el comportamiento de varios aislamientos provenientes de Africa (Camerún, Costa de Marfil y Guinea) colectados sobre *C. canephora*, de Madagascar colectados sobre Congusta y Kouillou y de Catimor en Indonésia. Los aislamientos de Africa provocaron reacciones de susceptibilidad sobre ciertos clones de *C. canephora*, sobre *C. arabica* cv. Caturra Amarillo y Matari, pero no infectaron a los genotipos de Congusta y de Catimor. Los aislamientos provenientes de Madagascar atacaron igualmente ciertos clones de *C. canephora*, pero no se desarrollaron sobre Caturra Amarillo. Los aislamientos de Indonésia atacaron a Caturra Amarillo y a Matari, a varios Catimores y a algunos genotipos de *canephora*. Uno de estos aislamientos esporuló sobre algunas plantas descendientes del Híbrido de Timor 832/1. Se encontró que los aislamientos colectados sobre *C. canephora* en Africa fuéron menos agresivos y más variables, cuando fuéron inoculados sobre Caturra Amarillo y sobre Matari. Los aislamientos adaptados a *C. canephora* y sus derivados muestran una mayor agresividad que parece estar correlacionada con la acumulación de genes de virulencia, que es opuesto al fenómeno observado sobre *C. arabica*.

DÉVELOPPEMENT DE LA ROUILLE ORANGÉE (*HEMILEIA VASTATRIX*) DANS UNE PLANTATION DU SUD-OUEST DU GUATEMALA ET ÉVALUATION DES DÉGÂTS QU'ELLE PROVOQUE

J. AVELINO¹, J. C. TOLEDO², B. MEDINA³

¹ Phytopathologiste CIRAD-CP/France, ² Phytopathologiste ANACAFE/Guatemala,
³ Ingénieur Agronome ANACAFE/Guatemala

1. INTRODUCTION:

Un diagnostic de la situation phytopathologique de la caféiculture guatémaltèque effectué fin 1989 montre que la rouille orangée provoquée par *Hemileia vastatrix* est la maladie foliaire la plus importante en dessous de 1000 m d'altitude (tableau 1). A de plus hautes altitudes elle devient négligeable et d'autres champignons tels que *Mycena citricolor* et *Phoma costarricensis* sont plus importants. On considère qu'environ 35 % de la caféiculture du Guatemala est touchée par la maladie, soit à peu près 90 000 hectares. Le coût potentiel des 3 pulvérisations annuelles d'oxychlorure de cuivre, recommandées dans la lutte contre la rouille orangée au Guatemala, s'élèverait à environ 2 millions de dollars américains par an (3). Actuellement, la caféiculture centraméricaine passe par une crise sans précédent, due en grande mesure à la chute des cours mondiaux du café. En réaction à cette crise, la tendance est de réduire au maximum les coûts de production, en particulier les coûts dus à la lutte phytosanitaire et donc à la rouille orangée.

Deux points principaux ont conduit à penser qu'une meilleure connaissance du développement de la maladie et des dégâts qu'elle provoque dans les conditions du Guatemala était nécessaire. D'une part, il existe des doutes sur la nuisibilité de la rouille orangée dans la région. En effet, depuis son introduction au Guatemala en 1980, rarement on a pu voir des dégâts clairement imputables à ce champignon, rien de comparable en tout cas à ce qui a pu être observé au Sri Lanka où elle détruisit la caféiculture de l'île au siècle dernier, ou même dans certaines zones du Brésil ou de la Colombie. D'autre part, c'est sans doute la lutte chimique qui sera encore la plus répandue dans les années à venir. En effet, bien qu'on dispose de Catimors, variétés résistantes, la faible disponibilité de semences, les problèmes qu'ils semblent présenter dans certaines zones écologiques particulières, le coût que représente le remplacement d'une variété, et la réticence qui en découle de la part de quelques associations nationales de recherche à les recommander, font que leur emploi ne semble pas pouvoir se généraliser encore.

TABEAU 1: DIAGNOSTIC DE LA SITUATION PHYTOPATHOLOGIQUE DE LA CAFEICULTURE GUATEMALTEQUE AU COURS DU DERNIER TRIMESTRE DE 1989

ALTITUDE DE LA PLANTATION (en m)	DEPARTEMENT	DATE DE L'ECHANTILLONNAGE	MALADIE FOLIAIRE N°1	MALADIE FOLIAIRE N°2
1680	Santa Rosa	02/10/89	<u>Cercospora spp.</u>	<u>Phoma costarricensis</u>
1610	Chimaltenango	08/11/89	<u>Cercospora spp.</u>	<u>Phoma costarricensis</u>
1610	Chimaltenango	08/11/89	<u>Corticium koleroga</u>	<u>Mycena citricolor</u>
1525	Guatemala	03/11/89	<u>Mycena citricolor</u>	<u>Phoma costarricensis</u>
1510	Guatemala	02/10/89	<u>Mycena citricolor</u>	<u>Phoma costarricensis</u>
1490	Sacatepequez	07/09/89	<u>Cercospora spp.</u>	<u>Hemileia vastatrix</u>
1465	Quetzaltenango	13/12/89	<u>Cercospora spp.</u>	<u>Phoma costarricensis</u>
1450	Santa Rosa	04/10/89	<u>Cercospora spp.</u>	<u>Colletotrichum spp.</u>
1070	Santa Rosa	03/10/89	<u>Hemileia vastatrix</u>	<u>Cercospora spp.</u>
1050	Santa Rosa	04/10/89	<u>Hemileia vastatrix</u>	<u>Cercospora spp.</u>
990	San Marcos	11/10/89	<u>Hemileia vastatrix</u>	<u>Cercospora spp.</u>
915	Quetzaltenango	13/12/89	<u>Hemileia vastatrix</u>	<u>Cercospora spp.</u>
915	San Marcos	14/12/89	<u>Hemileia vastatrix</u>	<u>Corticium koleroga</u>
870	Chimaltenango	07/11/89	<u>Hemileia vastatrix</u>	<u>Cercospora spp.</u>
855	San Marcos	12/10/89	<u>Corticium koleroga</u>	<u>Cercospora spp.</u>
790	Retalhuleu	26/09/89	<u>Hemileia vastatrix</u>	<u>Capnodium sp.</u>
595	Retalhuleu	26/09/89	<u>Cercospora spp.</u>	<u>Hemileia vastatrix</u>
580	Retalhuleu	27/09/89	<u>Hemileia vastatrix</u>	<u>Cercospora spp.</u>
520	San Marcos	12/12/89	<u>Hemileia vastatrix</u>	<u>Cercospora spp.</u>
335	Escuintla	07/11/89	<u>Hemileia vastatrix</u>	<u>Cercospora spp.</u>

2. MATERIELS ET METHODES:

2.1. Localité:

L'étude suivante a été menée sur le versant pacifique de la Sierra Madre, plus exactement sur la plantation "La Libertad", dépendant de la municipalité de Colomba, dans le département de Quetzaltenango, dans le Sud-Ouest du Guatemala. La zone écologique où se trouve cette plantation est très favorable à la rouille orangée: altitude de 720 m et pluviométrie en général supérieure à 3000 mm (4000 mm en 1990; 2700 mm en 1991).

2.2. La plantation:

La plantation sur laquelle a été monté cet essai est un modèle de caféiculture moderne dans la région. Il s'agit d'une jeune caféière établie en 1986 avec une variété de caféier naine, un Catuai rouge. La densité de plantation est élevée, environ 5000 plants par hectare. Le sol, d'origine volcanique, pauvre en matière organique, très fragile, fait l'objet d'une attention particulière: courbes de niveaux, barrières vives et fossés recueillant la matière organique, amendements et fertilisations, ombrage de Légumineuses (*Inga spp.*). La lutte phytosanitaire n'est pas non plus négligée.

2.3. Méthodologie:

2.3.1. La parcelle expérimentale:

Les observations ont été menées à partir de mars 1990, sur 50 arbres répartis de façon aussi systématique que possible sur 2 parcelles contigües d'environ 0.7 ha chacune. Il y a 25 plants marqués par parcelle. L'une de ces parcelles ne reçoit pas de fongicides. Sur l'autre 4 et 5 pulvérisations d'un produit contenant 10 % de cyproconazole à une concentration d'emploi de 0.06 % ont été effectuées respectivement en 1990 et 1991.

2.3.2. Les observations:

Les observations ont été réalisées sur 6 branches par arbre, marquées en début de saison (2 en bas, 2 au milieu, 2 en haut) dans des directions différentes.

Un entre-noeud court qui naît chaque année pendant la saison sèche permet de séparer les feuilles en 2 catégories suivant leur âge. Les feuilles âgées, peu actives physiologiquement, sont situées avant cet entre-noeud court. D'un point de vue épidémiologique, elles portent l'inoculum primaire responsable des premières infections sur les feuilles jeunes. C'est sur ces dernières feuilles que se développe l'épidémie qui nous intéresse (1).

Sur les rameaux marqués, chaque feuille est identifiée (4). Les observations mensuelles de ces branches permettent de mettre en évidence la présence de nouvelles feuilles, la chute de feuilles saines ou malades, et la présence de feuilles nouvellement infectées. Un comptage de fruits sur les branches marquées a aussi été effectué mensuellement. Les plants sont finalement récoltés individuellement.

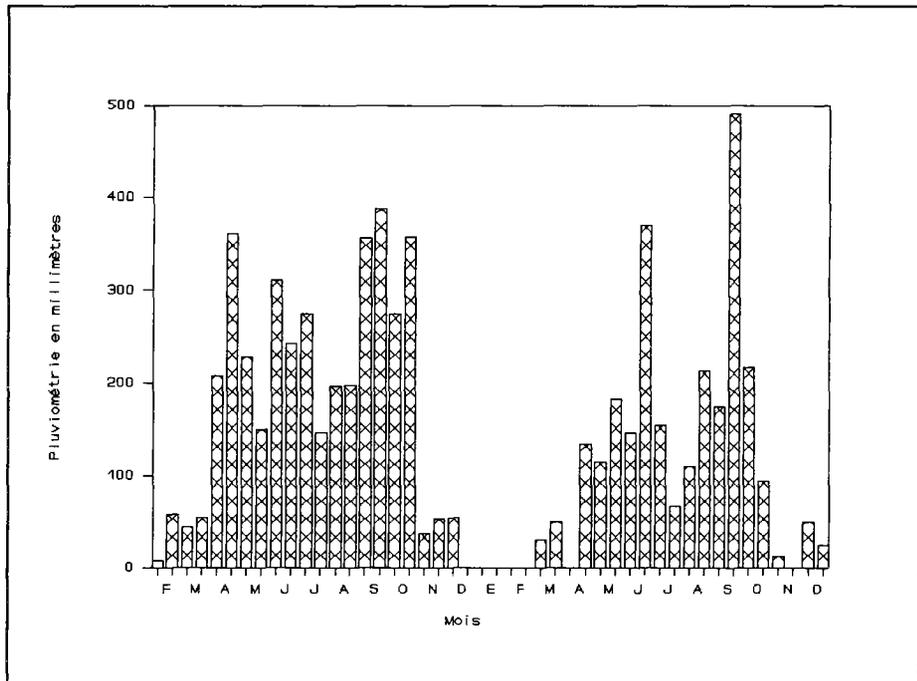
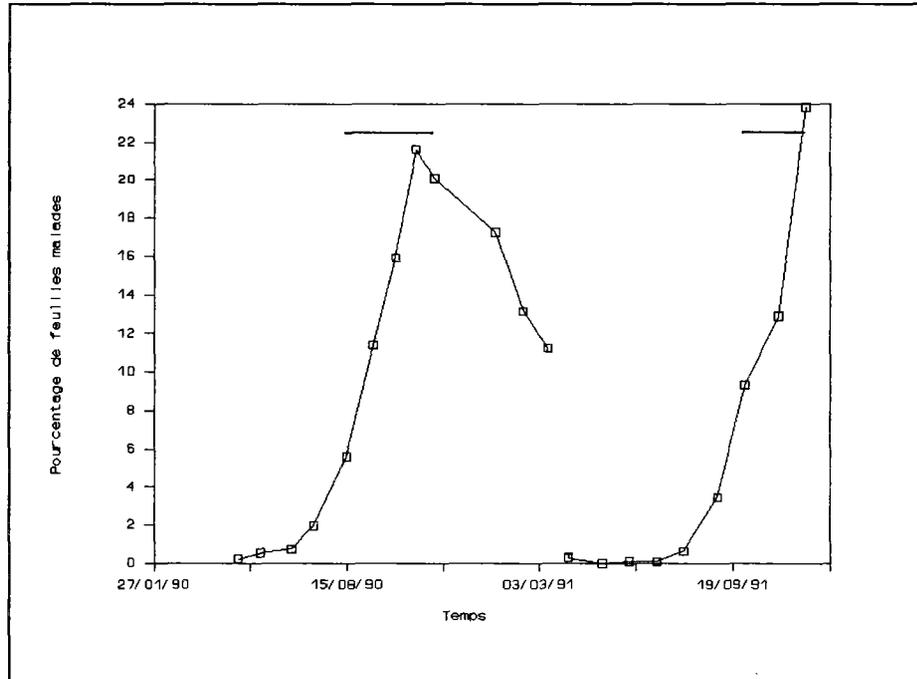
Un pluviomètre installé à proximité de la parcelle permet d'obtenir les données de pluviométrie.

3. RESULTATS ET DISCUSSION:

3.1. Développement de la maladie:

La figure 1 montre le développement de la rouille orangée sur les 25 plants qui n'ont pas reçu de fongicide au cours des années 1990 et 1991. L'épidémie commence son développement environ 2 mois avant la collecte des fruits, croît rapidement pendant cette période et atteint son maximum en fin de récolte. Une situation similaire avait déjà été trouvée au Mexique (1). Le développement de l'épidémie est donc globalement tardif. La maladie s'est toujours développée après le mois de mai (fin juin en 1990, fin juillet en 1991). Or les recommandations locales préconisent de débiter les pulvérisations aux alentours des mois de février-mars. Il y a donc là certainement un moyen de réduire les coûts de production en évitant cette première pulvérisation qui semble trop précoce.

L'observation des données de pluviométrie semble montrer que le début de l'épidémie se situe environ 3 mois après le commencement de la saison des pluies (figure 1). Les infections ayant lieu environ 1 mois avant l'observation des symptômes, nous pensons que les premières pulvérisations contre la rouille orangée devraient se faire entre 1.5 et 2 mois après le début des pluies.



———— Période de récolte

FIGURE 1: CROISSANCE DE LA ROUILLE ORANGÉE SUR FEUILLES JEUNES (EN HAUT) ET PLUVIOMETRIE (EN BAS); PLANTATION "LA LIBERTAD", SUD-OUEST DU GUATEMALA, ANNEES 1990 ET 1991.

3.2. Relations entre le caféier et le parasite:

3.2.1. Sensibilisation des plants:

La figure 2 est une analyse des correspondances multiples effectuée à partir des données de l'année 1990 sur les 25 plants qui n'ont pas reçu de fongicide. L'axe horizontal représente les infections croissantes, mesurées par le pourcentage maximum d'infection, le pourcentage cumulé jusqu'à la fin de la récolte, et un indice d'importance de la maladie qui correspond au rapport de l'aire sous la courbe de croissance cumulée de l'épidémie par l'aire sous la courbe de croissance cumulée du caféier. On trouve aussi la charge en fruits de la plante avant le début de l'épidémie, donnée par 2 variables, le nombre de fruits comptés en avril, avant la chute physiologique, et le rapport du nombre de fruits comptés en juin, après la chute physiologique, par le nombre cumulé de feuilles. Le tableau 2 donne les limites des classes des variables étudiées dans l'analyse.

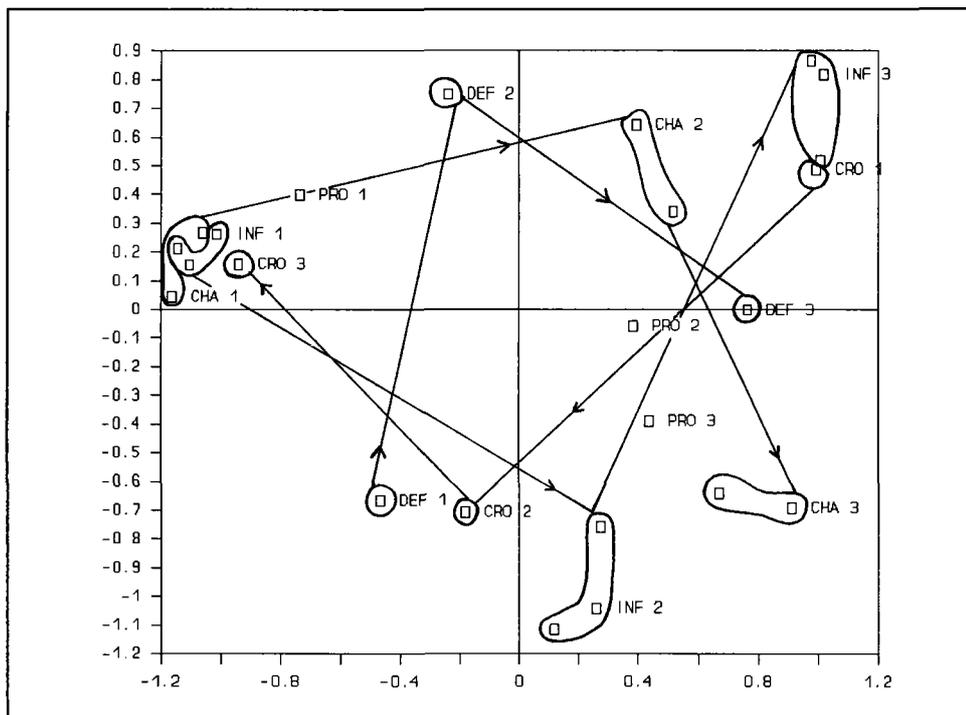
On peut remarquer l'existence d'une liaison entre les 2 groupes de variables cités: plus la charge en fruits est grande et plus la plante se sensibilise. Cette liaison est d'ailleurs très forte: $p=0.01\%$ et $r^2=0.50$ (tableau 3). Avec 1 fruit par feuille, une plante aurait subi une infection cumulée de 15 %, alors qu'avec 7 fruits par feuille l'infection serait montée à 54 %. Cela démontre que les traitements sont certainement moins utiles dans les phases de non production des arbustes (année de plantation et année de recépage). Ce phénomène déjà cité au Brésil (2), n'a sans doute pas été suffisamment exploité. Il y a là certainement une voie de recherche à explorer visant à trouver les causes de ces différences de sensibilité. Nous pensons que la fertilisation, doses et formes d'épandage, en est en grande partie responsable.

3.2.2. Effets de la rouille orangée:

3.2.2.1. Effet sur la défoliation et la croissance des rameaux:

L'analyse des correspondances multiples précédente montre aussi que les infections importantes de rouille orangée et donc les fortes charges en fruits sont bien associées aux grandes défoliations, plus exactement aux grands pourcentages cumulés de défoliation jusqu'à la fin de la récolte. En fait, une analyse des correspondances multiples sur des plants peu infectés, (infection cumulée inférieure à 3 %), la plupart des caféiers traités, montre que les fortes charges en fruits sont toujours assez bien associées aux fortes défoliations (figure 3). Le tableau 4 donne les limites des classes pour cette analyse. Cela permet d'expliquer la relative confiance du producteur qui parfois attribue les fortes défoliations qu'il peut observer au seul fait que sa caféière a eu de grandes productions. En fait, il y a 2 phénomènes simultanés aux effets semblables. Le tableau 3 montre que la maladie accentue notablement cette action défoliatrice puisqu'il existe une liaison très claire sur l'ensemble des plants ($p=0.00\%$ et $r^2=0.46$) entre le pourcentage cumulé d'infection et le pourcentage cumulé de défoliation.

Bien que la défoliation soit relativement tardive, comme l'épidémie, il apparaît qu'elle altère la croissance des rameaux. Celle-ci, mesurée par le pourcentage de feuilles apparues jusqu'à la fin de la récolte par rapport à la première observation, évolue en sens inverse de la défoliation aussi bien chez des plants non traités que chez des plants peu infectés (figures 2 et 3). Plus la défoliation est grande et plus la croissance des rameaux diminue. La production de l'année suivante est donc touchée. Le tableau 3 confirme cette tendance ($p=2.87\%$ et $r^2=0.10$). Là encore, il est possible qu'une fertilisation adéquate assurant la reconstitution du feuillage et une bonne croissance des rameaux permette de compenser les effets de la maladie. Enfin, une liaison très claire (tableau 3; $p=0.5\%$, $r^2=0.16$), existe entre la



PRO: Production de l'année 1990
 CRO: Croissance des rameaux en 1990
 INF: Infection en 1990
 CHA: Charge en fruits de l'année 1990
 DEF: Defoliation en 1990

1,2,3: Classes des données croissantes

FIGURE 2: ANALYSE DES CORRESPONDANCES MULTIPLES SUR DES PLANTS NON TRAITES, ENTRE L'INFECTION, LA CHARGE EN FRUITS, LA PRODUCTION, LA CROISSANCE ET LA DEFOLIATION; PLANTATION "LA LIBERTAD", SUD-OUEST DU GUATEMALA, ANNEE 1990.

TABLEAU 2: LIMITES DES CLASSES DANS LES ANALYSES DE CORRESPONDANCES MULTIPLES REPRESENTÉES SUR LES FIGURES 2 ET 4 (25 PLANTS NON TRAITES, ANNEE 1990)

CLASSES	INTITULE DES VARIABLES							
	PRODUCTION DE L'ANNEE 1990 (PRO)	CHARGE EN FRUITS DE L'ANNEE 1990 (CHA ou CHA1)		CROISSANCE DES RAMEAUX EN 1990 (CRO)	DEFOLIATION EN 1990 (DEF)	INFECTION EN 1990 (INF ou INF1)		
	Poids (g) de café cerise	Nombre de fruits comptés en avril	Rapport du nombre de fruits comptés en juin par le nombre cumulé de feuilles	% de feuilles apparues par rapport à la première observation	% cumulé	% maximum	% cumulé	% de l'aire sous la courbe de croissance de l'hôte occupé par la maladie
1	525 à 2250	64 à 305	0.46 à 2.49	26.42 à 78.85	13.98 à 31.63	1.18 à 16.92	0.82 à 19.66	0.30 à 7.29
2	2250 à 3185	305 à 527	2.49 à 3.25	78.85 à 115.25	31.63 à 42.61	16.92 à 31.68	19.66 à 30.71	7.29 à 12.96
3	3185 à 6028	527 à 770	3.25 à 6.93	115.25 à 190.48	42.61 à 67.74	31.68 à 53.33	30.71 à 56.16	12.96 à 20.83

TABLEAU 3: QUELQUES CORRELATIONS SIGNIFICATIVES ENTRE LE CAFEIER ET LA ROUILLE ORANGEE

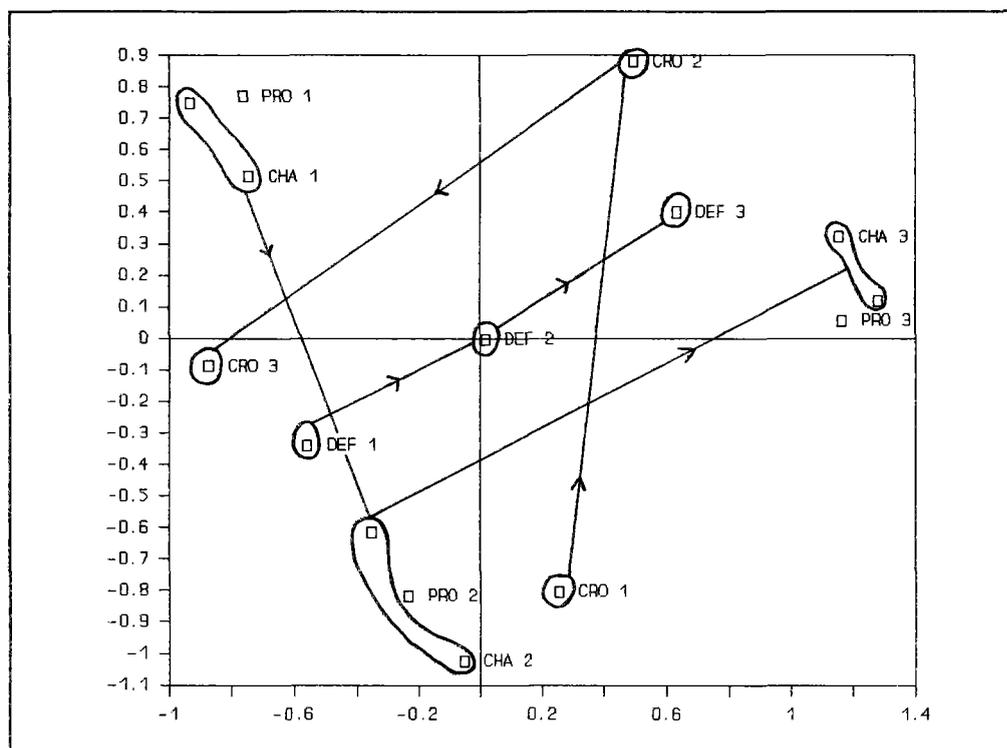
CONDITION DES PLANTS ANALYSES	VARIABLE EXPLIQUEE (y)	VARIABLES EXPLICATIVES			EQUATION DE REGRESSION	p (%)	r ²
		x1	x2	x3			
Plants non traités	% cumulé d'infection (1990)	Rapport du nombre de fruits comptés en juin par le nombre cumulé de feuilles (1990)			$y = 6.4445 x1 + 8.4435$	0.01	0.50
Ensemble des plants traités et non traités	% cumulé de défoliation (1990)	% cumulé d'infection (1990)			$y = 0.6418 x1 + 19.3257$	0.00	0.46
Ensemble des plants traités et non traités	% de croissance (1990)	% cumulé de défoliation (1990)			$y = - 1.0261 x1 + 133.4888$	2.87	0.10
Ensemble des plants traités et non traités	Rapport du nombre de fruits comptés en juillet par le nombre cumulé de feuilles (1991)	% de croissance (1990)			$y = 0.0152 x1 + 2.0516$	0.50	0.16
Plants non traités	% cumulé d'infection (1991)	% cumulé d'infection (1990)	Numéro de ligne	Numéro de plant sur la ligne	$y = - 0.6891 x1 - 0.4514 x2 - 0.3734 x3 + 65.9330$	0.15	0.52
Ensemble des plants traités et non traités	Production en kg de café cerise (1991)	Production en kg de café cerise (1990)	% cumulé d'infection (1990)		$y = 0.2815 x1 - 0.033 x2 + 1.732$	0.03	0.35

croissance des rameaux de la première année et la charge en fruits de l'année suivante, ou plus exactement le rapport du nombre de fruits comptés en juillet par le nombre cumulé de feuilles. Cette dernière relation explique la fluctuation biennale des infections de rouille orangée à l'échelle de la plante (tableau 3; $p=0.15\%$ et $r^2=0.52$).

La figure 4 qui correspond à une analyse des correspondances multiples effectuée à partir des données des 2 années étudiées sur les 25 caféiers non traités résume la situation. Les tableaux 2 et 5 donnent les limites des classes des variables utilisées dans cette analyse pour les années 1990 et 1991 respectivement. En 1990, les plants très chargés se sont infectés plus que les autres et ont subi une défoliation importante. En conséquence, la croissance des rameaux en 1990 et le nombre de fruits par feuille de l'année 1991 ont diminué, ce qui explique que ces caféiers sont devenus moins sensibles à la maladie en 1991. La figure 4 montre aussi la mise en place d'un gradient d'infections croissantes, en réalité seulement à partir de la 2^{ème} année, dans le sens de la pente. Le tableau 3 montre que ce gradient est très marqué ($p=0.15\%$ et $r^2=0.52$).

3.2.2.2. Effet de la rouille orangée sur la production:

La rouille orangée provoque donc des dégâts dans les conditions du versant pacifique de la Sierra Madre. Il n'a pas été possible de mettre en évidence un dégât sur la production de la première année en raison certainement du développement tardif de l'épidémie, comme ce qui avait déjà été décrit au Mexique (1). Par contre, la production de l'année 1991 est corrélée à l'infec-



PRO: Production de l'année 1990

CRO: Croissance des rameaux en 1990

CHA: Charge en fruits de l'année 1990

DEF: Defoliation en 1990

1,2,3: Classes des données croissantes

FIGURE 3: ANALYSE DES CORRESPONDANCES MULTIPLES SUR DES PLANTS PEU INFECTES, ENTRE LA CHARGE EN FRUITS, LA PRODUCTION, LA CROISSANCE ET LA DEFOLIATION; PLANTATION "LA LIBERTAD", SUD-OUEST DU GUATEMALA, ANNEE 1990.

TABEAU 4: LIMITES DES CLASSES DANS L'ANALYSE DE CORRESPONDANCES MULTIPLES REPRESENTEE SUR LA FIGURE 3 (20 PLANTS PEU INFECTES, ANNEE 1990)

CLASSES	INTITULE DES VARIABLES				
	PRODUCTION DE L'ANNEE 1990 (PRO)	CHARGE EN FRUITS DE L'ANNEE 1990 (CHA)		CROISSANCE DES RAMEAUX EN 1990 (CRO)	DEFOLIATION EN 1990 (DEF)
	Poids (g) de café cerise	Nombre de fruits comptés en avril	Rapport du nombre de fruits comptés en juin par le nombre cumulé de feuilles	% de feuilles apparues par rapport à la première observation	% cumulé
1	708 à 2378	81 à 287	0.83 à 1.98	36.00 à 76.27	7.55 à 14.29
2	2378 à 3250	287 à 450	1.98 à 4.16	76.27 à 122.45	14.29 à 22.11
3	3250 à 6405	450 à 775	4.16 à 7.28	122.45 à 248.28	22.11 à 35.00

tion et la production de l'année 1990 (tableau 3, $p=0.03\%$ et $r^2=0.35$). Nous avons estimé pour une plante ayant produit 2.7 kg de café cerise et ayant eu une infection cumulée de 16% à la fin de la récolte de 1990, un dégât supérieur à 20 % en 1991. Sachant que 75 % des plants non traités ont eu une infection cumulée à la fin de la récolte supérieure à 16 %, la lutte chimique semble donc très justifiée et rentable sur cette plantation.

4. CONCLUSIONS:

Il a été démontré que la rouille orangée est un problème de la caféiculture de basse altitude au Guatemala. Les dégâts provoqués justifient certainement la mise en place d'une méthode de lutte. Celle-ci, moins utile dans les phases de non production des arbustes, peut sans doute s'améliorer par l'intermédiaire de la fertilisation.

Les nombreux facteurs qui influent sur l'épidémie autres que climatiques, en particulier la charge en fruits, rendent assez difficile la mise en place d'un calendrier réduit de traitements chimiques, systématique et efficace. Nous pensons cependant qu'une pulvérisation, 2 mois après le début des pluies, d'un triazole, systémique et curatif, qui réduirait considérablement l'inoculum, et une pulvérisation d'un produit à base de cuivre 45 à 60 jours plus tard, devraient donner de bons résultats sur cette plantation.

A de plus hautes altitudes, la maladie est moins sévère et une seule pulvérisation devrait suffire.

BIBLIOGRAPHIE:

1. AVELINO (J.), MULLER (R.A.), CILAS (C.), VELASCO PASCUAL (H.). Développement et comportement de la rouille orangée (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.) dans des plantations en cours de modernisation, plantées de variétés naines, dans le Sud-Est du Mexique. Café Cacao Thé (Paris), vol. XXXV, n°1, janv.-mars 1991, p. 21-37.
2. ESKES (A.B.), SOUZA (E.Z. de). Ataque da ferrugem em ramos com e sem produção, de plantas do cultivar Catuaí. 9° Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Sao Lourenço, Minas Gerais, Brasil, 27-30 oct 1981, Instituto Brasileiro do café (Rio de Janeiro), p. 186-188.
3. FIESTER (D.), ARAUJO (M.A.), ESTRADA (R.). Tercera evaluación del proyecto regional de control de pestes del cafeto - Donación USAID/ROCAP No 596-0090. Mai 1991, IICA/PROMECAFE (Guatemala), 120 p.
4. UNIVERSIDAD FEDERAL DE VICOSA. International program on coffee rust epidemiology. Coordinné par A.C. Khushalappa, polycopié, s.d, 6 p.

RESUME: La rouille orangée est la principale maladie du caféier au Guatemala. Dans le but d'optimiser la lutte chimique contre ce fléau, une étude du développement de la maladie et des dégâts qu'elle provoque a été entreprise à partir de 1990, dans une zone écologique qui lui est très favorable (720 m d'altitude, 4000 mm de pluie en 1990 et 2700 mm en 1991). Au cours des 2 premières années d'étude, l'épidémie a commencé son développement à partir des mois de juin-juillet; ce qui remet en question la recommandation locale de réaliser les traitements préventifs à base d'oxychlorure de cuivre à partir de février-mars. En 1990, une corrélation positive ($p=0.01\%$, $r^2=0.50$) a été mise en évidence entre la quantité de fruits de la plante et son infection. Cela démontre que les traitements sont moins utiles dans les phases de non-production des arbustes. L'action défoliatrice de la maladie altère la croissance des rameaux et affecte la production de l'année suivante. La production de l'année 1991 est corrélée à la production et l'infection de l'année 1990. Les dégâts évalués, supérieurs à 20 % pour une infection de 16 %, justifient l'utilisation de la lutte chimique sur cette plantation.

DIFFERENT PATHOGENICITY OF CBD ISOLATES ON COFFEE GENOTYPES

V. M. VARZEA, C. J. RODRIGUES Jr., E. MEDEIROS

Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, 2780 Oeiras, Portugal

Introduction

Coffee berry disease (CBD) caused by the fungus Colletotrichum coffeanum Noack sensu Hindorf is a very severe disease that may destroy up to 80% of the coffee berries if no control measures are taken. The disease has been confined so far to Africa but it constitutes a menace to coffee growing countries of other continents. Attempts have been made to find coffee resistant selections that present a valid alternative to the use of chemical control and evidence is available that Rume Sudan and Hibrido de Timor (HDT) may represent two good sources of resistance. Thus, the Ruiru 11, a multiple hybrid produced in Kenya involving those two selections as resistant parents possesses resistance to rust and CBD in Kenya. Also some crosses between commercial cultivars and HDT or hybrids between C. arabica and C. canephora made in Colombia seem to present resistance to some isolates of the fungus. It has been shown (Rodrigues et al., 1991) that the fungus isolates from different origins may present differences in morphology. More recently (Rodrigues et al. 1992) evidence was given that the fungus presents physiologic races or pathotypes as well and this is a handicap in the search for resistant coffee material. In the present communication is given an account of the results of screening for CBD resistance as well as further evidence of the different pathogenicity of CBD isolates towards coffee genotypes.

Material and methods

CBD isolates from Kenya, Malawi, Rwanda and Zimbabwe were used. All the isolates were maintained in malt extract agar and preserved for long periods in agar slants covered with mineral oil (solitol). Every three or four times a year the isolates were inoculated on green coffee berries and reisolated to keep pathogenicity. Pathogenicity tests were carried out by inoculation of the hypocotyls according to the methodology of van der Vossen (1976) with slight modifications. The hypocotyls (3-6 cm high) were removed from the pots, washed in running tap water and placed on wet nylon sponges contained in aluminum trays covered with glass plates. Inoculation procedures consisted in spraying the hypocotyls with spore suspensions of each isolate at an approximate concentration of 2×10^{-6} conidia/ml. Batches of several tens of hypocotyls (30 to 100) were inoculated twice with an interval of 48 hours. The trays were maintained at 21^o C during the first 4 days and at 19^o C on the remaining days. The trials had a mean duration of 30 days and the reaction readings were made by using van der Graaf's scale (1981) from 0 to 4, where 0 corresponded to absence of symptoms, 1 to small and few chlorotic lesions, 2 and 3 to the presence of brown coalescent lesions, and 4 to dead hypocotyls.

Coffee hypocotyls used came from different sources namely Ethiopia (via IRCC/CI-RAD), Colombia, Costa Rica and Kenya. About 200 accessions were screened but only a small part that presented some degree of resistance is listed in Table I.

Table I. List of some coffee accessions screened for CBD resistance

CIFC Nº	Identification				Origin	
16667	Sudan Rume	x	Catuaí amarelo	H. 2224	87/4.52	Colombia
16668	"		"	"	87/4.53	"
16718	Sarchimor	T.	5296-192	ED	28	Costa Rica
16719	"	T.	16785-520	ED	17	"
16720	"	T.	18137-300	ED	28	"
16721	"	T.	18140- 92	ED	28	"
16722	"	T.	18141-342	ED	28	"
16724	S.L.		28			Kenya
16725	Sudan Rume					"
16726	Pretória					"
16727	K.7					"
16733	Sudan Rume	x	Catuaí amarelo	H. 2223	87/4.302	Colombia
16745	(Cat. x HDT)	x	Catuaí rojo	H. 3101	77/1.214	"
16747	"		"	"	77/1.251	"
16754	Sudan Rume					"

Table I. (Cont.)

CIFC N°	Identification					Origin
16819	(F ₃)	H. 3005	Caturra	x HDT	N°. pl 2030	Colombia
16820	(F ₄)	H. 3001	"	"	F.M.8.I. 222	"
16821	"	"	"	"	F.M.8.I. 241	"
16832	"	H. 3005	"	"	86/3. 1983	"
16833	"	"	"	"	86/3. 1992	"
16901	(F ₅)	Caturra	x HDT	CCC H. 3005	86/5. 2361	"
16904	"	"	"	"	86/5. 2499	"
16907	"	"	"	"	86/5. 2528	"
16908	"	"	CCC H.	3005	86/5. 2532	"
16912	(F ₆)	"	CCC H.	3001	"	"
16913	"	"	"	"	"	"
16914	"	"	"	"	"	"

Results and discussion

Coffee accessions originally from Ethiopia were screened only with the isolate from Rwanda or with this isolate and that from Zimbabwe. Most of them were highly susceptible to both isolates. However the accessions identified as ET3 ligne 200 Cof 4, ET 35 ligne 136, ET 52 ligne 249 and ET 54 ligne 25, screened only with the isolate from Rwanda showed resistance (reaction 0-1) in percentages of 42.6, 16.7, 35.3 and 18.5 respectively. The majority of the remaining material presented susceptibility to the four isolates except those shown in Table II (vide also Table I for identification). In Table II are shown the accessions that presented some resistance to the fungus isolates or those where there were differential interactions between the host and the fungus.

There were no coffee accessions presenting 100% of resistance to all the isolates but some of them displayed an appreciable percentage of resistance to all the isolates, such as Sudan Rume (CIFC 16725) from Kenya. On the other hand Sudan Rume from Colombia (CIFC 16754) was susceptible to all the isolates but the Malawi isolate. In what concerns the other accessions from Kenya, K7 (CIFC 16727) showed a high level of resistance to all the isolates (above 40% of resistant hypocotyls); SL 28 was highly resistant to the Rwanda isolate but susceptible to the others mainly to the Zimbabwe isolate (0% of resistant hypocotyls) and Pretoria (CIFC 16726) showed a level of resistance above 50% to the Kenya and Malawi isolates whereas to the others it was quite low. The Sarchimors from Costa Rica were all highly susceptible to the Zimbabwe isolate and partially resistant to the others. Emphasis should be given to accession 16722 that showed a high

level of resistance to the isolates from Kenya (97.6%) and Malawi (90.4%). The coffee material from Colombia (in particular the HDT derivatives) showed in general some degree of resistance to all the four isolates. However some of them did not behave homogeneously towards these isolates. For instance CIFC 16820 was highly susceptible to the Kenya isolate and highly resistant to the Malawi isolate.

These results showed that some resistance could be found among the screened material, but that this resistance may not be uniform for all the isolates.

Table II - Percentage hypocotyls with reaction 0-1 (resistant) and 4 (susceptible) after inoculation with isolates from Kenya, Malawi, Rwanda and Zimbabwe

CIFC Nº	Kenya isolate		Malawi isolate		Rwanda isolate		Zimbabwe isolate	
	0-1	4	0-1	4	0-1	4	0-1	4
16667	11.1	11.1	<u>75.9</u>	0	<u>0</u>	88.9	<u>0</u>	58.6
16668	17.2	13.8	0	93.7	0	69.0	0	70.0
16718	<u>73.3</u>	0	<u>90.0</u>	0	13.3	36.7	<u>0</u>	100.0
16719	43.5	38.5	<u>65.8</u>	23.7	18.4	73.7	<u>0</u>	100.0
16720	69.1	9.1	-	-	41.8	16.4	-	-
16721	20.8	43.4	38.9	46.3	1.8	70.9	0	89.1
16722	<u>97.6</u>	2.4	<u>90.4</u>	4.8	14.6	61.0	<u>0</u>	100.0
16724	9.6	85.6	13.0	85.6	<u>90.4</u>	4.8	0	97.9
16725	76.8	14.3	59.2	16.3	30.6	49.0	44.9	25.2
16726	<u>65.1</u>	9.3	<u>61.7</u>	12.8	<u>7.5</u>	62.5	<u>4.9</u>	75.6
16727	65.3	15.2	59.7	19.4	45.0	29.3	40.4	42.5
16733	<u>25.1</u>	44.4	<u>0</u>	83.4	<u>0</u>	97.2	<u>0</u>	100
16745	<u>0</u>	75.0	<u>45.7</u>	54.3	<u>0</u>	100	<u>0</u>	91.3
16747	-	-	51.4	40.0	48.5	42.9	11.3	68.0
16754	0	66.0	<u>38.3</u>	59.6	0	91.5	0	89.4
16819	<u>0</u>	6.9	<u>93.0</u>	4.2	27.8	59.7	15.2	77.8
16820	<u>0</u>	100	<u>75.8</u>	17.7	48.3	32.3	4.8	83.9
16821	23.8	71.4	28.6	40.5	0	57.2	0	95.2
16832	53.3	16.7	66.7	13.3	36.7	43.3	26.6	26.7
16833	77.8	<u>22.2</u>	98.4	<u>1.6</u>	44.5	<u>46.0</u>	15.8	<u>68.3</u>

Table II (Cont.)

CIFC Nº	Kenya isolate		Malawi isolate		Rwanda isolate		Zimbabwe isolate	
	0-1	4	0-1	4	0-1	4	0-1	4
16901	33.3	16.7	66.7	13.3	25.8	64.5	25.0	37.5
16904	50.0	13.3	<u>70.0</u>	0	<u>5.1</u>	66.7	10.8	37.8
16907	72.5	6.9	75.9	10.3	36.8	47.4	23.4	12.8
16908	42.3	15.4	86.5	3.8	45.7	28.6	58.1	16.1
16912	16.7	35.7	<u>66.7</u>	7.1	9.6	83.9	<u>3.1</u>	59.4
16913	11.4	68.6	28.6	45.7	0	90.9	0	88.2
16914	37.5	8.3	41.7	10.4	13.2	44.7	21.1	18.4

Note - The underlining indicates some conspicuous differences in pathogenicity.

References

Rodrigues Jr., C.J., Varzea, V.M., Medeiros, Emília F. 1992. Evidence for the existence of physiological races of Colletotrichum coffeanum Noack sensu Hindorf. Kenya Coffee 57 (672): 1417-1420.

Rodrigues Jr., C.J., Varzea, V.M.P., Hindorf, H., Medeiros, Emília F. 1991. Strains of Colletotrichum coffeanum Noack causing coffee berry disease in Angola and Malawi with characteristics different to the Kenya strain. J. Phytopathology 131: 205-209.

van der Graaf, N. 1981. Selection of Arabica coffee types resistant to coffee berry disease in Ethiopia. Mededelingen Landbouwhogeschool, Wageningen, 110 pp.

van der Vossen, H.A.M., Waliaro, D.J. 1981. The coffee breeding programme in Kenya: A review of progress made since 1971 and plan of action for the coming years. Kenya Coffee 46 (541): 113-130.

Abstract

Coffee berry disease is a very damaging disease of coffee in Africa particularly in the high altitudes. Chemical control reduces disease incidence but is very expensive. To screen for CBD resistance with fungus isolates of different geographic origins has been therefore a main objective of our Center. The technique of the hypocotyl test has been followed. The results obtained indicate that, from the hundreds of coffee genotypes inoculated, a few of these present resistance to some but not to all the isolates, thus showing the different pathogenicity of the CBD isolates.

RÉSULTATS RÉCENTS SUR LA RÉSISTANCE DE *COFFEA CANEPHORA* À LA SÉCHERESSE, À LA ROUILLE ORANGÉE ET AU SCOLYTE DES BRANCHETTES EN CÔTE-D'IVOIRE

C. MONTAGNON, Th. LEROY

CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

INTRODUCTION

Le scolyte des branchettes et la rouille orangée peuvent occasionner chez *Coffea canephora* des chutes de rendement de 20 % (Lavabre, 1959) et 30 % (Montagnon et coll., 1993b), respectivement dans les conditions de Côte d'Ivoire. Différents clones actuellement vulgarisés se sont avérés sensibles à ces deux aléas biotiques (Montagnon et coll, 1993a ; Montagnon et coll, 1993b). La sécheresse est responsable d'une chute de productivité de 50 % en zone marginale sur les clones actuellement vulgarisés (Snoeck, 1977). L'évolution du climat en Côte d'Ivoire lors des dernières décennies (Malezieux, 1990), avec en particulier un allongement des saisons sèches, accentue l'importance des stress hydriques, y compris pour l'installation des jeunes plants, dans toute la zone ivoirienne de caféiculture.

L'effondrement des cours mondiaux du café, répercuté au niveau du planteur, n'incite celui-ci ni à investir dans des traitements phytosanitaires, ni à adopter des techniques culturales optimales. La vulgarisation de variétés résistantes à ces aléas est donc plus que jamais nécessaire pour améliorer la productivité de *C. canephora*.

Différents travaux ont été menés ces dernières années en Côte d'Ivoire (Montagnon et coll, 1993a ; Montagnon et coll, 1993b ; Montagnon et Leroy, 1993) dont les objectifs étaient les suivants :

- Mise au point de méthodologies d'évaluation simples et rapides du comportement des caféiers vis à vis de ces aléas,

- Evaluation de la variabilité génétique existante,
- Application aux programmes de sélection.

Dans la présente communication, les principaux résultats obtenus sont décrits et les conséquences pour la sélection sont discutées.

1. MATERIEL ET METHODES

* *Matériel*

De récentes études de la variabilité génotypique et phénotypique ont permis d'identifier plusieurs groupes

au sein de *C. canephora* (Berthaud, 1986 ; Montagnon et coll, 1991 ; Leroy et coll, 1993) : le groupe Guinéen et le groupe Congolais qui comprend deux sous-groupes (SG1 et SG2).

Des essais clonaux de géniteurs appartenant à ces groupes et des essais de descendance intragroupes et intergroupes ont été analysés pour l'étude du comportement face à la rouille orangée.

Les mêmes essais de géniteurs, ainsi qu'un essai d'hybrides diallèle à sept parents, 4 Guinéens (410, 414 et 416) et 3 Congolais du sous-groupe 2 (069, 444 et 464), ont été utilisés pour l'analyse de l'incidence de la sécheresse.

Un essai de confirmation clonale de 21 clones a été analysé pour l'étude du comportement face au scolyte des branchettes.

Pour chaque essai, le nombre de répétitions par génotype ou descendance est au minimum de 15 et en moyenne de 40. Tous les essais sont plantés selon un dispositif de randomisation de parcelles monoarbres.

* Méthodes

Toutes les observations sont individuelles.

+ **Sécheresse**: Note d'incidence au champ de 1 à 5 sur des caféiers âgés de deux ans. Cette note prend en compte l'aspect général végétatif de l'arbre. La note 1 correspond à un arbre qui ne souffre apparemment pas de la sécheresse. La note 5 est attribuée à des arbres dont les feuilles et les rameaux sont totalement noircis. Les notes intermédiaires sont données en fonction de l'aspect global de l'arbre comprenant la forme et l'aspect des feuilles ainsi que le degré de défoliation. Les arbres ont été notés en janvier et mars 1990 (année de forte sécheresse).

+ **Scolyte des branchettes**: Nombre de branchettes possédant au moins un trou de scolyte sur des caféiers. L'observation a été effectuée deux années de suite sur des caféiers âgés de deux ans la première année. La somme sur les deux années a été analysée.

+ **Rouille orangée**: Note de sensibilité au champ de 1 à 5 décrite comme suit:

- 1 - Aucun symptôme
- 2 - Présence de taches non sporulantes
- 3 - Taches avec quelques sporulations, sans défoliation
- 4 - Beaucoup de taches sporulantes, début de défoliation
- 5 - Beaucoup de taches sporulantes, défoliation importante.

Selon l'âge des essais, les notations ont été effectués sur deux à quatre années sur la période d'août-septembre qui correspond habituellement au pic d'attaque.

2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Sécheresse

Des analyses de la variance de la note d'incidence au champ ont été effectuées. Le premier résultat d'importance est que les conditions nécessaires à une telle analyse sont respectées tant au niveau de la normalité des résidus que de leur homogénéité. La précision de l'analyse est améliorée en utilisant comme covariable la moyenne des résidus des arbres voisins, comme décrit par Papadakis (1937). Ceci reflète l'influence de la microhétérogénéité du sol sur l'expression des symptômes de stress hydrique sur le caféier.

Les séparations obtenues (Tableau 1) sont nettes. Un changement de classement est cependant observé entre les notations de janvier et mars 1990 dans l'essai d'hybrides. L'incidence est notée significativement plus forte sur les Guinéens en janvier. En mars, les Congolais apparaissent les plus touchés par le stress hydrique, suivis par les hybrides intergroupes et enfin par les guinéens. Le suivi de l'évolution des réactions foliaires (Montagnon et Leroy, 1993) montrent que les Guinéens replient précocement leur feuilles, alors que les Congolais gardent leur feuilles turgescentes. Les Guinéens paraissent fanés par rapport aux Congolais. Quand la saison sèche avance, les Congolais flétrissent et noircissent subitement alors que les Guinéens, tout en gardant leurs feuilles pliées et verticales, passent la saison sèche relativement bien. Le repliement précoce des feuilles est en fait, comme chez beaucoup de plantes, un mécanisme d'économie en eau (Begg, 1980). Pour *C. canephora*, il est donc important

d'attendre la fin d'une saison sèche sévère pour noter l'incidence au champ d'un stress hydrique.

Tableau 1 - Incidence de la sécheresse estimée par une note visuelle (note de 1 à 5) en janvier (SE190) et mars 1990 (SE390) et par le taux de mortalité due à la sécheresse en 1990 pour différents groupes de clones et d'hybrides de *C. canephora* en Côte d'Ivoire.

ESSAI	GROUPE (effectif)	SE190 *	SE390 *	Taux ** Mortalité 1990 du à la sécheresse
CLONAL (CONGOLAIS)	SG1 (117)	1,86 a	3,09 a	0,01 a
	SG2 (488)	2,55 b	4,31 b	0,42 b
HYBRIDE (DIALLELE)	GUINEEN G (305)	2,50 b	2,78 a	----
	CONGOLAIS C (143)	2,10 a	3,85 c	----
	HYBRIDE CxG (658)	2,13 a	3,13 b	----

* Comparaison de moyennes suivant le test de Newman et Keuls au seuil de 5 %.

** Comparaison de proportion par le test du X^2 au seuil de 5 %.

Au sein des Congolais, l'incidence est notée significativement plus forte pour le sous-groupe 2 par rapport au sous-groupe 1. La mortalité due à la sécheresse est nettement plus élevée dans le sous-groupe 2. L'évolution des réactions foliaires (Montagnon et Leroy, 1993) montre que la chute précoce d'une partie des feuilles pourrait constituer un mécanisme d'économie en eau pour le sous-groupe 1.

Montagnon et Leroy (1993) ont étudié le mode de transmission de l'incidence de la sécheresse au champ. L'analyse de l'essai diallele montre un effet hautement significatif de l'Aptitude Générale à la Combinaison et un effet non significatif de l'Aptitude Spécifique à la Combinaison. Cependant, l'analyse factorielle, ne prenant en compte que des hybrides intergroupes, laisse apparaître une interaction entre les géniteurs des deux groupes. Il est possible que la vigueur observée au niveau des hybrides intergroupes (Leroy et coll, 1993) masque parfois une mauvaise adaptation à la sécheresse.

La variabilité génétique existante à l'intérieur du groupe Guinéen et des deux sous-groupes Congolais, a été évaluée dans les essais de géniteurs (Tableau 2 et 3). La supériorité des génotypes du sous-groupe 1 congolais est confirmé. Le potentiel de sélection à l'intérieur du sous-groupe 2 congolais est relativement faible puisque seulement cinq de ses 18 génotypes n'appartiennent pas au dernier groupe de moyenne.

Tableau 2 - Comparaison de clones de *C. canephora* de type Congolais pour la notation visuelle (1-5) d'impact de la sécheresse en mars 1990 et pourcentage de mortalité due à la sécheresse en 1990, en Côte d'Ivoire.

	GROUPES		MORTALITE
461 *	A	2.75	0
307 **	A	2.80	0
477 **	A	2.85	0
077 **	A	2.84	0
387 **	A	2.84	0
314 **	AB	3.32	5
057	BC	3.50	0
126 *	BCD	3.50	5
308	BCDE	3.75	20
02513	BCDE	3.75	30
072 **	BCDEF	3.85	0
02518	BCDEF	3.87	0
202	CDEFG	3.95	25
02544	CDEFGH	4.00	13
032	CDEFGH	4.10	40
054	CDEFGH	4.10	45
069	CDEFGH	4.05	45
A25	CDEFGH	4.11	32
178	DEFGH	4.32	60
464	DEFGH	4.45	10
444	DEFGH	4.30	74
115	EFGH	4.30	55
392	EFGH	4.45	70
02576	EFGH	4.60	70
043	EFGH	4.65	15
046	EFGH	4.55	45
411	EFGH	4.70	20
02543	EFGH	4.60	70
222	EFGH	4.65	50
037	EFGH	4.70	70
345	H	4.75	79
204	H	4.74	65
02504	H	4.75	30

* * = Témoin hybride intergroupe, ** = Congolais sous-groupe 1.

** Comparaison des moyennes suivant le test de Newman et Keuls au seuil de 5 % après analyse de la covariance de Papadakis (1937). La valeur du coefficient de détermination entre variable et covariable est 0.21.

Aucun génotype guinéen n'est significativement différent du clone témoin 461, alors que seul une partie des génotypes congolais du sous-groupe 1 sont statistiquement équivalent à ce témoin. Ce qui confirme la supériorité des génotypes guinéens pour l'adaptation à la sécheresse. De plus, une variabilité suffisante existe au sein du groupe guinéen pour pouvoir y effectuer une sélection.

Tableau 3 - Comparaison de clones de *C. canephora* de type Guinéen pour la notation visuelle (1-5) d'impact de la sécheresse en mars 1990 en Côte d'Ivoire.

CLONE +	GROUPES HOMOGENES ++	MOYENNE
02189	A	1.87
02292	A	1.93
02210	AB	2.00
02255	ABC	2.13
410	ABCD	2.20
02244	ABCD	2.31
02222	ABCD	2.33
02040	ABCDE	2.47
461 *	ABCDE	2.53
02071	ABCDE	2.67
02138	ABCDE	2.67
02215	BCDE	2.79
02239	BCDE	2.80
02224	CDE	2.80
02286	CDE	2.80
155	CDE	2.87
414	CDEF	2.93
02116	CDEF	2.93
126 *	CDEF	3.07
02213	DEF	3.07
416	DEF	3.08
02121	EF	3.27
02169	EF	3.27
202 **	F	3.85

+ * = Témoin hybride intergroupe, ** = Congolais sous-groupe 2.

++ Comparaison des moyennes suivant le test de Newman et Keuls au seuil de 5 % après analyse de la covariance de Papadakis (1937). La valeur du coefficient de détermination entre variable et covariable est 0.07.

Scolyte des branchettes

Le nombre de branchettes possédant au moins un trou de scolyte a été relevé sur deux ans. La variable se prêtant le plus une analyse statistique est le logarithme de la somme des deux comptages. La précision de l'analyse est améliorée en utilisant comme covariable la moyenne des résidus des plus proches voisins (Montagnon et coll, 1993a). Ceci reflète la dissémination à faible distance de l'insecte.

Trois clones se séparent très nettement de tous les autres qui forment un continuum (Tableau 4). Quatre des six meilleurs clones, y compris les trois premiers (586, 587 et 588), ont été sélectionnés dans la descendance du même croisement entre les parents 181 et A03. Les deux clones (539 et 589) issus d'autres croisements avec l'un de ces deux parents en commun sont également bien placés. Ceci suggère une bonne transmission de la résistance de ces deux parents et, probablement, l'implication de peu de gènes de type dominant.

De précédents résultats (Brader, 1964 ; Leroy et coll, 1993) indiquent que le type Kouilou, décrit par Portères (1959) et comparable à différents égards au sous-groupe 1 congolais (Montagnon et coll, 1991 ; Leroy et coll, 1993), est moins attaqué que le type Robusta, comparable au sous-groupe 2 congolais. Ceci est en accord avec la résistance transmise par le parent A03 qui est le seul parent du sous-groupe 1 de l'étude. Le clone 477, du sous-groupe 1, est l'un des meilleurs clones, même s'il a subi une attaque sévère en 1991. Les trois clones les plus typiques du sous-groupe 2 congolais (182, 202 et 609) sont parmi les plus attaqués. Le sous-groupe 1 congolais apparaît donc comme une source importante de résistance au scolyte des branchettes.

Tableau 4 - Origine, type génétique, somme du nombre de branchettes scolytées sur 1990 et 1991 (données non transformées) de clones de *C. canephora* et différences statistiques calculées après une analyse de covariance selon Papadakis (voir texte).

CLONE	ORIGINE *	TYPE **	MOYENNE	GRUPE ***
586	SD 181 X A03	H X SG1	1.41	A
588	SD 181 X A03	H X SG1	1.43	A
587	SD 181 X A03	H X SG1	1.97	A
589	SD 182 X 181	SG2 X H	4.60	B
477	SM	SG1	4.44	B
594	SD 181 X A03	H X SG1	4.90	BC
539	SD 178 X A03	SG2 X SG1	4.83	BC
513	SD 410 X 411	G X SG2	5.93	BCD
526	SD 464 X 410	SG2 X G	6.00	BCDE
119	PP	H	6.35	BCDE
126	PP	H	5.96	BCDEF
503	SD A1 FL	SG2 FL	6.40	BCDEF
529	SD 464 X 410	SG2 X G	8.10	CDEF
182	PP	SG2	8.61	CDEF
512	SD 410 X 411	G X SG2	8.74	CDEF
197	PP	H	7.60	CDEF
202	PP	SG2	8.16	CDEF
609	SD A01 X 200	SG2 X SG2	10.00	DEF
305	PP	H	10.07	EF
107	PP	H	12.38	F
461	PP	H	14.14	F

* SD = Sélectionné dans une descendance, SM = Sélectionné à Madagascar,

PP = Prospecté en plantation, FL = Fécondation libre.

** SG1 et SG = Sous-groupe 1 et 2 congolais, G = guinéen, H = hybride entre guinéen et congolais.

*** Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas différentes au seuil de 5 % selon le test de Newman et Keuls appliqué après une transformation logarithmique.

Rouille orangée

Près de 10.000 plants appartenant à 161 croisements ont été observés sur deux, trois ou quatre années. La note retenue pour l'analyse est la note maximale obtenue sur les différentes années de notation. Les résultats sont exprimés sur le tableau 5 en pourcentage d'arbres résistants au champ, c'est à dire n'ayant jamais montré de taches sporulantes (note inférieure ou égale à 2), pour chaque descendance. 97 % des descendance congolaises ont plus de 60 % de plants résistants alors que ce pourcentage n'est que de 13 % pour les descendance guinéennes. Une grande variabilité est observée pour les descendance hybrides intergroupes. 41 % de ces descendance hybrides montrent moins de 60 % de plants résistants, ce qui indiquent la nécessité de prendre en compte ce pathogène pour la sélection de *C. canephora* en Côte d'Ivoire.

L'étude des clones Guinéens sur deux années de forte attaque (1989 et 1991) est présentée sur le tableau 6. Cette étude confirme la grande sensibilité de la majorité des guinéens. Il est toutefois très intéressant de constater que quelques uns montrent une résistance partielle (02189) ou complète (02116 et 02292) les deux années de forte attaque étudiées.

Trois clones (155, 02169 et 02239), très peu attaqués en 1989, s'avèrent très atteints en 1991 sans que l'on puisse relier ce phénomène à leur production. Ceci suggère l'existence d'une race capable de surmonter la résistance de ces trois clones. En 1989, un seul des 15 arbres du clone 02169 a été noté 5, indiquant la faible fréquence de cette race qui s'est pleinement exprimée en 1991. Des observations comparables ont été réalisées par Eskes (1983) sur des génotypes Icatu au Brésil et ont ensuite amené à l'identification de nouvelles races identifiées en laboratoire. D'autres observations (Montagnon et coll, 1993b) montrent de fortes interactions entre clones et lieux suggérant également l'existence de plusieurs races de rouille orangée en Côte d'Ivoire.

Parmi les autres facteurs à prendre en compte, la faible dissémination des spores dans les conditions de randomisation de parcelle monoarbre, la pluviométrie et la production ont particulièrement été soulignées (Montagnon et coll, 1993b).

Tableau 5 - Répartition des descendance de *C. canephora* en fonction de leur pourcentage de plants résistants au champ après plusieurs années d'observation.

TYPE DE DESCENDANCE (Nombre de descendance)	POURCENTAGE DE DESCENDANCES POSSEDANT UN POURCENTAGE DE PLANTS RESISTANTS COMPRIS ENTRE				
	0 et 20	20 et 40	40 et 60	60 et 80	80 et 100
CONGOLAISE (31)	0	0	3	16	81
INTERGROUPE (115)	10	7	24	20	39
GUINEENNE (15)	47	27	13	13	0

Tableau 6 - Sensibilité au champ à la rouille orangée de génotypes Guinéens de *C. canephora* à Divo en Côte d'Ivoire dans un essai clonal planté en 1988.

CLONE Effectif par clone = 15	SENSIBILITE A LA ROUILLE ORANGEE (Note de 1 à 5)					PRODUCTION (hg Cerises fraîches/ arbre) 1991	
	1989			1991			
	M *	ec *		M	ec		
02239	1.20	0.56	A**	3.40	0.99	CD	33
155	1.33	0.49	A	3.20	1.12	CD	35
02169	1.60	1.06	AB	4.86	0.52	F	17
02189	1.73	0.59	AB	2.27	0.80	B	7
02116	1.80	0.41	AB	1.07	0.26	A	24
02292	1.80	0.41	AB	1.53	0.64	A	12
02121	2.33	0.49	B	2.27	0.70	B	71
410	2.93	1.16	C	3.40	1.12	CD	43
02286	3.33	0.72	CD	2.73	0.59	BC	30
02210	3.60	1.06	DE	3.73	0.88	DE	32
02138	4.07	1.03	E	4.20	0.68	EF	32
02244	4.69	0.63	F	4.69	0.63	F	42
02222	5.00	0	F	4.67	0.62	F	29

* M = Moyenne EC = Ecart-type

** Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas différentes selon le test de Newman et Keuls à 5%.

En conclusion, les recommandations faites pour *C. arabica* (Eskes, 1989) semblent valables aussi pour *C. canephora*. Pour une évaluation efficace, il est important de noter les plants adultes à plusieurs reprises, à l'aide de l'échelle (1-5) définie dans cette étude, de préférence des années de forte production. La note maximale obtenue sur plusieurs notations pour un arbre donné doit être considérée comme correspondant à son niveau de résistance vis à vis des races existant dans la parcelle. L'hypothèse de l'existence de plusieurs races de rouille

devra être testée en laboratoire; de premiers résultats (Olguin, comm. pers.) semblent confirmer cette hypothèse.

3. CONCLUSIONS GENERALES

Pour trois aléas importants affectant le rendement de *C. canephora*, il a été montré que l'amélioration génétique pouvait apporter des résultats positifs, et cela pour trois raisons principales:

- des notations fiables, simples, rapides et répondant aux conditions d'une analyse statistique sont disponibles,

- Une variabilité génétique importante a été mise en évidence dans chaque cas. Cette variabilité est en relation avec la structure connue de l'espèce,

- La résistance à ces aléas semble transmise de façon additive, en particulier pour la sécheresse et le scolyte des branchettes. Ainsi, dans le cadre du programme de sélection récurrente et réciproque appliqué à *C. canephora* (Leroy et coll, 1993), la sélection devrait être efficace au niveau des géniteurs appartenant aux différents groupes et sous-groupes.

Cependant, différents axes de recherche restent à approfondir:

- l'effet de la sécheresse sur des arbres adultes déjà installés restent à étudier. Pour l'essai de géniteurs guinéens, une forte corrélation génétique négative a été trouvée entre la note d'incidence à deux ans et le cumul des deux premières récoltes, ce qui renforce l'intérêt de cette notation précoce.

- la vérification rigoureuse en laboratoire de l'existence éventuelle de plusieurs races de rouille orangée en Côte d'Ivoire est tout à fait prioritaire pour maîtriser la sélection pour la résistance à ce pathogène dont on a montré l'importance.

En relation avec cette dernière idée, un intérêt non négligeable de cette étude est de fournir aux physiologistes, aux entomologistes et aux phytopathologistes un matériel de base pour étudier les mécanismes biologiques sous-jacents à la variabilité observée pour la sécheresse, le scolyte des branchettes et la rouille orangée.

BIBLIOGRAPHIE

BEGG J.E., 1980 - Morphological adaptations of leaves to water stress. In: Eds Turner N.C. and Kramer P.J.. Adaptation of plants to water and high temperature stress. Wiley Interscience, 33-42.

BERTHAUD J., 1986 - Les ressources génétiques pour l'amélioration des caféiers africains diploïdes : Evaluation de la richesse génétique des populations sylvestres et de ses mécanismes organisateurs. Conséquences pour l'application. Ed. ORSTOM, Travaux et Documents N° 188, Paris, 1986.

BRADER, L., 1964. Etude de la relation entre le scolyte des rameaux du caféier, *Xylosandrus compactus* Eichh. (*Xyleborus morstatti* Hag.) et sa plante hôte. *Meded. Landbouwhogeschool Wageningen* 64-7, 109p..

ESKES A.B., 1983 - Qualitative and quantitative variation in pathogenicity of races of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) detected in the state of Sao Paulo, Brazil. *Netherland Journal Plant Pathology*, 89:31-46.

ESKES A.B., 1989 - Resistance. In: Kushalappa A.C. and Eskes A.B. Eds, Coffee rust: epidemiology, resistance, and management. CRC Press, Boca Raton (Florida), USA, 171-292.

LAVABRE, E.M., 1959. Le scolyte des branchettes du caféier Robusta *Xyleborus morstatti* Haged. *Café, Cacao, Thé* 3 (1), 21-33.

LEROY, T., MONTAGNON, C., CHARRIER A. and ESKES A.B., 1993. Reciprocal recurrent selection applied to *C. canephora* Pierre. I Characterization and evaluation of breeding populations and value of intergroup hybrids. *Euphytica*, sous presse.

MALEZIEUX E., 1990 - Répartition et évolution du déficit hydrique dans le sud-est de la Côte d'Ivoire. Application à la culture de l'ananas. *Fruits* 45 (5) : 457-468.

MONTAGNON, C., LEROY, T. and YAPO, A., 1991. Etude complémentaire de la diversité génotypique et phénotypique des caféiers de l'espèce *C. canephora* en collection de Côte de d'Ivoire. 14^{ème} colloque ASIC, San Francisco (USA), 1991, Ed ASIC, Paris (FRA), 444-450.

MONTAGNON, C., LEROY, T., 1993 - Réaction à la sécheresse de jeunes caféiers *Coffea canephora* de Côte d'Ivoire appartenant à différents groupes génétiques. *Café, Cacao, Thé*, **37** (3), sous presse.

MONTAGNON, C., LEROY, T., CILAS, C., et ESKES, A.B., 1993a - Clonal differences for *Coffea canephora* resistance to the scolytid coffee-twig borer. *International Journal of Pest Management*, sous presse.

MONTAGNON, C., LEROY, T., KEBE, I., et ESKES, A.B., 1993b - Importance de la rouille orangée et facteurs impliqués dans l'évaluation de la résistance au champ de *Coffea canephora* en Côte d'Ivoire. *Netherland Journal of Plant Pathology*, sous presse.

PORTERES, R., 1959. Valeurs agronomiques des caféiers de type Kouilou et Robusta cultivés en Côte d'Ivoire. *Café, Cacao, Thé* **3** (1), 3-13.

SNOECK J., 1977 - Essai d'irrigation du caféier Robusta. *Café, Cacao, Thé* **21** (2): 111-128.

RESUME

L'amélioration génétique de *Coffea canephora* en Côte d'Ivoire pour les trois aléas importants que sont la sécheresse, le scolyte des branchettes et la rouille orangée donne beaucoup d'espoirs. En effet, pour chacun de ces aléas, une méthodologie d'analyse simple et rapide est disponible pour le criblage du matériel en sélection. Il s'agit d'une note visuelle de 1 à 5 pour la sécheresse et la rouille orangée et du compte de branchettes possédant au moins un trou de scolyte. Ensuite, pour chaque aléa, une variabilité génétique importante a été observée en relation avec la structure génétique connue de l'espèce. Le sous-groupe 1 congolais s'avère particulièrement intéressant comme source de résistance à la sécheresse et au scolyte des branchettes. Enfin, au moins pour ces deux aléas, la transmission de la résistance apparaît largement additive, ce qui devrait permettre une sélection efficace des géniteurs dans les populations de base de la sélection récurrente et réciproque.

Un des problèmes les plus cruciaux à résoudre est la vérification de l'hypothèse de l'existence de plusieurs races de rouille en Côte d'Ivoire, émise suite à l'observation de fortes interactions entre clones et année et entre clones et lieux. Enfin, l'évaluation du matériel végétal de ce travail permet de proposer aux physiologistes, entomologistes et phytopathologistes des génotypes, choisis pour leur comportement extrême, dont l'étude pourra aider à préciser les mécanismes biologiques sous-jacents à la variabilité génétique observée.

NEW PHYSIOLOGIC RACES OF *HEMILEIA VASTATRIX*

C. J. RODRIGUES Jr., V. M. P. VARZEA, I. L. GODINHO, S. PALMA, R. C. RATO

Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, Quinta do Marquês, 2780 Oeiras, Portugal

Introduction

The first description of physiologic races in the coffee leaf rust or orange rust *Hemileia vastatrix* Berk & Br.) was made by Mayne (1932, 1935, 1936, 1942) in India who reported the existence of 4 races. After the establishment of the Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC) at Oeiras, Mayne's races 1, 2 and 4 were confirmed as being races I, II and VIII, respectively, of the CIFC. Race 3 of Mayne was suggested to be CIFC's race VII. Several publications afterwards have reported the work done at Oeiras and have given an account of the physiologic specialization of the rust (Rodrigues *et al.*, 1965). In 1975 Rodrigues *et al.* (1975) reported the existence of 30 rust races but in the next following years no new races were added to the previous list. Rodrigues (1984) suggested that some possible reasons for the non-differentiation of new races were the following: 1) The rust material collected for differentiation came essentially from hosts bearing the resistance factor S_{H5} , what excluded right off the isolation of races without the virulent gene v_5 ; 2) Some virulent genes of the rust were preferentially associated to interspecific hybrids between *Coffea arabica* and diploid coffees and the rust sampling from these coffees was very reduced. Recently, with the establishment of a project supported by EC involving Portugal, India, Malawi and United Kingdom, a good sampling has been made in India of rust collected in tetraploid interspecific hybrids and diploid coffees and this has led to the discovery of new races. Thus, in 1990 (Varzea *et al.*) three new races were differentiated with the following genotypes: $v_{5,7}$ or $v_{5,7,9}$; $v_{2,5,7}$ or $v_{2,5,7,9}$ and $v_{2,4,5,7}$ or $v_{2,4,5,7,9}$. In the present communication is given an account of six more races recently identified.

Material and methods

Rust samples collected in tetraploid interspecific hybrids such as Cauvery/Catimor, C. robusta x C. arabica and C. robusta kindly collected at The Central Coffee Research Institute by Dr. M.S. Sreenivasan were used for race differentiation. The rust samples were inoculated on susceptible plants of group E (Caturra, Catuaí, etc.) when they had been collected on Arabica x Robusta hybrids or on plants of group N (CIFC 168/12 - C. excelsa susceptible) and F (the universal suscept C. racemosa) when they came from a diploid coffee. After the establishment of the cultures they were inoculated on the series of differential hosts. Inoculation techniques were those described by d'Oliveira and Rodrigues (1961).

Results

The results of the race differentiation are presented in Table I. It was identified a race v_6 , collected in India on C. robusta, infecting only group R plants, and other five races with ability to infect HDT derivatives and some Arabicas. These races added to the others already reported make a total of 39 known races. It is called attention to the fact that it was now differentiated the most virulent race ever identified with 7 genes for virulence $v_{2,4,5,6,7,8,9}$. The differentiation of these new races may justify the fact of some HDT derivatives to show in the field same rust symptoms, in general very light. In spite of this the Catimor variety of group A continues to show resistance in our greenhouse conditions to all these races as well as in the field, which indicates that it should possess other resistance genes not yet identified. In support of this is the fact of the Catimor parent HDT to remain rust free in the field, in India, since 1960 (Forty Third Annual Report 1989-90).

Table I - New physiologic races of H. vastatrix

		Coffee physiologic groups and genes for rust resistance							
		E	C	D	J	R	1	2	3
		S _H 5	S _H 1,5	S _H 2,5	S _H 4,5	S _H 6	S _H 5,6,7,9	S _H 5,8	S _H 5,6,9
Race genotypes	V ₆					S			
	V _{2,4,5,6}	S		S	S	S			
	V _{2,4,5,8}	S		S	S			S	
	V _{2,5,6,7,9}	S		S		S	S		S
	V _{1,2,4,5,8}	S	S	S	S			S	
	V _{2,4,5,6,7,8,9}	S		S	S	S	S	S	S

S = Susceptibility
Blanks = Resistance

References

- D'Oliveira, B. & Rodrigues Jr., C.J. 1961. O problema das ferrugens do cafeeiro. Revista do Café Português 29: 5-50.
- Forty Third Annual Report 1989-90. Botany, Plant Improvement and Horticulturae. : 67-90. Coffee Board Research Department, ed. India.
- Mayne, W.W. 1932. Physiologic specialization of Hemileia vastatrix B. & Br. Nature 129: 150.
- Mayne, W.W. 1935. Annual report of the coffee scientific officer, 1934-35 - Mysore Coffee Experiment Station, Bulletin 13. 28 pp.
- Mayne, W.W. 1936. Annual report of the coffee scientific officer, 1935-36 - Mysore Coffee Experiment Station, Bulletin 14. 21 pp.
- Mayne, W.W. 1942. Annual report of the coffee scientific officer, 1941-42 - Mysore Coffee Experiment Station, Bulletin 24. 21 pp.

- Rodrigues Jr., C.J. 1984. Raças fisiológicas de Hemileia vastatrix. Simpósio sobre Ferrugens do Cafeeiro. Comunicações. Oeiras, 17-20 Out. 1983: 69-79.
- Rodrigues Jr., C.J., Bettencourt, A.J. & Lopes, J. 1965. Study of the physiologic specialization of the coffee rust Hemileia vastatrix B. et Br. and selection of coffee clones for the establishment of a standard range of differential hosts for this rust. Progress Report 1960-1965. Coffee Rusts Research Center, Oeiras, Portugal: 21-27.
- Rodrigues Jr., C.J., Bettencourt, A.J. & Rijo, Luisete. 1975. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. Ann. Rev. Phytopathology 13: 49-70.
- Varzea, V., C.J. Rodrigues Jr., J.E. do Passo & S. Palma. 1990. New rust genotypes and a new coffee genotype in Catimor 45. ASIC, 13^e Colloque, Paipa, 1989: 745-748.

Abstract

The existence of physiologic races of Hemileia vastatrix has been described previously in several occasions. In 1983 about 30 races were known thanks to the work carried out by the Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, Oeiras, Portugal. During a number of years no new races were added to this list for several possible reasons suggested by the first author. Due to the spread in the coffee growing countries of some resistant varieties derived from Híbrido de Timor new races have been detected lately from rust samples collected in India with ability to infect coffee groups R, 1, 2 and 3 but not group A. The genotypes of these races have been assumed to be v_6 , $v_{2,4,5,6}$, $v_{2,4,5,8}$, $v_{2,5,6,7,9}$, $v_{1,2,4,5,8}$ and $v_{2,4,5,6,7,8,9}$. The appearance of these races is a menace to the commercial varieties derived from Híbrido de Timor. Only the future will tell whether the group A plants will keep resistant or come to be infected by new virulent races.

EFFECT OF CANOPIES AND BEARING HEADS ON DENSITY AND YIELD OF CBD RESISTANT ARABICA (*COFFEA ARABICA* L.)

Y. EDJAMO, T. SHIMBER, G. TEMESGEN, A. YILMA

Research Officer II, I, Assistant Research Officer and Technical Assistant, respectively
Institute of Agricultural Research, Jimma Research Centre, P.O. Box 192, Jimma-Melko, Ethiopia

INTRODUCTION

Plant canopies (assemblages of leaves, stems and fruits) intercept light regimes differentially as demarkated by contours of irradiance means (6). As much as roots up take nutrients and water basipetally, crop canopies harness light and gases apipetally to promote photosynthesis and productivity. The many processes essential to plant growth and development such as transpiration, evaporation radiative transfer and exchange of heat and moisture and gases into and out from the canopies depend on spatial arrangement (7) leaf orientation (20) and structure of canopies (9). Jackson and Palmer (16) and Palmer (14) considered versatile solid models and transmission constants to indirectly be detrmined by canopy spreads and bearing heads.

Huxley and Cannell (5) suspected the contemporary multiple stem coffee spacing and its height in Kenya to strongly hinder ideal light penetration down the canopy floor. This is perhaps according to Leamer *et al.*, (12) in plant canopy infinite reflectance rather than transmittance increases with increasing leaf layer.

Although detailed investigation indirectly into canopies strongly focus onto the significance of light interception (14,16) in fruit crops such as apples practical or agronomic significance of canopy diameter and the impact of bearing heads on canopy spatial arrangement, spacing and yield requires further understanding. Whereas Knavel (8) and Zana *et al* (19) appreciated canopy diameter in mature muskmelon and Sweet potato to establish proper spacing, Huxley and Cannell (5) realized an efficient crop shape for coffee would be one in which there was good penetration of light through the canopy with erect branches well spaced in N to S orientation for proper light transmission.

Palmer (15) cited the classical works of Thomas Hilt (1755) to demonstrate the detrimental effects of too close canopy planting that will induce smothered under branches for want of sun light. However, how close should fruit trees stand to receive desired light is the interest of the present study on Ethiopian coffee at its center of origin. Similar concepts were reported on sweet potato canopy that shading was a primary cause of leaf shedding and loss of oldest leaves (19).

Therefore the purpose of the present study was to investigate whether the approved CBD resistant lines would vary with respect to canopy spatial arrangement and bearing surface and require different population densities for optimum yield under various growth condition.

MATERIALS AND METHODS

In an attempt to determine canopy spatial arrangement and characterize the morphology of 13 released CBD resistant coffee lines, 30 tree-plots were randomly surveyed in already established plantations of each cultivar grown at Gera (Highland, 1940m), Tepi (1000-12000m) and Bebeke (900-1000m low land). Plantations with similar ages were used to conduct the survey. It was laid out in Randomized Complete Block Design with three replications across locations. Canopy diameter (lateral extension growth) of individual trees was measured in four directions (east, west, south and north) and mean values were calculated for each plant, plot and cultivar.

In addition to canopy nature, the impact of number of bearing heads on canopy size and yield of individual plants of a cultivar and bearing heads as influenced by plant morphology (stem strength) were also surveyed and recorded on the same 30 tree-plots, but only at Gera, for three successive years.

Based on canopy measurements, three morphological classes consisting of different cultivars were identified and optimum spacings and the corresponding population densities were suggested for each class at a survey site. Furthermore, potential yields and canopy size, as affected by number of bearing heads, were estimated and training methods inducing optimum bearing heads were proposed based on the morphology and stem nature of cultivars in each canopy class at Gera. In most cases, coffee lines planted in 1976 and established at 1.25m x 2.50m spacings (3200 trees ha⁻¹) were used for the measurements taken during the last four years.

RESULT AND DISCUSSION

All the CBD resistant coffee lines showed significant difference ($p=0.05$) in their spatial arrangement across location (Table 1). Based on canopy measurements, the cultivars comprised three distinct morphological classes qualitatively identified as open (741, 744, 754, 75227), Intermediate (7440, 7454, 7487) and compact (74110, 74112, 74165, 74148, 74158) with respective mean canopy diameter ranging between 1.72-2.40m, 1.85-1.95m and 1.45-1.90m (Fig 1A)

As the result indicate, mean canopy diameter of open types was wider (2.06m) than that of intermediate (1.90m) and compact (1.67m) cultivars and it was observed that mean canopy extension of the three categories varied significantly ($p=0.05$) with location (Fig 1 ABC). The observed variation in spatial orientation of coffee lines revealed distinct inherent characteristic that require corresponding spacing based on its canopy and stem nature (Table 1). The present study is consistent with the works of Zana *et al* (19) who confirmed that canopy development is dictated by leaf number, area and branching habits.

Besides the inherent genetic potentiality, training methods with variable number of bearing heads significantly affected canopy spatial arrangement and coffee yield at Gera (Fig 2A) Accordingly, an increase in bearing head number was associated with a steady and slow increase in canopy diameter and significant ($p=0.05$) increases in coffee yields up to biological optima for each canopy class. However, unlike canopy size and total tree yield that increased linearly, yield per head was inversely related to vertical number (Fig 2B). The probable causes for decline in yield per bearing head with an increase in number of bearing heads per plant would be that most of the crop was borne on branches at the top part of the canopy while the middle and bottom branches usually didn't bear much crops and most of them suffered dark respiration and lower branch die-back because of limited transmission of sunlight down to the lower parts in the canopy. This is in agreement with works of Huxley and cannell (5). In this line Perraudin *et al* (17) acknowledged that dwarfing stocks were combined with close spacing and vigorous stock, with wide spacing in apples. In all cases wider spacing was associated with higher yields per tree and greater trunk diameter. However, the yields per unit area of land increased with closer spacing up to a limit not attainable (10). Upon close spacing the open coffee cultivars were out yielded by intermediate and compact lines in the same way compact lines out yielded the two classes (Table 2). This is in close agreement with the views of Mc Kenzie (11) who reported that vigorous plants could produce higher yields per tree but low yields per area upon closer spacing and Vice versa for compact lines.

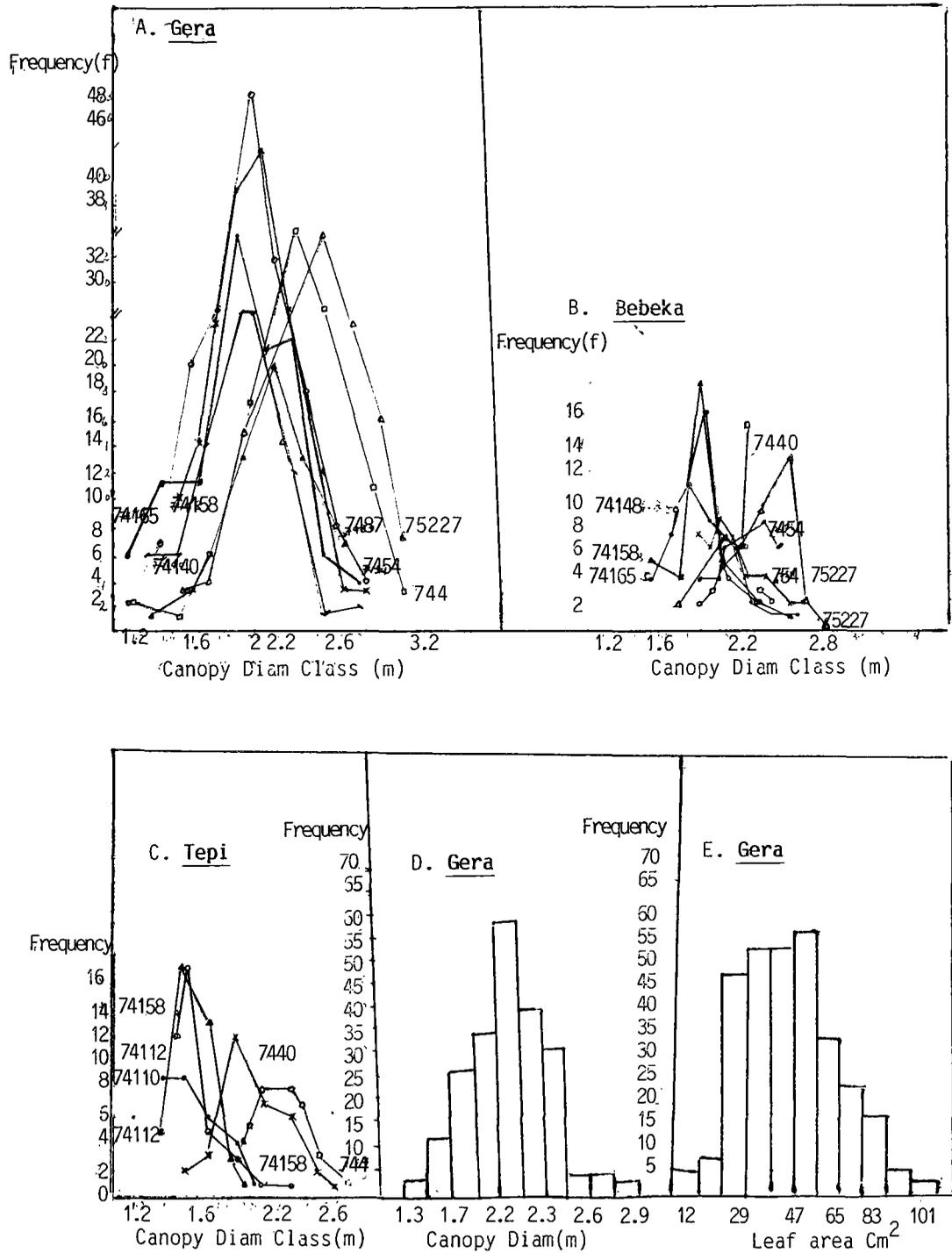


Fig 1 Frequency distribution of canopy diameter and class of open, compact and intermediate CBD lines at three ecological zones.

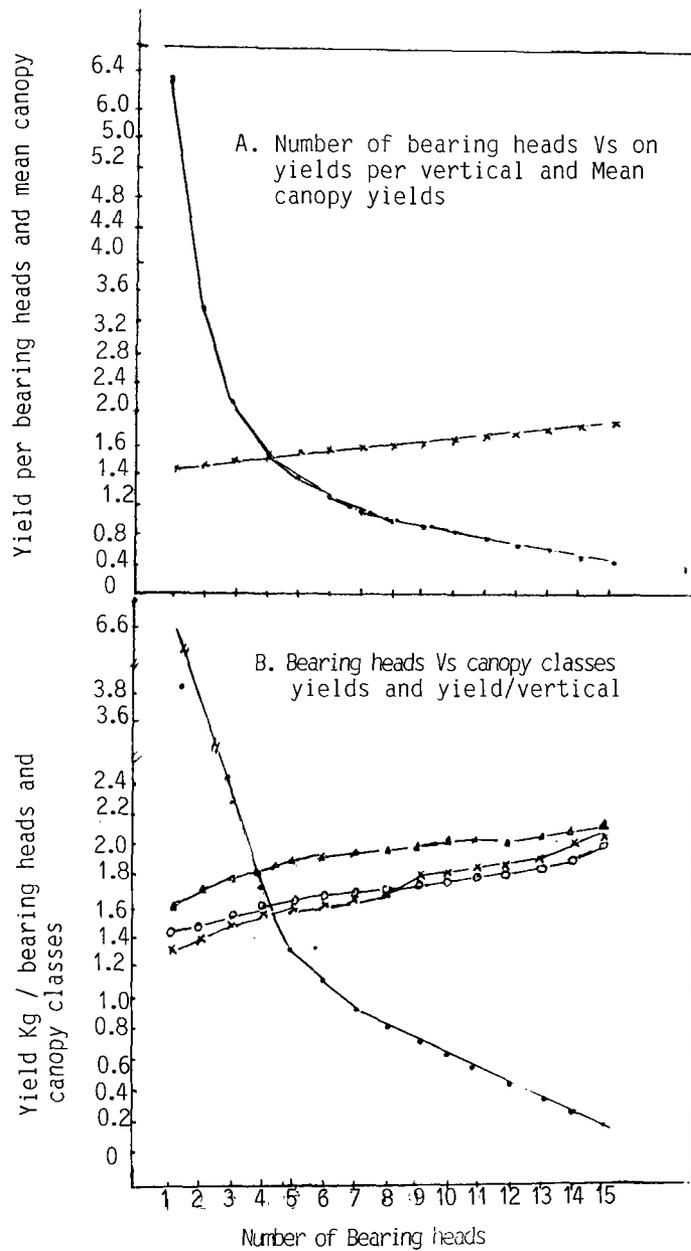


Fig 2 Comparison of a bearing head, canopy yield by number of Bearing heads. (Δ - Δ open, \circ - \circ intermediate, \times - \times compact, \bullet - \bullet bearing heads mean yields in kg)

Table 1 Indirect procedure to determine flexible and stiff stemmed CBD resistant lines for various pruning practices (Yield Kg/verticals clean coffee).

No of Verticals	Compact		Open		Intermediate	
	74110	74140	754	75227	7454	7492
1-2	7.02	5.88	5.73	4.96	9.83	4.1
3-4	9.19	7.12	5.89	5.72	9.68	4.0
5-6	8.15	7.50	7.54	6.40	10.73	5.1
7-8	8.26	7.20	4.98	2.60	11.63	7.0
9-10	10.77	8.44	5.37	4.78	10.35	7.0
11-12	8.70	8.76			9.62	
13-14	9.50	12.76				
15-16	11.56	8.07				
17-18	10.64	13.82				
19-20	10.25	9.02				
>21	11.24	6.48				
Mean	9.57	8.64	5.90	4.90	10.31	5.44
S.d.Dev.	1.45	2.50	0.98	1.43	0.78	1.49

Table 2 Observed variation among the three canopy classes as influenced by varying number of bearing heads at Gera (Kg/ha clean coffee)

Bearing heads	Canopy classes								
	Open			Intermediate			Compact		
	Yield	Canopy Diam	Pop ₁ ha	Yield	Canopy Diam	Pop ₁ ha	Yield	Canopy Diam	Pop ₁ ha
1-2	82.38 d	1.90	2770	97.43 d	1.71	3425	104.10 d	1.62	3831
3-4	86.08 c	1.98	2551	100.32 d	1.74	3300	112.35 c	1.66	3623
5-6	94.88 b	2.08	2310	104.90 c	1.84	2941	117.32 b	1.78	3125
7-8	107.13 a	2.09	2288	121.94 a	1.83	2985	117.43 b	1.83	2985
9-10	107.28 a	2.22	2028	111.32 a	1.88	2857	130.07 a	1.91	2740

Figures followed by the same latters are not significant $p < 0.05$.

On the other hand, some indications at Gera showed that coffee lines seemed to vary with stem strength and thus respond to training methods differently. In this line, the majority of compact cultivars are known to have flexible stems that can easily bend and produce multiple bearing heads. These cultivars are naturally suitable for "agoviado" type of training (bending) to induce more heads compared to less number of bearing heads often observed as a result of capping in open and intermediate cultivars possessing stiff stems (Table 2). This is so because according to Elfving and Forshey (3) limb spreading reduces vegetative growth and can be obtained by combining minimal pruning with careful branch spreading. In this regard 74110 and 74140 are flexible and 754, 75227, 7454 & 7492 stiff.

In general, optimum spacing between individual plants and the corresponding densities were suggested on the basis of morphological difference among the three canopy classes at various sites or altitudes (Fig 1 abcde). The result further suggest that compact coffee lines would be more suitable and productive if planted in closer spacings or higher densities than those possessing open canopies, yields of which gradually decline as a result of mutual shading or limited penetration of light into the overlapping canopy profile, specially when planted in high densities. Such a very dense vegetation (foliage) that close up the inter-spaces not only affect light interception by the canopy, but also favours multiplication of insect pests, the attack of some diseases, excessive death of lower branches (die-back) as a result of dark respiration and makes it difficult

for the application of conventional management practices in the stand and causes drastic decline in crop yield. The present work is also consistent with the general principle where mean yield per tree with increased verticals gradually increased but yields per vertical declined quite abruptly. In many fruit crops it is accepted that pruning must be done to avoid overlapping particularly in vigorous crops and obtain acceptable balance between growth and fruiting (20). However, it must be borne in mind that pruning exercises will lead to enhanced vegetative growth. According to Elfving and Forshey (3) Pruning vigorous apple branches may result directly in increased growth and a loss of fruitfulness that contribute to even greater growth. In *Coffea arabica*, therefore, canopy spread as it may be affected by morphology and bearing heads must be determined prior to spacing and pruning. Bearing heads and canopies as influenced by stem nature in coffee inversely dictate density and yield curvilinearly beyond biological optima and both determine spacing and yield in this crop.

SUMMARY

Three morphological canopy classes comprised cultivars 74110, 74112, 74158, 74165, 74148 (compact); 7454, 7440, 7487, 7492 (intermediate) and 75227, 744, 754, 741 (Open) with corresponding spacings of 1.60 x 1.60m, 1.80 x 1.80m and 2.00 x 2.00m for the three classes in that order if trained with one or two verticals.

Bearing heads and canopies are affected by stem nature, stiff or flexible, and they inversely dictate spacing and yield curvilinearly beyond biological optima. Hence, canopies and bearing heads determine ideal spatial and yields in arabica coffee at its centre of origin and diversification.

REFERENCES

1. Baldocchi, D.D. Shashi, B.V. and Dean, E.A. 1987. Canopy Photosynthesis and water use efficiency in a deciduous forest J.App.Ecol. (1987) 24: 251-260.
2. Cannell, A.G. 1974. Production and distribution of dry matter in trees of *Coffea arabica* L in Kenya as affected by seasonal climate differences and presence of fruits. Annals of appl. Biol 47: 99-120.
3. Elfving D.C. and C.G. Forshey 1976. Growth and fruiting responses of vigorous apple branches to pruning and branch orientation treatments J. Amer. Soc. Hort. Sci. 101(3) 290-293.
4. Huxley, P.A. 1967. The effects of artificial shading on some growth characteristics of arabica and Mrobusta coffee seedlings I. The effect of shading on dry weight, leaf area and derived growth data. J. Appl. Ecology 1967: 291-308.
5. Huxley P.A. Cannell A.G. 1970. Some physiological factors to be considered in intensification. Kenya Coffee Vol. 34(413): 176-179.
6. Jackson, J.E. 1978. Utilization of light resources by higher density planting of coffee. Kenya coffee Vol. 43(510): 263-271.
7. Kiara, J.M. 1981. Response of two coffee cultivars to spatial arrangements at high density planting Kenya coffee Vol. 46(546).
8. Knavel, Dean E. 1988. Growth, Development and yield potential of short internode Muskmelon. J.Amer. soc. Hort. Sc. 113(4): 595-599, 1988.
9. Kumar, D. 1978. Investigation into some aspects of high density planting of coffee Kenya coffee, Vol. 43(510): 263-271.
10. Kumar, D. 1979. Some aspects of the physiology of *Coffea arabica* L. A review, Kenya coffee Vol. 44(519): 9-41.
11. Mc Kenzie, D.W. 1971. Potential value of semiintensive apple orchards in Hawake's Bay CAB Annotated bibliography on High Density Planting No 6079(5). April. 1973.

12. Leamer, R.W., J.R. Noriega and C.L. Wiegand. 1978. Seasonal changes in reflectance of two wheat cultivars *Ag.J.* 70(1): 113-117.
13. Nunes, M.A. Bierhuize, J.F. and Ploegman 1968. Studies on productivity of coffee I. Effect of light, temperature and CO₂ concentration on photosynthesis of *coffea arabica* L. *Acta Bot. Neerl.* 17(2): April, 1968.
14. Palmer J.W. 1980. Computed effects of spacing on light interception and distribution within hedge row trees in relation to production *Acta Horticulturae* 114, 1981.
15. Palmer J.W. 1989. The effects of row orientation, tree height, time of year and latitude on light interception and distribution in model apple hedgerow canopies *J.Hort. Sci.* (1989) 64(2) 137-145.
16. Palmer J.W. and J.E. Jackson 1977. Seasonal light interception and canopy development in hedge row and bed system of Apple orchard *J. Appl. Ecology* (1977) 14, 539-549.
17. Perraudin, G. Rosselet F. and saugy R. 1969. Contribution a' letude des distances de plantation en fonction de la Viguer de sujet fruitiers de la varietie Golden Delicious *Rev. Suisse Vitie Arboric* 1969, 1: 54-57.
18. T schaplinski, J.J. and Terence J.B. 1989. Photosynthetic reinvigoration of leaves following shoot decapitation and accelerated growth of coppice shoots, *Physiol plantarum* 74: 157-165.
19. Zana, C. Somda and stanley, J. Kays 1990. Sweet potato Canopy morphology Leaf distribution *J.Amer. Soc. Hort. Sci.* 115(1): 39-45, 1990.
20. Verheij. E. W.M. 1969. Yield density relationships in apple results of a planting system experiment in Hungary publ. *Inst. Tuin b. Teeh. Wageningen* 37, pp 31.

L'IDENTIFICATION DES TOXINES DE *BACILLUS THURINGIENSIS* ACTIVES CONTRE *PERILEUCOPTERA COFFEELLA*

O. GUERREIRO FILHO *, P. DENOLF **, R. FRUTOS ***, M. PEFEROEN **, A. B. ESKES ****

* Seção de Genética, Instituto Agrônomo de Campinas (Brésil), boursier de la Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Adresse actuelle : CIRAD-CP, BP 5035, 34032, Montpellier Cedex 01, France. ** Plant Genetic Systems, J. Plateaustraat, 22, B-9000, Gand, Belgique. *** CIRAD-BIOTROP/IGEPAM. **** CIRAD-CP

1. INTRODUCTION

Bacillus thuringiensis (Bt) est une bactérie du sol qui produit des inclusions cristallines pendant sa sporulation, exhibant une haute activité d'insecticide spécifique (HÖFTE & WHITELEY, 1989). Les lignées de Bt qui portent ces cristaux protéiques, sont couramment décrites comme toxiques aux Lépidoptères (DULMAGE, 1981), Diptères (GOLDEBERG & MARGALET, 1977) et aux Coléoptères (KRIEG *et al.*, 1983).

Les gènes connus jusqu'à présent ont été classés par HÖFTE & WHITELEY (1989) en quatre groupes, par rapport à la structure et au spectre insecticide de leurs protéines. Ces groupes sont décrits comme: **groupe I**, gènes spécifiques contre les Lépidoptères; **groupe II**, gènes spécifiques contre les Lépidoptères et contre les Diptères; **groupe III**, gènes spécifiques contre les Coléoptères et **groupe IV**, gènes spécifiques contre les Diptères. Chez le groupe I, composé par les gènes avec activité spécifique contre les Lépidoptères, plusieurs lignées ont été identifiées avec différents spectres insecticides (JARRETT & BURGESS, 1986; KALFON & DE BARJAC, 1985; LECADET & MARTOURET, 1987).

Les cristaux protéiques sont des prototoxines qui exigent une solubilisation et activation protéolytique dans l'intestin moyen des insectes. La toxine activée se lie à des récepteurs membranaires des cellules de l'épithélium intestinal (HOFMANN *et al.*, 1988a; VAN RIE *et al.*, 1990a) et détruit ces cellules (ENDO & NISHIITSUTSUJI, 1980).

D'après BRAVO **et al.**, (1991), les récepteurs existants dans la pilosité de la membrane extérieure (PME) de l'intestin moyen, sont des facteurs clés dans la détermination de la spécificité des protéines toxiques de **Bt** contre les Lépidoptères. L'analyse immunocitochimique a été utilisée par les auteurs pour décrire les liaisons spécifiques de plusieurs toxines activées **in vitro** avec les sections de tissus de différentes espèces de Lépidoptères et de Coléoptères.

La corrélation entre la toxicité et la liaison des toxines à la membrane de l'épithélium intestinal des Lépidoptères, a été mise en évidence par plusieurs auteurs (HOFMANN **et al.**, 1988a; VAN RIE **et al.**, 1990b; FERRÉ **et al.**, 1991).

La mineuse des feuilles du caféier, **P. coffeella** (Lepidopterae), est un des plus importants ravageurs de la culture du café (PARRA, 1985). Les pertes de production dues à cet insecte sont souvent très élevées (ALMEIDA, 1973). L'objectif du présent travail est d'appliquer la méthodologie de par BRAVO **et al.**, (1991) pour identifier les liaisons toxines-récepteurs des intestins de **P. coffeella**, et de vérifier l'activité toxique de ces protéines a été confirmé par l'utilisation de bioessais.

2. MATERIEL ET METHODE

Materiel

Les larves de **P. coffeella** proviennent de deux origines différentes. La première, du Brésil (**PcBr**), élevées sur feuilles du caféier dans l'insectarium du CIRAD, d'après la méthodologie décrite par KATIYAR & FERRER (1968) et la deuxième, de Madagascar (**PcMa**), récoltées dans des conditions naturelles d'infestation au champ.

Les δ -endotoxines de **Bt** utilisées ont été celles du groupe I décrites par HÖFTE & WHITELEY (1989) comme spécifiques contre des Lépidoptères: CryIA(a), CryIA(b), CryIA(c), CryIB, CryID et CryIE. Les différentes toxines utilisées **in vitro** ont été obtenues à partir de l'expression des gènes recombinants présents en *Escherichia coli*. Des purifications et activations des protéines d'après méthodes spécifiques sont nécessaires pour chacune (BRAVO **et al.**, 1991). Pour les bioessais, les différentes souches de **Bt** ont été cultivées et après la lise complète, les cristaux ont été récoltés après séparation en gradient de renografine. La concentration de chacun de ces cristaux a été déterminée après leur solubilisation en tampon alcalin.

Les anticorps monoclonaux ou polyclonaux utilisés pour la réaction avec les fragments toxiques de chacune des toxines sont: le 4D₆ contre les toxines CryIA(a), CryIA(b) et CryIA(c); le 22A₂F₁ contre CryIB; le 16A₅E₄ contre CryIE; et le polyclonal R₀Bt₄, contre CryID. Tous les anticorps ont été fournis par **Plant Genetics Systems**. La solution d'anticorps utilisée contenait 1mg/ml d'anticorps contre les différentes toxines.

Préparation des sections histologiques

Les larves de **P. coffeella** ont été fixées en Bouin Hollandes's 10% sublimate fixative et après une incubation de 30 minutes, la solution a été renouvelée. Les insectes sont restés durant 24 heures dans cette solution et ont ensuite été lavés dans l'eau distillée pendant 12 heures.

La déshydratation des tissus et inclusion en paraffine a été réalisée dans la séquence suivante: éthanol 70% (1 heure), éthanol 96% (2 heures), éthanol

100% (2 heures, 2 fois) et l'inclusion en xylol/éthanol (50/50 v/v, 1 heure), xylol 100% à 56% (1 heure), xylol/paraplaste (50/50 v/v, 12 heures) et paraplaste 100% (2 heures, 2 fois). Ensuite les larves ont été fixées en paraplaste.

Des sections histologiques longitudinales et radiales de 5 μ m d'épaisseur des intestins de larves de **PcBr** et **PcMa** ont été préparées en utilisant un microtome LKB-Historange et en fixant les sections à les lames avec l'utilisation d'une solution poli-L-Lysine (1mg/ml). Ensuite les lames ont été gardées pendant 72 heures en étuve à 40°C.

Analyse immunocytochimique

Les tissus ont été déparaffinés et hydratés par leur immersion dans le xylol 100%, suivi d'une seconde à l'éthanol 100% et pour finir à l'eau distillée. Le sublimé a été enlevé par l'immersion des tissus dans une solution de lugol suivi par l'immersion dans le thiosulfate de sodium 5%. Les sections ont été ensuite lavées dans l'eau distillée et équilibrées en tampon tris salin triton, pH 7,6.

Après l'équilibre des sections en tampon tris salin triton (**TST**), les lames ont été placées dans une chambre d'humidité en température ambiante (\pm 21°C) et incubées avec 0,3ml de la solution de toxines pendant une heure. Les concentrations de 10 μ g/ml et 15 μ g/ml ont été utilisées pour toutes les toxines. Les concentrations de 1 μ g/ml et 5 μ g/ml ont également été utilisées pour les toxines CryIA(c) et CryIB après qu'elles se soient montrées efficaces. Ensuite, la solution a été éliminée et la toxine non liée a été lavée avec 0,5 μ l de tampon (**TST**) pendant une minute.

Pour la détection de la liaison in vitro, les tissus ont d'abord été incubés avec 0,3 ml de solution d'anticorps primaires (Monoclonal pour CryIA(a), CryIA(b), CryIA(c), CryIB et CryIE et polyclonal pour CryID, pendant 8 à 16 heures. La solution a été renouvelée après cette période et les tissus lavés avec 0,5 ml de tampon (**TST**) pendant une minute et les lames ont été placées dans un support horizontal et plongées pendant une minute dans une solution du tampon tris 0,5 M, pH 7,6 et ensuite, incubées pendant environ 15 minutes dans une solution de diaminobenzidine pour la révélation de la peroxydase. Les anticorps RAM-PO (rabbit anti-mouse lié à peroxydase) et GAR-PO (Goat anti-rabbit lié à peroxydase) ont été respectivement utilisés contre les anticorps monoclonaux et polyclonaux primaires.

Les tissus ont été déshydratés en mettant les lames dans l'éthanol 70%, l'éthanol 100% et pour finir dans le xylol 100%. Une goutte d'entellan (Merck) a été ajouté ensuite dans chaque lame et les tissus ont été couverts avec une lamelle.

Bioessais

D'après TAPLEY (1961), une autre mineuse des feuilles du caféier, **Leucoptera meyricky**, est sensible à l'action de **Bt** mais difficilement atteinte par la bactérie, une fois qu'après l'éclosion les larves percent l'épiderme, sans entrer en contact avec l'insecticide déposé sur les feuilles. Pour éviter ce problème, les solutions toxiques ont été introduites dans le mésophyle foliaire de disques de feuilles de la variété Catuaí Vermelho de **C. arabica** à l'aide d'une seringue sans aiguille. Cette méthode, proposée par HARBORG (1970) et modifiée par MAZZAFERA et ESKES (1987), permet le contact des larves du premier stade avec les toxines.

Dans les bioessais réalisés, trois plantes avec 10 ou 12 paires de feuilles ont été introduites journalièrement dans les cages d'élevage d'insectes et le lendemain matin, remplacées par d'autres. Un jour avant l'éclosion des larves, les solutions de différentes concentrations de chacune des toxines de **Bt**, ont été introduites dans les disques de feuilles. Ces disques ont été placés avec l'épiderme inférieur vers le bas, en contact avec une éponge humidifiée, pour permettre une diffusion des solutions et deux heures après, retournés pour permettre l'évaporation de l'eau excédante

Les concentrations de 0.01, 0.1, 1.0, 10.0 et 100.0 $\mu\text{g/ml}$ ont été utilisées pour l'évaluation de l'efficacité des toxines Cry IA(c), Cry IB, Cry ID et Cry IE. Pour Cry I A(b) la concentration 1000.0 $\mu\text{g/ml}$ a également été utilisées. Pour chaque bioessai deux traitements témoins ont été utilisés. Dans un premier, les disques n'ont subi aucun traitement et dans le deuxième une infiltration a été faite avec de l'eau distillée.

Chaque traitement a été composé par 10 disques de feuilles portant chacun 5 oeufs de **P. coffeella**, et chaque bioessai a été répété 3 fois. La mortalité des larves à été vérifiée six jour après l'inoculation des solutions toxiques et les données utilisées pour le calcul de la CL_{50} .

3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

Analyse immunocytochimique. Les premières observations ont été réalisées en section longitudinales de **PcBr** avec l'objectif de vérifier l'existence des endroits spécifiques de liaison dans toute la longueur de l'intestin moyen. Les toxines Cry(a), CryIA(b) et CryID, ne se sont pas liées aux microvillosités de l'intestin. Par contre, des réponses positives, ont été observées avec les toxines CryIA(c), CryIB et CryIE qui se sont liées aux microvillosités sur toute la longueur de l'intestin (Tableau 1). Par conséquence, pour les répétitions et pour les tests avec **PcMa**, des sections radiales d'insecte ont été utilisées.

Les informations sur l'espèce mineuse des feuilles du caféier présente à Madagascar sont assez controversées. D'après LEPELLEY (1968) n'existe pas jusqu'à présent une certitude sur quel est l'espèce mineuse présente dans l'île Malgache. Il n'y a pas eu des différences entre les résultats observés dans les sections radiales de **PcMa** en comparaison aux sections radiales de **PcBr**, mais ses données ne sont pas suffisantes pour éclaircir cette question.

La coloration observée dans les microvillosités lorsque l'utilisation des toxines CryIA(c) et CryIE, a été plus intense que la coloration observée dans CryIB. Par rapport aux différentes concentrations utilisées, un comportement identique a été vérifié entre les toxines qui se sont liées à la pilosité de la membrane extérieures. Des liaisons entre les toxines Cry IB et Cry IA(c), ont également été vérifiées à concentration de $1\mu\text{l/ml}$ mais, la coloration observée dans les microvilli a été moins intense que les autres (5, 10 et $15\mu\text{l/ml}$).

Bioessais. Les toxines Cry IA(b) et Cry ID ne se sont pas montrées actives dans les bioessais réalisés avec les larves de **P. coffeella**, les mortalités étant comparables a celles des témoins, soit 5% environ. Par contre, les toxines CryIB et CryIA(c) se sont révélées très toxiques envers les larves (Tableau 2).

Sans avoir une méthode efficace et bien précise pour calculer les doses létales (DL_{50}) des toxines inoculées dans chaque disque de feuille et les taux de toxine ingérées par les larves, les concentrations létales (CL_{50}) ont été utilisées comme paramètre pour mettre en évidence l'efficacité des toxines.

L'infiltration des solutions toxiques a été faite au troisième jour après les pontes, soit la veille de l'éclosion des larves. Nous avons vérifié que CryIA(c) a été plus toxique que CryIB. La plus grande sensibilité de la mineuse à Cry IA(c) pourrait être expliquée soit par l'existence d'un nombre plus élevé de sites de liaison chez l'intestin des larves, soit par une affinité plus élevée entre la toxine et les sites de liaison. Ces résultats sont parfaitement comparables aux résultats obtenus *in vitro* à travers la réaction immunocytochimique et mettent en évidence la corrélation existante entre les deux méthodes d'évaluation.

Des essais préliminaires ont montré qu'environ 1 μ l de solution est infiltré par 0.003 g de feuille. Les résultats ont montrés que la CL_{50} pour Cry IA(c) a été de 1,47 μ g/ml, soit environ 36 ng de toxine/mg de protéine total du disque de feuille. D'après VAECK *et al.* (1987), 30 ng de toxine/g de protéine total de la feuille assure une protection complète de *Nicotiana tabacum* contre *Manduca sexta*. Nos résultats sont de l'ordre de 1/1000 par rapport aux résultats présentés par VAECK *et al.* (1987), mais il faut considérer que les solutions toxiques quand elles sont infiltrées, elles atteignent le mésophyle foliaire et les larves se nourrissent du parenchyme palissadique (CROWE, 1964). A peine une parti de la solution toxique est diffusée vers ce tissu, ce qui pourrait expliquer les différences vérifiées.

Des références sur la toxicité de certains produits commerciaux à base de Bt à la mineuse des feuilles du caféier ont été déjà répertoriées par TAPLEY (1961) et ESKES *et al.*, (1986), sans faire aucune référence aux toxines responsables pour cette toxicité. Dans les études développées par ces derniers auteurs, l'infiltration sous vide de l'insecticide Dipel dans disques des feuilles a été efficace pour le contrôle de *P. coffeella*. D'après HÖFTE & WITHELEY (1989), l'insecticide Dipel présente les toxines Cry IA(a), Cry IA(b), Cry IA(c), Cry IIA et Cry IIB. La toxicité de ces deux toxines du groupe II vis-à-vis de *P. coffeella* n'a pas été étudié, mais Cry IA(c) a été très toxiques ce qui pourrait déjà expliquer l'efficacité de Dipel.

Il existe d'après BRAVO *et al.*, (1991) une corrélation entre la toxicité des protéines de Bt et la liaison *in vitro* de ces toxines avec les microvilosités apicales dans les sections des tissus. HOFMANN *et al.* (1988b) et VAN RIE *et al.* (1989) ont aussi démontré une corrélation entre toxicité et liaison de protéines toxiques avec la pilosité de la membrane extérieure. Jusqu'à présent, l'efficacité des toxines Cry IA(a) et Cry IE n'a pas été évaluée, mais d'après les données obtenues, les gènes codant pour les toxines CryIA(c) et CryIB pourraient déjà être considérés comme efficaces et d'utilisation possibles dans un programme de transformation génétique du caféier.

4. BIBLIOGRAPHIE

- ALMEIDA, P.R. O "bicho mineiro do cafeeiro" *Perileucoptera coffeella* (Guérin - Méneville) como fator de restrição na produção do cafeeiro. In: **Reunião Anual da Sociedade Entomológica do Brasil**, 1., Viçosa, 1973, Resumos, p.31.
- BRAVO, A., HENDRICKX, K., JANSSENS, S. & PEFEROEN, M. Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes (enviado para publicação, 1991).
- CROWE, T.J. Coffee leaf miners in Kenya. I - Species and life Histories. **Kenya Coffee**, 29:173-183, 1964.
- DULMAGE, H.T. Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential control. In: "Microbial control of pests and plant diseases 1970/1980" H.D. BURGESS, Ed. pp.193-222, Academic press, New York.
- ENDO, Y. & NISHIITSUJI-UWO, J. Mode of action of *Bacillus thuringiensis*: histopathological changes in the silkworm midgut. **J. Invertebr. Pathol.**, 36: 90-103, 1980.
- ESKES, A.B., GUERREIRO FILHO, O. & RAMOS, L.C.S. Efeito de *Bacillus thuringiensis* sobre o desenvolvimento do bicho mineiro em testes de laboratório. 13º Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, São Lourenço, Minas Gerais, Brasil, 2-5 déc. 1986, Instituto Brasileiro do Café (Rio de Janeiro), p. 15-16.
- FERRÉ, J., REAL, M.D., VAN RIE, J., JANSSENS, S. & PEFEROEN, M. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in midgut membrane receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 88: 5119-5123, 1991.
- GOLDBERG, L.J. & MARGALIT, J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergenti*, *Urana tenia unguiculata*, *Culex univattus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiensis*. **Mosq. News**, 37: 355-358, 1977.
- GUERREIRO FILHO, O. Avaliação da resistência de *Coffea* spp a *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Meneville, 1842) (Lepidoptera-Lyonetiidae), Campinas, SP, 118p. 1989. Tese [mestrado].
- HARBORG, W.A.F. A device for injecting solution and suspension into thin leaves of plants. **Can. J. Botany**, 48: 1135-1136, 1970.
- HOFMANN, C., VANDERBRUGGEN, H., HÖFTE, H., VAN RIE, J., JANSSENS, S. & VAN MELLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 85: 7844-7848, 1988b.
- HOFMANN, C., LÜTHY, P., HÜTTER, R. & PLISKA, V. Binding of the delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush border membrane vesicles of the cabbage butterfly *Pieris brassicae*. **Eur. J. Biochem.**, 173: 85-91, 1988a.
- HÖFTE, H. & WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological reviews**, 53: 242-255, 1989.
- JARRETT, P. & BURGESS, H.D. *Bacillus thuringiensis*: tailoring the strain to fit the pest complex on the crop. **British Crop PROTECTION Council**, 34:259-264, 1986.

- KALFON, A.R. & DE BARJAC, H. Screening of the insecticidal activity of *B. thuringiensis* strains against the Egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis*. *Entomophaga*, **30**:176-185, 1985.
- KATIYAR, K.P. & FERRER, F. Rearing Technique biology and sterelization of the coffee leaf miner, *Leucoptera coffeella*, Guér (Lepdoptera-Lyonetiidae) In: International Atomic Energy Agency, **Viena IAEA**, p.165-175, 1968.
- KRIEG, A., HUGER, A.M., LANGENBRUCH, G.A. & SCHENETTER, W. *Bacillus thuringiensis* var. *tenibrionis*: in neuer gegenuber larven von coleopteren wirksamer pathotyp. *Z. Angew. Entomol.* **96**: 500-508, 1983.
- LECADET, M.M. & MARTOURET, D. Host specificity of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin toward lepidopteran species: *Spodoptera littoralis* Bdv. and *Pieris brassicae* L. *J. Invertebr. Pathol.* **49**: 37-48, 1987.
- LE PELLEY, R.H. Pests of coffee. Tropical Sciences Series. Longmans Ed. London. 590p. 1968.
- MAZZAFERA, P. & ESQUES, A.B. Comparação de dois métodos para infiltração de substâncias no mesófilo de folhas de cafeeiro. 14° Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 1° Congresso Latino Americano de Tecnologia Cafeeira, Campinas, São Paulo, Brasil, 1-4 déc. 1987, Instituto Brasileiro do Café (Rio de Janeiro), p. 113-114.
- PARRA, J.R.P. Biologia comparada de *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Meneville, 1842) (Lepidoptera - Lyonetiidae) visando ao seu zoneamento ecológico no Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Entomologia*, **29**(1): 45-76, 1985.
- TAPLEY, R.G. Microbial control of lepidopteran coffee pests. *Kenya Coffee*, Nairobi, **26**(306): 213-217, 1961.
- VAECK, M., REYNAERTS, A., HÖFTE, H., JANSENS, S., DE BEUCKLEER, M., DEAN, C., ZABEAU, M., VAN MONTAGU, M. & LEEMANS, J. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*, **328**:33-37, 1987.
- VAN RIE, J., JANSENS, S., HÖFTE, H., DEGHEELE, D. & VAN MELLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta endotoxins importance of specific reception on the brush border membrane of the midgut of target insects. *Eur. J. Biochem.*, **186**: 239-247, 1989.
- VAN RIE, J., MCGAUGHEY, W.H., JOHNSON, D.E., BARNETT, B.D. & VAN MELLAERT, H. Mechanism of insect resistance to the microbial *Bacillus thuringiensis*. *Science*, **247**: 72-74, 1990a.
- VAN RIE, J., JANSENS, S., HÖFTE, H., DEGHEELE, D. & VAN MELLAERT, H. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinant of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**: 1378-1385, 1990b.

Tableau 1. Analyse immunocytochimique des liaisons *in vitro* de six toxines de *B. thuringiensis* avec les sections d'intestins moyennes de populations de *P. coffeella* de deux différentes origines géographiques.

TOXINE	CONCENTRATION ($\mu\text{l/ml}$)	ANTICORPS PRIMAIREs ($1\mu\text{l/ml}$)	ANTICORPS SECONDAIREs (1:200)	ORIGINE DES INSECTES	
				Br	Ma
CryIA(a)	0			-	-
	10	4D ₆	RAM-PO	-	-
	15			-	-
CryIA(b)	0			-	-
	10	4D ₆	RAM-PO	-	-
	15			-	-
CryIA(c)	0			-	-
	1			+	+
	5	4D ₆	RAM-PO	++	+
	10			++	+
	15			++	+
CryIB	0			-	-
	1			+	+
	5	22A ₂ F ₁	RAM-PO	++	+
	10			++	+
	15			++	+
CryID	0			-	-
	10	R α Bt ₄	GAR-PO	-	-
	15			-	-
CryIE	0			-	-
	10	16A ₅ E ₄	RAM-PO	+	+
	15			+	+

P. coffeella provenant du Br: Brésil et Ma : de Madagascar.

Tableau 2. Concentrations létales des toxines CryIA(c) et CryIB déterminées contre larves de la mineuse des feuilles du caféier, *P. coffeella*.

Toxine	Concentration Létale (CL)	Moyenne	Intervalle de Confiance
		$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$
CryIA(c)	20	0.20	0.075-0.526
	50	1.47	0.718-3.014
	90	30.86	7.427-128.240
CryIB	20	1.77	0.772-4.071
	50	21.93	11.101-43.333
	90	1010.6	217.768-4689.709

Resumé. *Bacillus thuringiensis* est une bactérie du sol caractérisée par la production d'un corps d'inclusion parasporal, le cristal, durant la sporulation. Ces corps d'inclusions sont constitués de protéines présentant une activité insecticide spécifique. Les cristaux libèrent après dissolution des protoxines qui requièrent une activation par des protéases du tube digestif de l'insecte. La toxine activée se lie à un récepteur spécifique présent à la surface membranaire des cellules de l'épithélium intestinal et après internalisation dans la membrane génère la formation d'un pore. Les récepteurs présents à la surface externe de la membrane des cellules épithéliales de l'intestin sont des éléments clés pour la détermination de la spécificité des endotoxines de *Bt* pour les Lépidoptères. La toxicité d'une protéine du cristal est étroitement liée à la reconnaissance préalable d'un récepteur au niveau de microvillosités apicales du tissu intestinal. Cette affinité peut être mise en évidence par une analyse immunocytochimique. Cette technique a été employée pour déterminer la présence de liaisons spécifiques entre différentes toxines de type CryI et le tissu intestinal de la mineuse des feuilles du caféier, *Perileucoptera coffeella*. Les toxines CryIA(a), CryIA(b) et CryID, ne se sont pas liées aux microvillosités apicales. Des réponses positives ont été observées avec les toxines CryIA(c), CryIB et CryIE sur la totalité de la longueur du tube digestif. Les toxines CryIA(c), CryIB et CryIE, peuvent être considérées comme potentiellement actives et les gènes correspondant pourraient être utilisés dans un programme de transformation génétique du caféier. Cependant, ces résultats doivent être confirmés et affinés. L'activité toxique de ces protéines est actuellement vérifiée et quantifiée par des tests de toxicité sur insecte.

Abstract . *Bacillus thuringiensis* is a soil bacterium characterized by the production of a parasporal inclusion body, the crystal, during sporulation. Inclusion bodies are made of specific insecticidal proteins. Protoxins are released from solubilized crystals and must be activated by midgut proteases to be toxic. The activated toxin binds to a specific receptor located at the surface of the membrane of gut epithelial cells and after integration into the cell membrane leads to the formation of a pore. Receptors at the external side of the gut epithelial cells membrane are essential factors for determining the specificity of *Bt* endotoxins to Lepidoptera. The *in vivo* toxicity of crystal proteins is determined by the recognition of the receptors on microvilli of the gut tissue. This affinity can be evaluated through an immunocytochemical approach. This technique was used to determine the presence of specific binding between CryI type toxins and gut tissue of the coffee leaf miner, *Perileucoptera coffeella*. CryIA(a), CryIA(b) and CryID did not bind to midgut microvilli of *P. coffeella*. However, affinity was observed with CryIA(c), CryIB and CryIE all over the gut. CryIA(c), CryIB and CryIE might be considered as potentially active and the corresponding genes could be used for genetic transformation of coffee. These results are currently being verified by bioassays.

RÉSISTANCE DE QUELQUES DESCENDANCES DE *COFFEA ARABICA* ET *C. CANEPHORA* VIS-À-VIS DE DEUX POPULATIONS DE *MELOIDOGYNE* SPP., ORIGINAIRES DU GUATEMALA ET DU BRÉSIL

F. ANZUETO *, A. B. ESKES **, J. L. SARAH ***, B. DECAZY **

* ANACAFE, 5a. Calle 0-50 Zona 14, Guatemala

** CIRAD-CP, B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

*** CIRAD-FLHOR, B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

1. INTRODUCTION

On rappellera que des graves problèmes sont provoqués par les nématodes *Meloidogyne* spp au Brésil et Amérique Centrale (SASSER, 1979). Les dégâts provoqués par ces nématodes vont des symptômes presque imperceptibles jusqu'à la dégénérescence de la plante, voire la mort. Dans certaines régions, la culture d'arabica demande impérativement des mesures de contrôle.

A ce propos, il existe un consensus dans les pays d'Amérique Centrale sur la gravité du problème posé par les nématodes, et sur la priorité qu'il faut donner à la recherche sur la résistance variétale comme meilleure alternative économique pour la maîtrise de ces parasites.

Du fait que les gènes de résistance à *Meloidogyne* peuvent être de type spécifique, les génotypes de caféier devront être évalués également vis-à-vis de plusieurs espèces et/ou souches du nématode, notamment à l'égard des espèces signalées comme les plus agressives.

D'autre part, les résultats obtenus dans les études précédentes (ANZUETO et al., 1991), ont montré l'intérêt d'une meilleure compréhension de l'héritabilité de la résistance chez les origines éthiopiennes de *Coffea arabica*.

La présente communication expose et discute une partie des travaux réalisés au Laboratoire de Nématologie du CIRAD, Montpellier, dans le but d'étudier la variabilité génétique pour la résistance à *Meloidogyne* spp. au sein de *C. arabica* et de *C. canephora*. Ce travail présente la comparaison de la résistance du caféier vis-à-vis de deux populations différentes de

Meloidogyne spp., et l'étude des descendance F2 de C. arabica issues de pollinisation libre de plantes F1 existant au champ au Cameroun.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1 Le matériel végétal

- Origines Ethiopiennes de C. arabica.

Les lignées expérimentales sont issues de graines obtenues par fécondation libre, récoltées sur des plantes de C. arabica dans la collection de l'Institut de Recherches Agronomiques du Cameroun (IRA) à Foumbot. Il s'agit de lignées d'origine semi-spontanée d'Ethiopie collectées par une mission ORSTOM-IRCC en 1966 (CHARRIER, 1978).

- Descendance F2 de C. arabica

Pour la création des hybrides F1, un des géniteurs choisis était la variété Caturra, mutant nain du cultivar bourbon de C. arabica. Cette variété est largement cultivée en Amérique Latine et est très sensible aux principales maladies et parasites qui s'attaquent au caféier, y compris les nématodes. La variété Java, sélection de C. arabica réalisée au Cameroun (BOUHARMONT, 1992), a également été évaluée dans cet essai, aussi bien comme géniteur, que comme variété. Parmi les éthiopiens, cinq géniteurs notés comme résistants dans les essais précédents ont été choisis (ET 6, ET 20, ET 25, ET 50 et ET 54), pour permettre une étude de la ségrégation dans la F2.

- Autre origines de C. arabica

Huit descendance de Catimor d'origine colombienne (collection du CATIE), et une descendance originaire du Portugal ont été évaluées. A ce propos, MORERA (1990) signale une certaine résistance à M. exigua dans quelques lignées de Colombie.

Au Brésil, la variété Amphylo et la variété Sarchimor sont signalées comme résistantes à certaines populations de M. exigua et M. incognita (GONCALVES, 1992). Il a donc paru opportun de tester ces sources de résistance à l'égard de la souche guatémaltèque de Meloidogyne sp.

- Descendance de Robusta (C. canephora)

Plusieurs descendance de pollinisation libre de C. canephora ont été utilisées. Ce matériel provient de la collection du CATIE, Turrialba (Costa Rica). Cette collection a fourni plusieurs génotypes de caféier à plusieurs pays, pour l'étude et la recherche de sources de résistance concernant différents maladies et parasites du caféier. Ce fut le cas du génotype T 3561 du cv. Robusta (C. canephora), utilisé par les chercheurs brésiliens pour la sélection du porte-greffe Apoata (LC 2258), résistant à Meloidogyne spp (FAZUOLI et al., 1987).

- La variété Catuai de C. arabica, témoin privilège dans nos travaux, a été également fourni par le CATIE. Il s'agit d'une lignée fixée, issue d'une hybridation intraspécifique (CARVALHO & MONACO, 1972). Cette variété est largement cultivée au Brésil et dans d'autres pays d'Amérique Latine pour ses qualités agronomiques (nanisme, productivité), bien qu'elle soit très sensible

aux nématodes, comme la plupart des variétés cultivées de C. arabica.

2.2 Les nématodes utilisés (Meloidogyne spp.)

La souche 1 provient de racines fortement attaquées de C. arabica cv. Catuai prélevées au champ au Guatemala. Une culture pure développée à partir d'une seule masse d'oeufs a été multipliée et utilisée ensuite pour nos expériences. Les résultats de l'analyse des isoenzymes la rapprochent du phénotype enzymatique "F1" (ESBENSHADE & TRIANTAPHYLLOU, 1985). Plusieurs populations de Meloidogyne prélevées sur caféier dans des pays différents présentent le même phénotype "F1", mais, ces populations appartiennent à des espèces non décrites (JANATI et al., 1982 ; SANTOS & HIRSCHMANN TRIANTAPHYLLOU, 1992).

La souche 2 provient du Brésil (Sao Paulo). Elle est appelée localement comme Meloidogyne incognita. Cependant, l'identification morphologique faite par le C.A.B. International nous indique qu'il s'agit d'une espèce (ou sous-espèce) différente de M. incognita et différente de l'espèce du Guatemala. Toutefois cette population est signalée comme très agressive sur les caféiers de C. arabica au Brésil.

2.3 Conduite des essais

Lorsque les plants de caféiers issus de semis ont atteint le stade "petit soldat", environ 50 jours après le semis, ils sont repiqués dans des pots en matière plastique, remplis avec un mélange de terreau et de sable (proportion 2:1, pH : 5.5). Les plantes sont inoculées environ quatre semaines après le repiquage.

L'inoculum, sous forme d'oeufs, est récupéré des racines de tomate infestées selon la technique de HUSSEY & BAKER (1973). Le jour précédant les inoculations, les plantes sont arrosées au point de saturation du sol. Après son dosage, l'inoculum est déposé au niveau du collet de chaque plantule à l'aide d'une micropipette, le volume de la suspension appliqué est de 3 ml.

Les origines éthiopiennes ont été inoculées avec une dose de 1500 oeufs par plante et la période d'incubation retenue est de 4 mois ; cinq plants sont testés par lignée. Pour les descendances F2, nous avons retenu la même dose et la même période d'incubation, en utilisant trente-deux plants par descendance. En ce qui concerne les descendances de C. canephora, nous avons utilisé une dose de 800 oeufs par plante et une période d'incubation de 6 mois ; vingt plants par descendance ont été inoculés avec la souche 1, et huit plants par descendance avec la souche 2.

Le nombre de masses d'oeufs est le principal critère retenu dans notre démarche expérimentale, pour le classement des plantes d'après leur réaction. Les notations portent sur les indices de masses d'oeufs par plante et correspondent à l'échelle proposée par TAYLOR & SASSER (1978) : 0 = 0 masses d'oeufs ; 1 = 1-2 ; 2 = 3-10 ; 3 = 11-30 ; 4 = 31-100 ; 5 = + 100.

Du fait que les essais présentent une grande hétérogénéité des variances (pour la variable nombre de masses d'oeufs), le test de KRUSKAL & WALLIS est utilisé. Si le test s'avère significatif, on compare ensuite les

rangs moyens des traitements à l'aide d'un calcul proposé par le logiciel STATITCF (test de Mann et Whitney).

Un test de KHI2 est réalisé sur les données des descendance hybrides, F2, pour l'étude de l'héritabilité de la résistance chez les origines éthiopiennes.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Origines éthiopiennes

Des études précédentes ont montré que sur 89 lignées éthiopiennes testées, 67 % des lignées se présentent comme uniformément très résistantes. Ces lignées sont probablement homozygotes pour un ou plusieurs gènes majeurs de résistance ; 26 % sont en ségrégation, et 7 % des lignées se présentent comme sensibles à l'égard de la souche guatémaltèque. On constate donc la prédominance de lignées uniformément résistantes, mais aussi un pourcentage non négligeable de lignées en ségrégation. Quelques lignées présentent des plantes avec une résistance intermédiaire, occupant la classe 2 ou 3 de l'échelle ; ceci pourrait indiquer la présence de gènes mineurs.

Le tableau 1 présente, pour certaines lignées testées avec les deux souches de nématodes, le classement des plantes selon l'échelle de TAYLOR & SASSER. Les lignées ET 31, ET 8, ET 18, ET 40, ET 59, et ET 16 ne présentent que des plantes classées entre le niveau 0 et le niveau 2 de l'échelle. Les lignées ET 5 et ET 6 montrent une ségrégation qui a été observée dans des essais précédents. La lignée ET 61 présente une réaction de sensibilité complète dans les deux cas. On n'observe pas de différences importantes dans la réaction des lignées vis-à-vis des deux souches testées. La virulence de la souche-2 est donc très semblable à celle de la souche-1.

En général, les plantes de la variété témoin (Catuai) et les plantes sensibles des lignées éthiopiennes, montrent des symptômes sur la partie aérienne tels que : réduction de croissance, chlorose, réduction de la taille des feuilles, carences nutritionnelles. Sur les racines des matériels sensibles, on observe de façon très nette (sous loupe binoculaire) la présence de nombreuses masses d'oeufs extérieures, mais pas de formation des galles "typiques" du genre Meloidogyne.

Les racines des plantes sensibles ont été fortement endommagées. Chez les plantes résistantes les racines ne montrent aucun symptôme visible ; on observe éventuellement la présence de quelques masses d'oeufs chez certaines plantes.

Tableau 1 : Reaction de neuf lignées éthiopiennes vis-à-vis de deux especes de Meloidogyne. Classement des plantes d'apres leur nombre total de masses d'oeufs (nb. m) par racine (TAYLOR & SASSER, 1978) (*)

Genotype	M. sp. Guatemala						M. sp. Bresil							
	nb.m	nombre de plants(**)					nb.m	nombre de plants(**)						
	x	0	1	2	3	4	5	x	0	1	2	3	4	5
Catuai	59.6					5							4	1
ET 61	49.8				2	3							4	1
ET 5	6.0	4			1		49.6	2			1		1	1
ET 31	0.4	4	1				3.2	3			2			
ET 8	0.2	4	1				0.8	3	2					
ET 6	0.0	5					3.8	4				1		
ET 18	0.0	5					0.6	4		1				
ET 40	0.0	5					0.0	5						
ET 59	0.0	5					0.0	5						
ET 16	0.0	5					0.0	5						

(**)Echelle de Taylor & Sasser : 0 = 0 masses ; 1 = 1-2 ; 2 = 3-10 ; 3 = 11-30 ; 4 = 31-100 ; 5 = + 100

3.2 Descendances hybrides F2.

Les résultats sont regroupés dans le tableau 2. La résistance des géniteurs éthiopiens ET 6, ET 54 et ET 25 est confirmée, car les descendances issues des croisements avec ces géniteurs présentent un nombre important de plantes résistantes. D'autre part, la sensibilité de la descendance ET 20 x Caturra, pourrait être expliquée par l'utilisation d'une plante sensible de l'origine ET 20 lors de la création de la F1.

La variété Java, variété évaluée par la première fois pour son comportement vis-à-vis des nématodes, a été constatée comme sensible. La présence de quelques plantes résistantes peut être expliquée par des pollinisations croisées avec des matériels résistants.

L'analyse génétique des descendances F2 en ségrégation est présentée dans le tableau 3. Les plantes présentant un indice de masses d'oeufs égal ou inférieur à 2 sont considérées comme résistantes. Ces plantes ont présenté au maximum 6 masses d'oeufs par racine.

- les descendances [ET 25 x JAVA] et [CAT x ET 54] présentent une proportion de plantes résistantes (R) et de plantes sensibles (S) proche du modèle 3 R : 1 S ; ceci indique la présence d'un gène dominant. Dans la descendance de CAT x ET 54, on observe certaines plantes ayant une résistance intermédiaire, ce qui indique peut-être la présence d'un gène modificateur.

- la descendance [CAT x ET 6] exprime une proportion de plantes non explicable par le modèle 3 R : 1 S ; cette proportion observée rentre exactement dans le modèle 9 R : 7 S, ce qui suggère l'action de deux gènes

dominants complémentaires,

- les résultats de la descendance de ET 50 x ET 54 (absence de plantes sensibles) suggèrent l'action d'un même gène dominant chez les deux origines. Cependant, la possibilité de la présence de deux gènes différents ne peut pas être exclue, car l'hypothèse de 15 R : 1 S n'est pas rejetée.

Les variables végétatives observées dans cet essai montrent que les descendances les plus sensibles (témoins, CAT x ET 20) sont en général moins vigoureuses que les descendances plus résistantes. Cependant, une partie de la vigueur des descendances F2 pourrait être expliquée par une vigueur hybride des F1, observée au champ pour ce type de croisements. Notamment la vigueur du CAT x ET 54 et du ET 50 x ET 54 était très élevée.

L'effet du nématode sur la vigueur a été étudié à l'intérieur de trois descendances en ségrégation (CAT x ET 6, CAT x ET 54 et ET 25 x Java). Les coefficients de corrélation entre le nombre de masses d'oeufs et la vigueur sont significatifs, mais peu élevés ($r = 0.57, 0.62$ et 0.45 respectivement).

Tableau 2 : Evaluation de six descendances hybrides F2 de croisements intraspécifique chez *C. arabica* (variétés cultivées x origines éthiopiennes) vis-à-vis de *Meloidogyne* sp.

Génotype	p.r.	vig.	nb.m.	nb. plantes par indice						Total
				0	1	2	3	4	5	
CAT x ET 20	0.90 ^b	4.31 ^{cd}	66.22 ^c	1			2	22	7	32
CATURRA	0.92 ^b	3.78 ^d	52.38 ^{bc}					32		32
JAVA	0.99 ^b	5.75 ^{bc}	61.25 ^{bc}	3			1	11	5	20
CATUAI	0.61 ^c	2.96 ^d	41.82 ^b				4	24		28
CAT x ET 6	1.16 ^{ab}	6.78 ^b	14.56 ^a	16	2		6	8		32
CAT x ET 54	1.22 ^{ab}	7.26 ^{ab}	12.22 ^a	17	3	4	2	6		32
ET 25 x JAVA	0.95 ^b	5.91 ^{bc}	11.19 ^a	22			1	8		32
ET 50 x ET 54	1.22 ^a	9.19 ^a	0.06 ^a	31	1	1				32

H 62.5*** 160.4*** 132.8***

CAT = Caturra ; p.r. = poids de racines ; vig. = estimation de vigueur végétative ; nb.m. = nombre de masses par racine ; ind. = indice pondère de masses ; H : test de Kruskal-Wallis

Tableau 3 : Etude des populations F2 (éthiopiennes x variétés cultivées) pour leur réaction au développement de *Meloidogyne* sp.

Croisements		Plantes observées		Proportion attendue	X ²	P
♀	♂	R	S			
CAT	x ET 6	18	14	9 : 7 3 : 1	0.000 6.000	1 0.014
CAT	x ET 54	24	8	3 : 1	0.000	1
ET 25	x JAVA	23	9	3 : 1	0.167	1 > P > 0.9
ET 50	x ET 54	32	0	1 : 0 15 : 1	0.000 2.133	1 0.153

R = réaction de résistance : 6 (ou moins) masses d'oeufs/plante
 S = réaction de sensibilité : plus de 6 masses d'oeufs/plante

3.3 Autres origines de *C. arabica*

3.3.1 Catimors

Les résultats sont présentés dans le tableau 4, le témoin Catuai présente un nombre de masses d'oeufs significativement supérieur à celui des autres traitements, qui eux-même, différent peu entre eux. Tous les Catimors présentent un type de résistance intermédiaire peu élevée. Ceci pourrait être due à la fixation chez ce matériel d'un ou plusieurs gènes mineurs.

Tableau 4 : Réaction de quelques descendance de Catimors vis-à-vis de *Meloidogyne* sp. Classement des plants d'après leur nombre total de masses d'oeufs (Nb. Mss) par racine.

GENOTYPE	p.r.	Nb. Mss	Nb. plants par indice					
			0	1	2	3	4	5
C A T U A I	0.91 _a	88.58 _d					10	2
T 16671-144	0.77 _{ab}	49.50 _{cd}				3	9	
T 16671-150	0.74 _{ab}	47.17 _{bcd}			1	4	7	
T 16671-637	0.79 _{ab}	41.25 _{abcd}			1	3	8	
T 16671-240	0.91 _a	30.58 _{abc}			1	4	7	
T 5269-353	0.67 _{ab}	25.92 _{abc}			2	6	4	
T 16671-241	0.60 _b	24.08 _{abc}			1	9	2	
T 16671-245	0.62 _b	24.33 _{abc}			5	2	5	
T 16671-152	0.58 _b	13.75 _{ab}	1		5	4	2	
F	3.94							
CV	29.6%							
H		47.17						

p.r. = poids de racine (g), test de Newman & Keuls (P = 0.05)
 H = test de Kruskal & Wallis (P = 0.05)

3.3.2 Amphylo et Sarchimor

Les résultats ont montré que la descendance d'Amphylo est résistante à la population guatémaltèque de *Meloidogyne*. Par contre, une réaction - inattendue - de sensibilité a été mise en évidence chez la lignée de Sarchimor qui est considérée comme résistante à l'égard de *M. incognita* au Brésil. Ceci pourrait indiquer une certaine spécificité de la résistance de ce matériel ou une ségrégation dans la population de départ

3.3 Descendances de *C. canephora*

Une grande ségrégation pour la résistance est observée. La plupart des descendances présentent une forte proportion de plantes partiellement résistantes et quelques plantes complètement résistantes. Les descendances de *C. canephora* se présentent comme significativement moins infestées que le témoin Catuai. On observe également des différences significatives entre descendances (tableau 4).

La descendance T 3751(1-2) montre un haut niveau de résistance à la souche-1, quatorze plantes ne présentaient aucune masse d'oeufs à l'extérieur des racines.

Les résultats avec la souche 2 montrent un classement semblable à celui obtenue avec la souche 1, mais il n'y a pas de différences significatives entre descendances de *C. canephora*. On peut relever tout de même que la descendance T 3751(1-2) présente à nouveau, le plus faible nombre de masses (tableau 5). Un nombre de répétitions plus important aurait permis probablement d'établir des différences significatives entre descendances.

Une analyse de corrélation faite entre le nombre de masses d'oeufs par plante et les variables végétatives (hauteur de tige, poids frais des parties aériennes et poids frais des racines), ne révèle pas un effet significatif dans les conditions de conduite des essais, le témoin Catuai étant exclu de cette analyse.

Tableau 5 : Evaluation de sept descendances de pollinisation libre de *C. canephora* vis-à-vis de *Meloidogyne* sp. (population de Guatemala).

Génotype	nb. masses x	nombre de plantes ^(*)					
		0	1	2	3	4	5
CATUAI	94.9 ^d					14	6
T 3753(1-1)	41.3 ^c	2		5	4	6	3
T 3759(2-2)	33.8 ^c	2		2	7	9	
T 3752(1-3)	33.9 ^{bc}	4	1	1	4	10	
T 3754(1-1)	26.0 ^{abc}	4	2	4	4	6	
T 3755(1-1)	17.3 ^{abc}	5	3	4	4	4	
T 3752(2-2)	13.4 ^{abc}	4		8	5	3	
T 3751(1-2)	3.9 ^a	14	2		4		

H =

65.86

(*) Echelle de Taylor & Sasser (1978)

Tableau 6 : Evaluation de six descendance de pollinisation libre de C. canephora vis-à-vis de Meloidogyne sp. (souche du Brésil)

Génotype	nb. m. x	nombre de plantes(*)					
		0	1	2	3	4	5
CATUAI	98.35 ^b					6	2
T 3753(1-1)	39.38 ^{ab}	1		2	1	3	1
T 3755(1-1)	31.00 ^{ab}	1		1	3	3	
T 3759(2-2)	21.38 ^a	2	2	1	1	1	1
T 3752(2-2)	15.13 ^a	2		3	1	2	
T 3754(2-2)	11.13 ^a		3	1	4		
T 3751(1-2)	6.00 ^a	2	2	2	2		

H = 22.35 (H = test Kruskal-Wallis 0.05) (*)
Taylor & Sasser

4. CONCLUSIONS

Du fait du haut niveau de résistance trouvé chez les origines éthiopiennes à l'égard de deux souches différentes de Meloidogyne (probablement deux espèces différentes), les introductions de C. arabica d'Éthiopie constituent un matériel de grande valeur pour l'amélioration génétique du caféier,

- en conséquence, la résistance des lignées éthiopiennes peut être utilisable de façon généralisée dans les pays où les problèmes posés par Meloidogyne spp. sont très importants. Les résultats de cette étude ont donné des indications qui sont déjà utilisées dans les programmes d'amélioration génétique qui viennent de débiter en Amérique Centrale.

- la présence de gènes majeurs dominants pour la résistance à Meloidogyne sp. chez les origines éthiopiennes est confirmée,

- on a également relevé un cas de présence de deux gènes dominants complémentaires,

- certaines lignées de Catimor, non testées antérieurement, se sont révélées moyennement sensibles à l'égard de Meloidogyne sp. L'intérêt de cette résistance partielle devrait être confirmée au champ.

- la forte expression de vigueur végétative de certaines descendance F2 de C. arabica, pourrait être un indicateur de la vigueur hybride de croisements entre géniteurs génétiquement éloignés. Ceci semble exploitable dans l'amélioration de cette espèce du caféier.

D'autre part, les descendance de C. canephora présentent toutes un comportement similaire pour la résistance vis-à-vis des deux souches de Meloidogyne,

- en général, le niveau de résistance de C. canephora n'est pas très élevé. On constate une plus grande variabilité à l'intérieur des descendance

qu'entre les descendances,

- les résultats observés pour l'ensemble des descendances de C. canephora suggèrent la présence de gènes mineurs associés probablement à un ou plusieurs gènes majeurs,

- la meilleure descendance de C. canephora identifiée dans nos travaux est la T 3751(1-2) : elle présente 80 % environ de plantes très résistantes à la souche 1 de Meloidogyne sp.,

- Chez C. canephora, nos résultats suggèrent que la sélection de C. CANEPHORA est nécessaire pour atteindre un haut niveau de résistance (approche pour l'utilisation des porte-greffes). Cela pourrait être atteint par la sélection de géniteurs qui transmettent mieux leur résistance aux descendances. Les meilleurs géniteurs seraient multipliés végétativement, afin de constituer des jardins semenciers biclonaux pour la production de semences de la variété porte-greffes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANZUETO F., ESKES A.B., SARAH J.L. & DECAZY, B. 1991. Recherche de la Résistance à Meloidogyne sp. dans une collection de Coffea arabica. ASIC, 14 : 534-543.
- BOUHARMONT, P. 1992. L'utilisation de la variété sélectionnée Java dans la rénovation de la caféière arabica au Cameroun, matériel végétal et techniques culturales, IRCC-CIRAD, 22 P.
- CARVALHO, A. & MONACO, L.C. 1972. Transferencia do factor Caturra par o cultivar Mundo Novo de C. arabica. Bragantia, 31 : 379-399.
- CHARRIER, A. 1978. Etude de la structure et de la variabilité génétique des caféiers : Résultats des études et des expérimentations réalisées au Cameroun, en Cote d'Ivoire et à Madagascar sur l'espèce Coffea arabica L. collectée en Ethiopie par une mission ORSTOM en 1966. Paris (France). ORSTOM-IFCC N° 14. 99 p.
- ESBENSHADE, P.R. & TRIANTHAPHYLLOU, A.C. 1985. Use of enzyme phenotype for identification of Meloidogyne species. J. Nematol., 17 : 6-20.
- FAZUOLI, L.C., LIMA, M.M.A. de, GONCALVES, W. & COSTA, W.M. da. 1987. Melhoramento do cafeeiro visando resistencia a nematóides. Utilizacao de porta-enxerto resistentes. In : Congresso Paulista de Agronomia, SP, Brasil, 6 : 171-180.
- GONCALVES, W. 1992. Melhoramento do cafeeiro visando resistencia a nematóides. In : Informe Agropecuario. EPAMIG, Minas Gerais (Brésil). V. 16, n°172, 66-72.
- HUSSEY, R.S. & BARKER, K.R. 1973. A comparison of methods for collecting inocula of Meloidogyne spp., including a new technique. Plant Dis. Repr. 57 : 1025-1028.

- JANATI, A., BERGE, J.B., TRIANTHAPHYLLOU, A.C. & DALMASSO, A. 1982. Nouvelles données sur l'utilisation des isoestérases pour l'identification des Meloidogyne. Rev. Nématol., 5 : 147-154.
- MORERA, N. 1990. Metodología para evaluar la resistencia del café a Meloidogyne exigua. In : IX Reunión regional de Mejoramiento de café (Nicaragua), Managua, Nic., IICA-PROMECAFE.
- SANTOS, J.M. dos & HIRSCHMANN TRIANTHAPHYLLOU, H. 1992. Determinação dos fenotipos isoenzimáticos e estudos comparativos da morfologia de 88 populações de Meloidogyne spp., parasitas do cafeeiro. In : Resumos do XVI Congresso Brasileiro de Nematologia, Lavras, Minas Gerais, Brasil : 42.
- SASSER, J.N. 1979. Economic importance of Meloidogyne in tropical countries. In: Lamberti F. & Taylor C.E., eds. Root-knot nematodes (Meloidogyne species). Systematics, Biology and Control. Acad. Press, London, 359-374. TAYLOR, A.L. & SASSER, J.N. 1978. Biology, identification and control of root-knot nematodes (Meloidogyne species). IMP. 111 p.

RESUME

RESISTANCE DE QUELQUES DESCENDANCES DE COFFEA ARABICA ET C. CANEPHORA VIS-A-VIS DE DEUX POPULATIONS DE MELOIDOGYNE SPP., ORIGINAIRES DU GUATEMALA ET DU BRÉSIL. Des études préalables ont souligné l'existence de gènes de résistance à Meloidogyne sp. chez plusieurs lignées de C. arabica originaires d'Éthiopie (prospection ORSTOM/IRCC, 1966). Dans cette étude, neuf descendances éthiopiennes, quatre populations F2 et quelques descendances de C. canephora sont analysées. Les deux populations de Meloidogyne spp. utilisées sont originaires de caféiers au Guatemala et au Brésil. Ces populations ont été analysées par le CAB-International qui les identifie comme des espèces différentes, non décrites. La population du Brésil est reconnue localement comme M. incognita. Les génotypes de C. arabica et C. canephora évalués montrent pratiquement le même type de réaction à l'égard de ces deux populations de nématodes. Parmi les éthiopiens une lignée est sensible (ET 61), trois lignées sont en ségrégation (ET 5, ET 31 et ET 6), et cinq lignées sont hautement résistantes (ET 8, ET 40, ET 59, ET 16 et ET 18). La ségrégation observée dans ces lignées comme dans les populations F2 montre l'action de gènes dominants ou complémentaires. Quand à C. canephora plusieurs plantes présentent des niveaux intermédiaires de résistance ce qui suggère une base génétique plus complexe.

Les résultats confirment l'existence d'une nouvelle source de haut niveau de résistance au sein de C. arabica vis-à-vis de populations destructives de M. spp.

SUMMARY

RESISTANCE OF SOME COFFEA ARABICA AND COFFEA CANEPHORA PROGENIES TO POPULATIONS OF MELOIDOGYNE SPP. FROM GUATEMALA AND BRAZIL. Earlier results have shown resistance to a destructive population of Meloidogyne sp. from Guatemala in Ethiopian accessions of C. arabica (ORSTOM/IRCC, 1966). In the present study nine of these accessions, four F2 populations and some C. canephora families were studied. Two nematode isolates were used, one from Guatemala and one from Brazil. These isolates were identified by CAB-International as two different undescribed species although the Brazilian isolate is locally identified as M. incognita. The C. arabica and C. canephora genotypes analyzed show a similar resistance pattern to both nematode isolates. Among the Ethiopian accessions one was susceptible (ET 61) three segregated (ET 5, 6 and 31) and five were highly resistant (ET 8, 16, 40 and 59). The type of segregation observed in these progenies as well as in the F2 populations suggest oligogenic dominant gene action or complementary gene action. Within C. canephora many plants showed intermediate resistance, suggesting more complex gene action. The results confirm the existence of new sources of high resistance to destructive Meloidogyne spp. populations in Ethiopian accessions of C. arabica.

RESUMEN

RESISTENCIA DE VARIAS DESCENDENCIAS DE COFFEA ARABICA Y COFFEA CANEPHORA A DOS POBLACIONES DE MELOIDOGYNE SPP. ORIGINARIAS DE GUATEMALA Y BRASIL. Estudios previos habían señalado la presencia de genes de resistencia a Meloidogyne sp. en varias líneas de C. arabica originarias de Etiopía (prospección ORSTOM/IRCC, 1966). En el presente estudio nueve descendencias etíopes, cuatro poblaciones F2 y algunas descendencias de C. canephora son analizadas. Las dos poblaciones de Meloidogyne spp. utilizadas fueron recuperadas de raíces de cafetos en Guatemala y Brasil. Estas poblaciones fueron analizadas por el CAB-International, identificándolas como especies diferentes, no descritas hasta el momento. La población de Brasil es reconocida localmente como M. incognita. Los genotipos de C. arabica y C. canephora que fueron evaluados muestran prácticamente el mismo tipo de reacción frente a las dos poblaciones de nemátodos. En el grupo de los etíopes, una línea es susceptible (ET 61), tres están en segregación (ET 5, ET 31 y ET 6), y cinco se presentan como altamente resistentes (ET 8, ET 40, ET 59, ET 16 y ET 18). La segregación observada tanto en esas líneas como en las poblaciones F2, muestra la acción de genes dominantes o complementarios. En C. canephora varias plantas presentan niveles intermedios de resistencia, lo cual sugiere una base genética más compleja. Los resultados confirman la existencia de una nueva fuente de resistencia en C. arabica frente a poblaciones nocivas de Meloidogyne spp.

OBSERVATIONS PRÉLIMINAIRES SUR LA SENSIBILITÉ D'ESPÈCES DE *COFFEA* AUX ATTAQUES DE *DYSMICOCCLUS CRYPTUS* (HEMPEL, 1918)

A. GARCIA *, B. DECAZY **, C. ALAUZET ***

* Chef du Service de Protection Végétale, ANACAFÉ, 5a calle 0-50 zona 14, Guatemala city

** Entomologiste du Café et du Cacao, CIRAD-CP, B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex 01

*** Maître de Conférence, Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex

INTRODUCTION

Au Guatemala, la caféiculture joue un rôle très important du point de vue économique et social. Cette production connaît malheureusement de multiples problèmes qu'il faut résoudre pour améliorer les rendements et la qualité des cafés. Les ravageurs des racines, constituent l'un des facteurs les plus limitatifs dans la production pour de nombreuses régions à vocation caféière. Les cochenilles racinaires sont présentes dans la caféiculture guatemaltèque depuis plusieurs années et leur rôle néfaste ne cesse de s'accroître. Actuellement ces ravageurs entraînent de sérieux dégâts dans différentes zones caféières du pays.

Un des premiers articles mentionnant l'existence de cochenilles racinaires sur le caféier au Guatemala, est signé d'HAMBLETON et date de 1946 ; il concerne Geococcus coffeae, espèce à nouveau signalée par DEKLE en 1965. Quant aux premiers dégâts réellement importants enregistrés dans quelques plantations à partir de 1965, ils sont signalés par HERNANDEZ (1965).

D'après GARCIA (1991), dix espèces de cochenilles sont présentes dans les caféières guatemaltèques mais les plus importantes affectant le caféier sont: Dysmicoccus cryptus (HEMPEL, 1918) et Geococcus coffeae GREEN, 1933.

Dans nos études précédentes (GARCIA, 1991), on a pu constater que chez les variétés de Coffea arabica cultivées en Amérique Centrale (Caturra, Catuaí, Bourbon, ...) on observe une susceptibilité généralisée aux cochenilles. La résistance ou tolérance que les espèces de C. canephora et C. excelsa présentent aux cochenilles racinaires ont été signalées depuis 1947 (CHEVALIER, 1947).

Actuellement, la méthode de lutte la plus employée contre ces déprédateurs est l'utilisation des insecticides. La lutte génétique par l'utilisation de variétés ou portes-greffe résistants, apparaît comme une des possibilités particulièrement intéressantes de la lutte intégrée contre ces ravageurs.

Au Guatemala a été développé le greffage du type hypocotyledoner, qui utilise le Robusta comme porte-greffe des variétés commerciales (REYNA, 1966). Cependant, peu de travaux ont été consacrés à ce propos dans le cas des cochenilles racinaires. En raison du peu d'information que l'on possède sur les ressources de la génétique vis-a-vis de ces insectes, nous avons donc procédé, depuis 1990, au développement de ce travail dans le cadre de la coopération CIRAD-PROMECAFE/ANACAFE.

MATERIEL ET METHODE D'ETUDE

Le développement de cette cochenille ne pouvant être dissocié de celui de son hôte, nous avons tenté de préciser, dans un premier temps, dans le Laboratoire d'Entomologie de l'IRCC-CIRAD à Montpellier, le rôle joué par l'âge de la plante dans la sensibilité à l'égard de l'insecte.

Cette étude a été effectuée sur 3 lots de 6 plants chacun (Variété Caturra), âgés respectivement de 8, 20 et 36 mois et plantés en pots.

L'infestation est réalisée par le dépôt de 6 femelles prêtes à pondre, au niveau du collet de chaque plant.

Les caféiers sont placés dans une enceinte à 25° C, 70% H.R. et sous une photopériode de 12 L / 12 D.

Les paramètres, nombre de feuilles, hauteur et diamètre du tronc au niveau du collet sont mesurés au moment de l'infestation et 12 mois plus tard sur les plants infestés et sur 3 lots de 6 plants témoins non infestés et de même âge.

Dans un deuxième temps, nous avons tenté de préciser quelle pourrait être la résistance d'autres espèces de Coffea aux attaques de Dysmicoccus cryptus.

Le degré de sensibilité entre espèces de Coffea différentes a été déterminé par comparaison entre 3 lots de plants appartenant aux espèces : C. arabica, C. canephora et C. excelsa.

Pour cette expérience on a utilisé 20 plants de C. arabica, 6 de C. canephora et 6 de C. excelsa, tous âgés de 20 mois environ.

Comme dans l'expérience précédente, l'infestation se fait à partir de 6 femelles prêtes à pondre déposées au niveau du collet. Quatre mois plus tard on procède au dénombrement des cochenilles fixées sur chaque plant.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Rôle de l'âge des caféiers

Les résultats obtenus font l'objet du tableau 1. On a pu observer que les individus issus des femelles déposées sur les plants de 8 mois, quittent celles-ci au cours de leur développement.

Douze mois plus tard, on trouve les caféiers initialement infestés dans un état proche de celui des témoins. La hauteur des plantes ainsi que le diamètre du tronc au niveau du collet ont augmenté comme pour les témoins.

Toutefois, le nombre de feuilles par plant est resté pratiquement le même (12,6 en moyenne initialement ; 13,0 à la fin) alors que chez les témoins, le nombre de feuilles à la fin de notre essai a augmenté (19,3 en moyenne).

Dans ce cas, les cochenilles ne se sont pas fixées sur le végétal ce qui laisse supposer que le développement des caféiers de cet âge n'est pas suffisamment avancé pour permettre leur installation. Il faut toutefois remarquer qu'il s'agit là d'observations effectuées sur des plants conservés en pots au laboratoire ; des caféiers de même âge mais plantés en milieu naturel, présentant un développement beaucoup plus avancé, sont peut être plus propices à l'installation des insectes.

Dans le cas des plants âgés de 20 mois, on trouve une différence de croissance ; douze mois plus tard les plants infestés mesurent 8 cm environ de moins que les témoins (32,0 et 40,7 cm respectivement). Le nombre de feuilles des témoins (77,2 en moyenne) est nettement plus élevé que celui des plants infestés (6,8 en moyenne), ces derniers en ayant nettement moins qu'au début de l'expérience. Le diamètre du tronc au niveau du collet n'a que très peu évolué dans les 2 cas.

Dans ces plants infestés, une importante colonie de cochenilles s'était installée 2 mois après l'infestation. Ces colonies resteront présentes jusqu'à la fin de notre essai (au bout d'un an). On observera, que 4 à 5 mois après l'infestation, il y a début de jaunissement des feuilles et arrêt végétatif de la plante. 4 mois plus tard environ toute la plante jaunit et les vieilles feuilles commencent à tomber. Lors des dernières observations, alors que le flétrissement des caféiers était total, nous avons pu constater une diminution du nombre de cochenilles vivantes (40,7 en moyenne par plante). On a également observé que 1 à 2 mois plus tard, lorsque les caféiers meurent, les cochenilles (jeunes stades principalement) ont quitté la plante ; à ce moment là on ne trouve que quelques cadavres de femelles adultes, des exuvies L1, L2, L3 et de nombreux restes de cocons dans lesquels se sont développés les mâles.

Pour les caféiers âgés de 36 mois, à la fin de nos observations, la hauteur (75,5 cm moyenne) et le nombre de feuilles (79,2 moyenne) sont significativement supérieurs chez les témoins par rapport aux plants infestés (59,0 cm en moyenne pour la hauteur et 17,3 feuilles en moyenne). Le diamètre du tronc au niveau du collet augmente normalement dans les 2 cas.

Chez ces plants, nous avons observé des colonies plus importantes de cochenilles tout au long de l'année. L'apparition des premiers symptômes a eu lieu 5 à 6 mois après l'infestation, et le flétrissement des caféiers apparaît 5 à 6 mois plus tard. L'évolution de ces caféiers est donc identique à ceux âgés de 20 mois mais les mêmes phénomènes observables sont décalés dans le temps de 1 à 2 mois.

Au bout de 13 mois, les caféiers sont dans un très mauvais état, ayant perdu un nombre important de feuilles. A ce stade, les colonies de cochenilles qu'ils hébergent sont très importantes.

2. Sensibilité en fonction de l'espèce

Dans la figure 1 nous présentons les valeurs des effectifs de la cochenille (tous stades confondus), obtenus 4 mois après l'infestation, sur chaque plant de C. arabica variété "Caturra" (espèce réputée sensible). Ces valeurs sont extrêmement étalées puisqu'elles vont de 1 084 à 5 364. La variabilité est toutefois relativement faible puisque l'erreur standard n'est que de 259,4 pour une moyenne de 2 951,6.

Cette variabilité n'est pas nécessairement liée à une différence de sensibilité entre plants mais peut résulter de la variabilité assez grande observée dans la fécondité des cochenilles (GARCIA, 1991).

Le tableau 2 fait apparaître des différences significatives dans les niveaux de populations de cochenilles suivant les espèces de caféiers concernées. Les valeurs les plus fortes s'observent pour C. arabica-Var. Caturra (2 951,6), tandis que pour C. canephora et C. excelsa, ces valeurs sont nettement plus basses (186,2 et 68,2 en moyenne respectivement). Le test de NEWMAN et KEULS au seuil de 5% (après transformation logarithmique des données), nous a permis de classer ces moyennes. Par ordre décroissant de sensibilité nous obtenons donc : C. arabica, C. canephora et C. excelsa.

D'après cette première approche, il semble donc que C. canephora et surtout C. excelsa, présentent une résistance génétique aux attaques de D. cryptus. Cette résistance peut être de nature diverse ; résulte-t-elle de l'existence chez certaines espèces et en quantité plus ou moins importante de produits répulsifs ou limitant la multiplication de la cochenille ? Nos observations ne nous permettent pas de répondre à ces questions.

CONCLUSION

Nos observations ont montré que sur de plants de caféier conservés au laboratoire, l'installation de D. cryptus ne pouvait se produire que sur des sujets dont le développement est suffisamment avancé. Dans le cas de C. arabica, espèce réputée sensible aux attaques de cette cochenille, les plants doivent présenter une hauteur minimale d'une trentaine de cm et un diamètre du tronc au collet au moins égal à 0,7 cm .

L'installation et le développement de D. cryptus sur les caféiers se traduit par une modification des paramètres de croissance des plants. La mesure de ceux-ci pourrait être éventuellement utilisée pour définir la sensibilité des plants testés par comparaison avec des témoins non infestés. Dans ce cas les réponses aux infestations ne pourront être obtenues qu'au bout d'un temps assez long (de l'ordre de 1 an pour des plants âgés de 20 mois lors de l'infestation).

Ces données bien que préliminaires, nous permettent d'envisager la mise au point d'un test précoce de sensibilité des variétés et/ou espèces de caféiers ; les résultats de ce test devront bien sûr être confirmés en plantation : le test se fera sur des plants en pots âgés de 20 mois ; chaque plant sera infesté par 6 femelles prêtes à pondre ; chaque génotype sera représenté par 20 plants ; les comptages des populations de cochenilles se feront au bout de 4 mois ; les paramètres de croissance des plants seront mesurés au bout de 12 mois. Ce test mesurera ainsi, à la fois, l'antibiose et la tolérance des génotypes.

Parmi les espèces que nous avons testé, C. arabica s'est montrée la plus favorable à la multiplication de D. cryptus. C. canephora et surtout C. excelsa se sont révélés des supports moins propices à l'expression des potentialités biotiques de cette cochenille.

Ces résultats bien que préliminaires, justifient toutefois la poursuite d'études sur le degré de sensibilité de diverses espèces de Coffea, dans la perspective de la mise en évidence de plants résistants pouvant être utilisés comme porte-greffe, ou de variétés de C. arabica tolérantes, notamment dans les origines éthiopiennes si prometteuses par ailleurs en ce qui concerne leur sensibilité aux attaques de nématodes (ANZUETO, 1989).

**Tableau 1 : Dégâts de *D. cryptus* (HEMPEL)
sur caféiers *C. arabica* âgés de 8, 20 et 36 mois**

Paramètres mesurés							Apparition des symptômes (mois après l'infection)	Flétrissement persistant (mois après premiers symptômes)
Au départ				Onze mois après				
Age des caféiers	Hauteur des plants (cm)	Nbre de feuille par plante	Diamètre du collet (cm)	Hauteur des plants (cm)	Nbre de feuille par plante	Diamètre du collet (cm)		
8 MOIS								
Infestés	19,8 ± 1,2	12,6 ± 1,0	0,3	29,2 ± 1,8	13,0 ± 1,7	0,5
Témoins	18,8 ± 1,0	13,3 ± 1,0	0,3	31,0 ± 1,9	19,3 ± 1,8	0,5		
Signification(*)				NS	N.S	N.S		
20 MOIS								
Infestés	30,5 ± 1,2	27,8 ± 3,5	0,7	32,0 ± 1,5	6,8 ± 3,1	0,9 ± 0,1	4-5	4
Témoins	31,5 ± 2,4	27,5 ± 2,8	0,7	40,7 ± 0,6	77,2 ± 1,5	1,0 ± 0,1		
Signification				S	S	N.S		
36 MOIS								
Infestés	54,0 ± 2,0	55,3 ± 4,0	1,7 ± 0,2	59,0 ± 1,7	17,3 ± 2,2	2,2 ± 0,1	5-6	5-6
Témoins	53,6 ± 2,0	55,6 ± 3,0	1,7 ± 0,2	75,5 ± 1,7	79,2 ± 0,1	2,1 ± 0,1		
Signification				S	S	N.S		

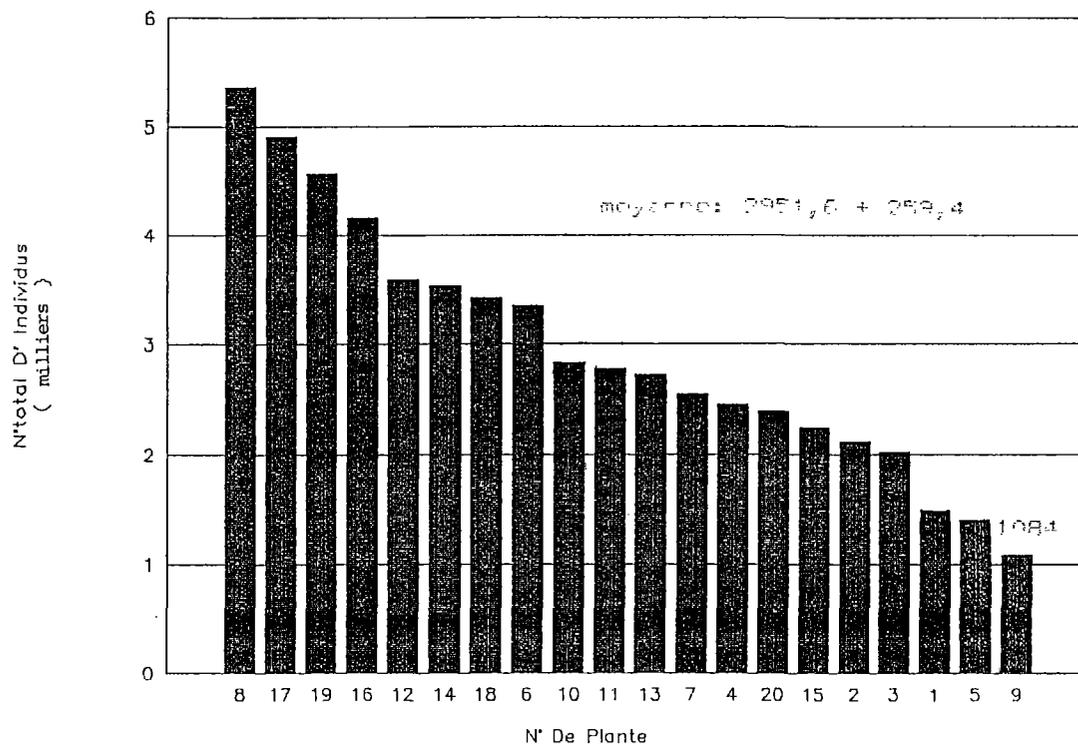
(*) Test Newman et Keuls - 5 %

**Tableau 2 : Nombre d'individus (*D. cryptus*)
sur chacune des espèces étudiées**

Nombre d'individus	Espèce de caféier		
	<i>C. arabica</i>	<i>C. canephora</i>	<i>C. excelsa</i>
Moyenne	2 951,6 ± 259,4	186,2 ± 48,5	68,8 ± 19,3
Test (*)	a	b	c

(*) Test de Newman et Keuls - Seuil 5 %

Figure 1 : Densité des populations de D. cryptus
chez C. arabica-Var. Caturra



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANZUETO F.**, (1989)
Recherche de la résistance aux nématodes dans une collection de Coffea spp. D.E.A, Amélioration des plantes. Université de Rennes: 37.
- CHEVALIER A.**, (1947)
Les caféiers du globe. Phase III Systématique des caféiers et faux-caféiers, maladies et insectes nuisibles. Vol 28 : 356.
- DEKLE G.**, (1965)
A root mealybugs Geococcus coffeae (Homoptera : Pseudococcidae). Florida Department of Agriculture, Division of Plants Industry, Entomological circular 43 : 1-2.

- GARCIA A.**, (1991)
Les Pseudococcidae déprédatrices des racines de caféier (Coffea arabica) au Guatemala. Cas particulier de Dysmicoccus cryptus (Hempel, 1918). Thèse Université Paul Sabatier, Toulouse: 122.
- HAMBLETON E.**, (1946)
Studies on hypogeic mealybugs. Revista de Entomología, Rio de Janeiro: 17-77.
- HERNANDEZ M.**, (1965)
Observaciones sobre la biología de la cochinilla de la raíz Rhizoeccus americanus Hambleton (Homoptera, Pseudococcidae). Guatemala. Rev. Caf. n.50 : 19-20.
- REYNA H.**, (1966)
Un nuevo método de injertación en café. Dirección General de Investigación y Control Agropecuario, Ministerio de Agricultura, Guatemala, Bol, Téc. n.21.

RESUME

En laboratoire l'installation de la cochenille Dysmicoccus cryptus sur racines de caféier est étroitement liée à deux facteurs prédominants : le stade de développement de la plante et l'espèce de caféier.

Le développement d'une population de cochenille (à partir de 6 femelles infestantes) peut se produire sur des plants dont le diamètre est au moins égal à 7 mm. La population peut alors être évaluée au bout de 4 mois ; Les paramètres de croissance sont mesurés au bout de 12 mois.

Des tests effectués dans telles conditions sont conduits pour évaluer l'antibiose et la tolérance de diverses espèces de caféiers, dans le but de sélectionner des portes-greffe résistants à cette cochenille. Parmi les espèces de caféiers testées, Coffea arabica, s'est montrée la plus favorable à la multiplication de D. cryptus. Les espèces C. canephora et C. excelsa sont moins propices à l'expression des potentialités biotiques de cette cochenille.

LE GOÛT DE POMME DE TERRE DU CAFÉ ARABICA AU BURUNDI

B. BOUYJOU *, G. FOURNY *, D. PERREAUX **

* CIRAD-CP/ISABU, BP 795, Bujumbura, Burundi

** CTB/ISABU, BP 795, Bujumbura, Burundi

INTRODUCTION

Le "Goût de Pomme de Terre" (GPDT) connu aussi sous le nom de "patate" ou de "peasy" pour les Anglais (BECKER and al.) ou de "erbsig" pour les Allemands est un goût indésirable qui déprécie la qualité du café Arabica de la région africaine des grands lacs.

Cet "off-flavour" avait déjà été étudié au Kivu (province NE du Zaïre) il y a plus de trente ans. En 1957 FASSI avait pu, à partir de fruits malodorants récoltés dans les plantations, isoler une bactérie saprophyte du "type Bacillus" qui, en milieu de culture, produit une substance à l'odeur caractéristique. Il impliqua les insectes comme agents vecteurs de la bactérie. STOLP (1959) a mis en évidence, dans l'ovipositeur et la larve de la mouche des fruits, la présence d'une bactérie du genre *Xanthomonas* qui, en milieu de culture propage l'odeur GPDT. JEVREMOVIC (1960) a montré par la lutte chimique qu'il existait une relation positive entre le taux de cerises attaquées par la mouche et le taux de tasses à GPDT. Mais il conclut en disant: "Trois mois après le traitement, la fréquence "patate" est 3 fois plus grande qu'auparavant bien que la population de mouches soit 10 fois plus faible. Cette observation permet d'avancer l'hypothèse qu'un autre facteur, probablement climatique, intervient dans l'évolution de la maladie."

Depuis lors, si la substance responsable de ce mauvais goût, l'isopropyl-2 méthoxyl-3 pyrazine, a été isolée, il a fallu attendre les études de SNOECK et NARAGUMA en 1988-89 pour que ressurgisse ce thème. La volonté de produire un café de haute qualité a incité les autorités burundaises à demander, en 1990, au Programme Café de l'ISABU (Institut des Sciences Agronomiques du Burundi) de reprendre les recherches sur les aspects bactériologiques, entomologiques et technologiques.

ASPECT BACTERIOLOGIQUE

INTRODUCTION

Débutées fin 1990, les recherches sur l'aspect bactériologique du GPDT du café ont pour premier objectif de confirmer les travaux de FASSI et STOLP. Un second objectif est une meilleure compréhension du comportement dans l'environnement de la bactérie responsable, notamment l'étude de son potentiel de survie épiphyte et de ses relations avec certains insectes de l'entomofaune du caféier (mouche, punaise des cerises). Les travaux concernant ce second volet sont encore dans une phase préliminaire.

MATERIEL ET METHODES

Confirmation de l'origine bactérienne du GPDT

Les bactéries isolées d'une cerise à l'arôme GPDT récoltée en novembre 1990 dans la région de Ngozi (Buyenzi) sont purifiées et caractérisées sur base de l'odeur produite sur le milieu de culture décrit par Stolp (1960). Un isolat choisi est envoyé au CIRAD-CP (Montpellier) pour caractérisation de l'arôme responsable par chromatographie en phase gazeuse.

En octobre 1991, le même isolat est inoculé sur cerises vertes et mûrissantes dans une caféière fructifiant hors saison dans la commune de Mageyo (Mumirwa). L'inoculation est réalisée selon trois modalités: piqûre des cerises à l'aide d'une aiguille entomologique contaminée par la bactérie ou pulvérisation d'une suspension bactérienne, combinée ou non à une piqûre des cerises à l'aide d'une aiguille non contaminée. Dix branches sont inoculées par objet pour chaque type de cerise. Dix branches dont les cerises ne sont pas inoculées et dix autres dont les cerises sont piquées avec une aiguille non contaminée servent de témoin. Les branches sont placées sous manchon moustiquaire et le café récolté est dégusté à raison de 2 fèves inoculées par tasse.

En mai/juin 1992, une vingtaine de cerises malodorantes sont sélectionnées dans deux stations de lavage des provinces de Ngozi et Gitega. Chacune des cerises provient d'agriculteurs différents. Des bactéries en sont isolées sur le milieu de Stolp et sélectionnées sur base de la morphologie des colonies. Les isolats sont comparés à la souche originale et caractérisés selon une gamme de tests biochimiques.

Comportement de la bactérie dans l'environnement

Une souche de la bactérie résistante à 2560 ppm de streptomycine, obtenue par repiquages successifs sur milieu progressivement enrichi en antibiotique, a été utilisée pour étudier sa capacité de vie épiphyte en milieu contrôlé. Une suspension de cette souche titrant 10^9 bactéries/ml est pulvérisée à refus sur de jeunes plants de caféiers cultivés en pots en chambre conditionnée (23-25°C). L'évolution de la population bactérienne est suivie à intervalles réguliers par lavage dans l'eau stérile de 4 feuilles choisies au hasard, et étalement d'aliquotes à la dilution adéquate sur le milieu de Stolp et sur gélose de Drigalski (GD) contenant 2560 ppm de streptomycine. Un essai similaire a été répété à 28-29° C, et en conditions de serres plus chaudes, sans contrôle de température (2 essais en saison sèche, un essai en saison des pluies) (Kandanga, 1993).

Le 9 décembre 1992, une souche de la bactérie non résistante à la streptomycine est pulvérisée sur 5 caféiers âgés de 5 ans dans le centre ISABU de l'Akagoma (Buyenzi), à raison d'un litre de suspension bactérienne (10^8 bactéries/ml) par arbre. A des intervalles d'environ 15 jours, 10 feuilles sont prélevées au hasard sur chacun des 5 caféiers et la bactérie y est recherchée par lavage des feuilles dans l'eau stérile puis étalement sur gélose XLD (Xylose,

Lysine, Désoxycholate). L'objectif de cet essai est essentiellement qualitatif: retrouver la bactérie sur au moins une des feuilles prélevées.

Les interactions avec la mouche des fruits (*Trirhithrum coffeae*) ont uniquement été étudiées en conditions d'élevage artificiel de l'insecte sur cerises de caféier mûrissantes. Après un temps de ponte de cinq jours sur cerises inoculées avec la bactérie, les individus de la génération parentale sont récoltés, broyés dans 2 ml d'eau stérile/insecte, et des aliquotes de la suspension résultante sont étalées (dilutions 0, 100x et 10.000x) sur gélose XLD et GD, milieux sélectifs des entérobactéries. Environ 50% des mouches de la première génération éclosent sont traités de même, le reste étant mis en élevage sur cerises non inoculées pour un second cycle et l'analyse de la seconde génération. Pour deux essais, une souche de bactérie non résistante à la streptomycine est employée. Par la suite, un essai est réalisé avec la souche résistante à 2560 ppm de streptomycine. Dans ce cas, le milieu de Stolp enrichi en streptomycine a été utilisé pour l'isolement.

Une première approche des interactions de la bactérie avec *Antestiopsis orbitalis ghesquierei* a été tentée par l'analyse de 31 insectes nourris pendant une semaine sur des cerises vertes préalablement pulvérisées d'une suspension bactérienne (conditions naturelles, sous manchon moustiquaire). Seule la partie céphalique a été analysée, selon une méthodologie similaire à celle employée pour la mouche (souche non résistante à la streptomycine).

Pour tous les essais rapportés ci-dessus, un échantillon représentatif des diverses colonies bactérienne obtenues, morphologiquement semblables à la souche de référence sur les milieux d'isolement employés, est caractérisé par des tests biochimiques choisis pour juger de leur identité avec la bactérie associée au GPDT. Dans un premier temps, l'acidification d'une gamme de 13 sucres était utilisée. Par la suite l'expérience a montré que les réactions sur gélose de Kligler (glucose +, lactose -, gaz -, H₂S -), l'hydrolyse de l'amidon (+) et de l'esculine (-), l'acidification de quatre sucres (inositol +, tréhalose +, cellobiose - et saccharose +) pouvaient suffire pour la distinction de la bactérie GPDT parmi les autres bactéries isolées.

RESULTATS

Confirmation de l'origine bactérienne du GPDT

Le Service de Chimie/Technologie du CIRAD-CP a confirmé la production de isopropyl-2 méthoxy-3 pyrazine par l'isolat bactérien sélectionné. Ce composé est associé au goût pomme de terre (Guyot, communication personnelle, mars 1991).

L'inoculation des cerises à l'aide d'une aiguille contaminée, ainsi que la pulvérisation de la bactérie sur cerises piquées augmentent nettement, par rapport aux témoins, la proportion de tasses GPDT dégustées (Tableau 1).

Tableau 1 - Résultat de l'inoculation artificielle de la souche bactérienne isolée à partir d'une cerise au GPDT

	Inoculation dans cerises vertes			Inoculation dans cerises rouges		
	Tasses testées	Tasses à GPDT	% de tasses à GPDT	Tasses testées	Tasses à GPDT	% de tasses à GPDT
Témoin non piqué	84	1	1,2	137	8	5,8
Témoin piqué	95	14	14,7	90	7	7,8
Pulvérisateur bactérie	87	7	8,0	138	23	16,8
Piqûre contaminée	105	58	55,2	115	69	60,0
Pulvérisation+piqûre	103	42	40,8	128	60	46,9

Il ne semble pas y avoir de différence entre les inoculations sur cerises vertes ou mûrissantes. Par rapport au témoin non blessé, la seule pulvérisation de

la bactérie augmente la proportion de tasses à GPDT, mais moins nettement que les deux autres méthodes. Particulièrement pour les drupes vertes, la simple piqûre avec une aiguille non contaminée augmente aussi la fréquence des tasses GPDT. De la vingtaine de cerises sélectionnées dans les deux stations de lavage on a pu obtenir 18 isolats (1 isolat = une cerise) identiques, pour tous les tests réalisés jusqu'à présent, à l'isolat utilisé dans l'essai d'inoculation. Le tableau 2 résume les caractéristiques biochimiques de ces isolats.

Tableau 2 - Caractéristiques biochimiques des 19 souches de la bactérie associées au GPDT du café isolées jusqu'à présent

Production indole	-	Gaz/Glucose (Kligler)	-	Arginine dihydrolase	-
Rouge méthyle	+	Ferment glucose (Kligler)	+	Lysine décarboxylase	-
Voges-Proskauer	+	H ₂ S (Kligler)	-	Ornithine décarboxylase	-
Citrate Simmons	+	Estérase (Twccn 80)	-	Hydrolyse esculine	+
Uréase	+	Liquéfaction gélatine	-	Hydrolyse amidon	+
Kovacs' oxydase	-				
Acidification des sucres et dérivés:					
Arabinose L	-	Fructose	+	Lactose	-
Arabinose D	-	Galactose	+	Maltose	-
Cellobiose	-	Glucose	+	Mannitol	-
Dulcitol	-	Inositol	+	Mannose	+
				Xylose	+

Comportement de la bactérie dans l'environnement

Une décroissance de la population bactérienne de 30 à 35% par jour est observée sur les feuilles de jeunes caféiers en conditions contrôlées, quelle que soit la température essayée, ainsi qu'en serre en saison des pluies. A ce rythme, une population initiale de 10⁸ bactéries/feuille atteint un seuil inférieur à la limite de détection de la méthode employée (±100 bactéries/feuille) après une quarantaine de jours. En saison sèche, aucune bactérie n'est retrouvée 24h après la pulvérisation pour les deux essais effectués en serre (Kandanga, 1993).

En conditions naturelles, la bactérie a été retrouvée lors du prélèvement effectué 26 jours après la pulvérisation, mais n'est plus retrouvée lors du prélèvement suivant (42 jours).

La bactérie n'a jamais pu être isolée des mouches en élevage lorsque la souche non résistante à la streptomycine était employée, tant pour la génération parentale (G0) que pour la première (G1) et seconde génération (G2). Si la bactérie est présente, elle ne l'est pas en concentration suffisante pour pouvoir être distinguée parmi la flore bactérienne associée aux insectes. Cette dernière est extrêmement diversifiée puisque 19 bactéries différentes ont pu être distinguées par la gamme de tests biochimiques employée. Toutes ces bactéries ont une morphologie des colonies similaire à la bactérie GPDT sur gélose de Drigalski. Dans l'essai réalisé avec la souche résistante à la streptomycine, la bactérie GPDT est retrouvée pour 34 des 35 mouches analysées (22 femelles et 13 mâles) de la génération G0. Elle n'a cependant plus été retrouvée en G1 (10 mouches analysées, 8 femelles et 2 mâles). Ici aussi, il ne peut être exclu que sa présence soit masquée par d'autres bactéries en forte concentration: 9 bactéries différentes, résistantes à la streptomycine ont pu être distinguées.

Dans l'essai d'interaction avec *Antestiopsis*, la bactérie GPDT a pu être isolée de la région céphalique de 5 des 31 punaises analysées.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'origine bactérienne du GPDT du café au Burundi est confirmée. L'essai d'inoculation montre le caractère favorisant, sinon indispensable, des blessures pour une pénétration de la bactérie dans les fruits.

MATERIEL ET METHODES

Notre essai a consisté en une protection totale et chronologique de parcelles de 100 pieds. Il s'est déroulé sur les deux saisons culturales 90-91 et 91-92, Objets : nous avons établi les 9 objets suivants (floraison début septembre):

Oct: 2 traitements mensuels d'octobre à mai	Mars: 2 traitements mensuels de mars à mai
Nov: " " de novembre à mai	Avr : " " d' avril à mai
Dec: " " de décembre à mai	Mai : 1 seul traitement début mai
Jan: " " de janvier à mai	Témoin : non traité
Fév: " " de février à mai	

Parcelle élémentaire : 100 arbres.

Répétitions : 6 répétitions. Notre essai a donc porté sur 54 parcelles, ce qui représente une superficie de 2.7ha.

Localisations

90-91: commune de Busiga (province du Buyenzi)

91-92: commune de Gadsinda (province du Buyenzi)

Traitements

Les applications se sont effectuées à l'atomiseur à raison de 225 l de bouillie à l'ha avec en 90-91 un mélange d'endosulfan et de diméthoate, et en 91-92 un mélange d'endosulfan et de deltaméthrine.

Récoltes

Environ 15% de la production ont été prélevés par parcelle en 3 passages (début, milieu et fin de récolte).

Traitement post-récolte

Les fermentations, lavages et trempages ont été faits selon le schéma classique des stations de dépulpage-lavage du Burundi. Par le procédé de flottation, tous les lots ont été ensuite séparés en cerises flottantes et cerises lourdes puis, après dépulpage en parches flottantes et parches lourdes. Les parches flottantes ne représentant, dans notre essai, que 2 à 3% de la production et étant rejetées par les stations, nous ne les avons pas prises en compte dans nos analyses. Ainsi nous avions, pour chaque parcelle et par passage les fractions: cerises flottantes (CF), cerises lourdes (CL), parches lourdes issues des cerises flottantes (PLF) ,parches lourdes issues des cerises lourdes (PLL).

Evaluations des dégâts

On a procédé, pour chaque parcelle élémentaire, sur chaque passage et par fraction :

- au comptage des cerises contenant au moins 1 asticot dans un échantillon de 150 cerises pour les CF et 1500 cerises pour les CL
- au comptage des fèves piquées sur un échantillon de 2000 fèves ou la totalité si le lot ne contenait pas 2000 fèves.

Dégustations

Tous les lots ont été dégustés au laboratoire de technologie de l'ISABU. En 91, nous avons échantillonné la fraction PLL de façon à déguster 20 tasses par lot et nous avons dégusté la totalité de la fraction PLF. En 92, les fractions PLL et PLF ont été intégralement dégustées.

Le tableau ci-dessous présente les nombres de tasses dégustées:

	Récolte 91	Récolte 92
PLF	2 899	1 780
PLL	4 001	41 620
Total	6 900	43 400

RESULTATSCerises attaquées par *T. coffeae* et tasses à GPDT.

Les figures 1 et 2 représentant les taux de cerises attaquées et les taux de tasses à GPDT dans les récoltes 91 et 92 nous montrent clairement que c'est au 3ème passage que nous avons le plus de cerises à asticots alors que nous enregistrons les plus faibles taux de tasses à GPDT.

Sur la base de ces observations, il ne semble donc pas que les mouches soient vectrices de la bactérie.

La bactérie en cause appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*, ce qui la distinguerait de la bactérie du genre *Xanthomonas* rapportée par Stolp (1960) au Kivu. Il ne faut cependant pas exclure une identification erronée de la part de Stolp, dont l'objectif des travaux n'était pas axé sur une caractérisation approfondie de l'organisme responsable. L'isolement de la même bactérie à partir de cerises d'origines diverses conforte cette hypothèse. L'identification aux niveaux genre et espèce est en cours à l'Institut Pasteur, tandis que l'isolement régulier de nouvelles souches se poursuivra.

On constate une décroissance relativement lente des populations bactériennes introduites en épiphytes sur le feuillage des caféiers. Cette décroissance semble accélérée en conditions sèches. Les relations entre la survie de la bactérie et l'humidité relative devront être approfondies. Il sera nécessaire de mettre au point des méthodes plus fines de détection pour mettre en évidence une éventuelle persistance des populations à un très bas niveau dans l'environnement.

Le taux élevé de détection de la bactérie GPDT associée à la génération parentale des mouches du caféier élevées sur cerises contaminées est probablement la conséquence d'une contamination "passive" des insectes dans un environnement riche en cette bactérie. L'étude des interactions bactéries/mouches du caféier est freinée par la présence de nombreuses autres bactéries associées à l'insecte dans les conditions d'élevage. Une souche résistante à un second antibiotique est en cours de sélection à partir de la souche résistante à 2560 ppm de streptomycine pour pouvoir poursuivre ces travaux.

Il sera nécessaire de vérifier si les *Antestiopsis* contaminés, vraisemblablement au niveau des pièces buccales, lorsqu'ils se nourrissent sur des cerises en présence de la bactérie GPDT peuvent la transmettre à d'autres cerises et, éventuellement, à la génération suivante.

L'aboutissement des travaux concernant le comportement de la bactérie dans l'environnement est lié à la mise au point de méthodes de détection de la bactérie suffisamment précises et fiables: milieux spécifiques, tests sérologiques ou moléculaires. Ces études conditionnent en partie l'efficacité des moyens à mettre en oeuvre en champs pour tenter de réduire l'incidence du GPDT. Si la bactérie est strictement liée à un (des) insecte(s) vecteur(s), on peut espérer une certaine efficacité de traitements insecticides effectués aux moments opportuns. Si par contre la bactérie est un membre commun de la flore épiphyte du caféier et parasite opportuniste de blessures, quelles que soient leurs origines, il sera probablement plus malaisé de limiter l'incidence du GPDT par des interventions en champs.

ASPECT ENTOMOLOGIQUE

INTRODUCTION

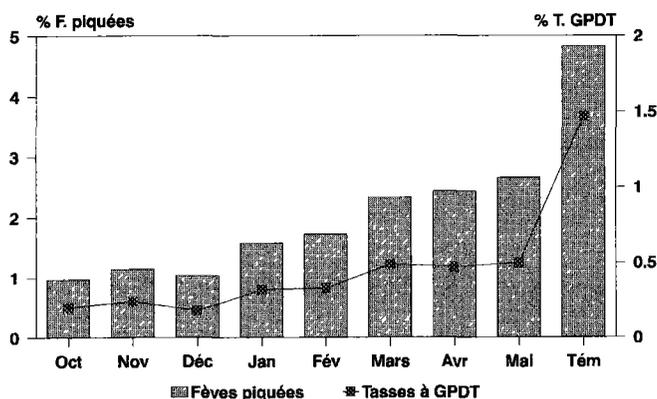
Les travaux de SNOECK et NARAGUMA ont montré que ce GPDT est aléatoirement réparti dans tout le Burundi. Le nombre trop faible d'échantillons ne leur a pas permis de déterminer des corrélations entre les tasses à GPDT et les diverses catégories de cerises et de café vert. Aussi, avons-nous localisé notre expérimentation dans une seule commune afin d'obtenir un plus grand nombre d'échantillons.

La drupe du caféier peut être attaquée par: *Hypothenemus hampei* (Ferr) le scolyte du grain, *Prophantis smaragdina* (Butler) la pyrale des drupes, *Antestiopsis orbitalis ghesquierei* (car) la punaise du caféier, et *Trirhithrum coffeae* (Bezzi) la mouche des fruits. Le scolyte et la pyrale étant trop peu nombreux dans les caféières burundaises, nous avons cherché à mettre en évidence les corrélations entre la punaise et/ou la mouche, et le nombre de tasses à GPDT.

représentant qu'une part minime de notre café marchand, nous n'avons pas jugé utile de présenter ici ces résultats d'analyses.

La figure 4 reproduit les effets des traitements tous passages confondus sur les taux de fèves piquées et les taux de tasses à GPDT dans la fraction "cerises lourdes". Notons le fort pourcentage de fèves piquées et de tasses à GPDT du témoin par rapport aux autres objets.

Fig. 4 : Effet des traitements sur les taux de Fèves piquées et de Tasses à GPDT dans les PLL en 92



ANALYSE DES VARIANCES					
FEVES PIQUEES			TASSES A GPDT		
	Test F	Proba.		Test F	Proba.
Trait.	35,45	0,0000		7,32	0,0000
Passa.	35,64	0,0000		19,44	0,0000
C.V.	41,40%			71,60%	

Fèves piquées : l'effet "traitement" sur les fèves piquées a nettement distingué 3 groupes: le témoin; les parcelles dont le traitement a commencé en mars, avril et mai; puis les parcelles dont le traitement a commencé en décembre, octobre, novembre, janvier et février. Il existe aussi un effet "passage" avec un taux de fèves piquées plus faible au 1^{er} passage.

Tasses à GPDT : l'effet "traitement" est là aussi très significatif. Seul le témoin est différent aux autres objets. L'effet "passage" révèle, comme en 91, un taux de tasses à GPDT inférieur au 3^{ème} passage.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Vu le caractère sporadique du phénomène GPDT à l'échelle de la caféière, la précision de la mesure est bien sûr fonction du nombre de tasses dégustées dans les différents lots expérimentaux. Aussi, les échantillons dégustés (20 tasses/lot) dans la fraction "pâches lourdes issues de cerises lourdes" (PLL) de l'essai 91 sont trop faibles, les taux de tasses à GPDT ne sont pas estimés avec une précision suffisante.

Quoiqu'il en soit et même si cette étude laisse apparaître quelques interrogations telle : comment se fait-il que dans la fraction PLL de 92 le taux de tasses à GPDT soit plus faible au premier passage alors que le taux de fèves piquées est le plus élevé ? nous pouvons énoncer les conclusions suivantes :

- la mouche *T. coffeae* ne semble pas vectrice de la bactérie,
- le taux de fèves piquées est nettement plus élevé dans les cerises flottantes que dans les cerises lourdes,
- le taux de tasses à GPDT est supérieur dans les cerises flottantes,

Fig. 1 : Taux de cerises attaquées par *T. coffeae* et taux de Tasses à GPDT dans CL et CF en 91

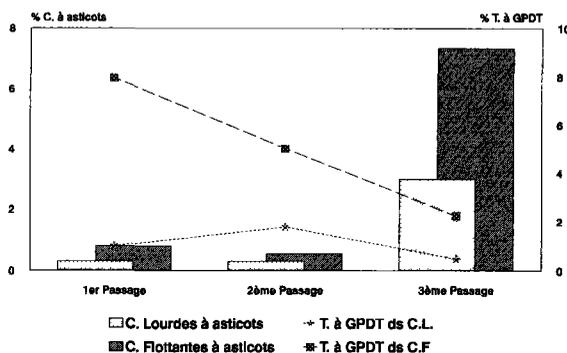
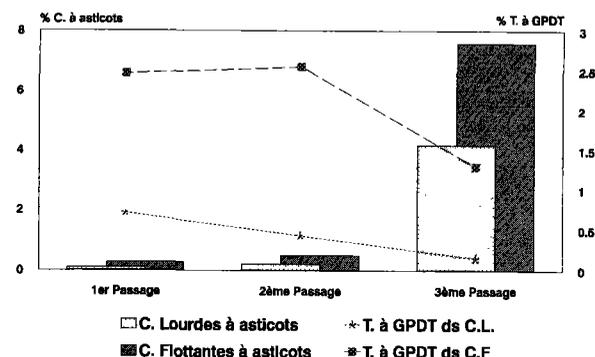


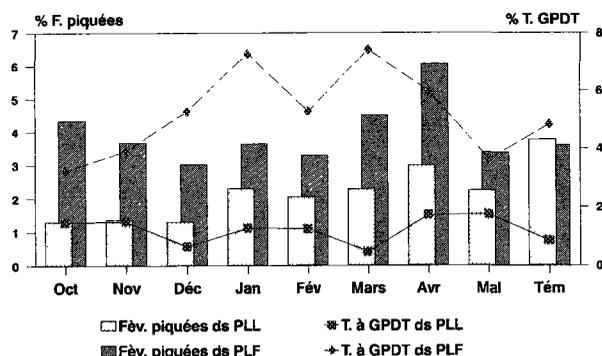
Fig. 2 : Taux de cerises attaquées par *T. coffeae* et taux de Tasses à GPDT dans CL et CF en 92



Récolte 91 : fèves piquées par *A. orbitalis* et tasses à GPDT (Busiga).

La figure 3 transcrit les effets des traitements tous passages confondus sur les taux de fèves piquées et des tasses à GPDT dans les PLF et PLL. Nous constatons un taux de fèves piquées et un taux de tasses à GPDT nettement plus importants dans les parches issues des cerises flottantes (PLF).

Fig. 3 : Effet des traitements sur les taux de Fèves piquées et de Tasses à GPDT dans les PLL et les PLF en 91



Les analyses des variances ont donné les résultats suivants :

- PLF. Dans cette fraction qui représente 6,5 % du café marchand l'effet traitement est peu important vis-à-vis des taux de fèves piquées avec un classement des objets peu logique, l'effet passage est peu marqué. Il n'y a aucun effet traitement sur le taux de tasses à GPDT qui est plus faible au 3^{ème} passage.

- PLL. Seul le facteur "traitement" a un effet significatif sur le taux de fèves piquées mais avec des groupes homogènes difficilement dissociables. Ceci est sans doute dû à notre échantillonnage (20 tasses par lot) trop réduit. Nous pouvons toutefois dire que les traitements sont efficaces contre les piqûres de la punaise. Il n'existe pas d'effet traitement sur le taux de tasses à GPDT; il existe seulement une différence entre les passages, avec un taux de tasses à GPDT moindre au 3^{ème} passage.

Récolte 92 : fèves piquées par *A. orbitalis* et tasses à GPDT (Gadsinda).

L'efficacité des traitements cette année a été telle que nous avons obtenu 4 % de café parche lourd issu des cerises flottantes (PLF). Malgré la faible quantité de café, nous avons pu enregistrer, comme en 91, des taux de fèves piquées et de tasses à GPDT plus importants que dans la fraction PLL. Cette fraction ne

- c'est au cours du 3^{ème} Pass. que nous rencontrons le moins de tasses à GPDT,
- un lien certain existe entre les dégâts de la punaise *A.orbitalis* et le GPDT.

Aussi nous devons à présent intervenir par la mise en place d'un nouveau programme de lutte contre *A.orbitalis* afin de remplacer le traditionnel poudrage de juillet-août, donc après récolte, par un traitement plus efficace (applications d'insecticides EC) en février-mars. C'est à cette époque-là que l'on observe une distinction des groupes homogènes (effet des traitements sur le taux de fèves piquées). Cette distinction en février-mars s'observe très nettement en 92 où nous avons travaillé sur un plus grand échantillon qu'en 91. La biologie de la punaise corrobore ces résultats puisque c'est à cette époque de l'année que la punaise occasionne le plus de dégâts par ses piqûres alimentaires, les drupes vertes présentant alors une appétence maximale.

ASPECT TECHNOLOGIQUE

ELIMINATION DU GPDT AU NIVEAU DES CERISES

INTRODUCTION

Le but de cette étude est de confirmer l'hypothèse d'une plus grande fréquence de tasses à goût de pomme de terre (GPDT) sur le café vert issu de cerises flottantes par rapport au café vert issu de cerises lourdes.

PRELEVEMENTS

Les prélèvements ont été effectués dans 3 stations de dépulpage-lavage de la zone caféière du BURUNDI : Kirasa (Mumirwa), Murama (Ngozi), Muremera (Kirimiro). Quinze prélèvements ont été effectués sur chacune des SDL considérées. Les cerises sont prélevées directement dans la trémie de réception de la SDL pour les stations de Kirasa et de Murama (réception à sec) et avant déversement dans la trémie de réception sous eau dans la station de Muremera. Pour les stations avec réception à sec, la quantité nécessaire de cerises est mise à flotter dans un bac contenant 50 l d'eau jusqu'à obtention d'environ 30 kg de cerises flottantes et 25 kg de cerises lourdes. Pour la station avec réception sous eau, le flottant est directement récupéré dans la trémie sous eau, les cerises lourdes sont obtenues après élimination des cerises flottantes sur les apports des planteurs.

TRAITEMENT POST-RECOLTE

Les cerises sont déulpées sur un dépulpeur manuel à 1 disque de marque GERICO. La fermentation est effectuée dans des bassines d'une capacité de 50 l. Elle dure 60 heures en tout selon les étapes suivantes : 12 heures à sec, lavage et élimination des parches flottantes, 24 heures sous eau, lavage et élimination des parches flottantes, 24 heures de trempage. Le café est ensuite mis à sécher au soleil sur des claies de séchage recouvertes d'une toile de polyéthylène jusqu'à obtention d'une humidité de 10 %. Compte tenu du traitement effectué, notre étude porte sur la comparaison du café parche lourd issu de cerises flottantes par rapport au café parche lourd issu de cerises lourdes.

DEGUSTATIONS

Les dégustations sont effectuées selon les méthodes utilisées au BURUNDI par les laboratoires de taxation du café. 15 g de café en grains sont moulus à l'aide d'un moulin à café de modèle restauration (broyeur à meules). Ce café est ensuite placé à l'intérieur d'une tasse à dégustation où il est mis à infuser avec 150 ml environ d'eau bouillante. La dégustation se fait sur la boisson tiède. Le tableau qui suit (tableau 3) indique le nombre de tasses dégustées par SDL pour le café issu de cerises flottantes et de cerises lourdes.

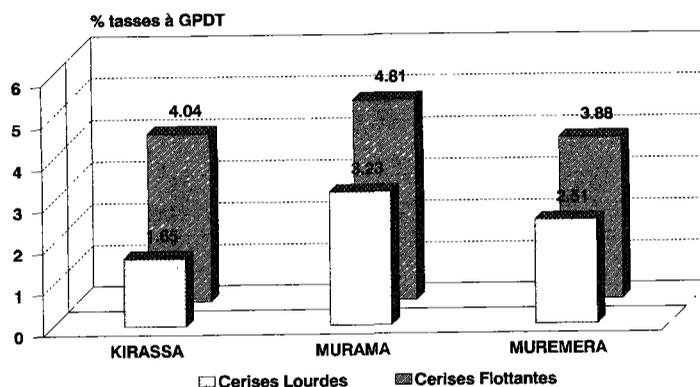
Tableau 3 - Nombre de tasses dégustées

	KIRASA	MURAMA	MUREMERA
FLOTTANT	1733	2391	1833
LOURD	3816	3906	4069

RESULTATS ET DISCUSSION

Comme on peut le constater dans la figure 5, il existe une différence significative entre les pourcentages de tasses à goût de pomme de terre des deux échantillons confirmant la plus grande fréquence de ce défaut sur le café issu de cerises flottantes. En se basant sur une quantité de cerises flottantes de l'ordre de 10 %, le traitement à part du café issu de cerises flottantes permettrait dans notre essai de diminuer le risque de trouver des tasses à goût de pomme de terre de l'ordre de 10 %.

Fig. 5 : Taux de tasses à GPDT dans le café issu de cerises lourdes et de cerises flottantes dans 3 SDL



ELIMINATION DU GPDT AU NIVEAU DU CAFE PARCHE

INTRODUCTION

Suite à des observations effectuées au cours de la fermentation de cerises de café inoculées artificiellement par la bactérie responsable du goût, nous avons remarqué la présence d'un morceau de rachis collé sur la face plane de la parche du grain de café après séchage. La dégustation de café issu des parches présentant ce défaut nous permettait de constater une fréquence de 60 % de tasses à GPDT. Un essai de triage sur café parche pour élimination de ce défaut a été mis en place pour étudier la possibilité de diminution du GPDT par cette mesure.

MATERIEL ET METHODE

L'essai a été réalisé sur 10 t de café parche prélevées dans l'usine de déparchage et de conditionnement de café de SONGA au BURUNDI. L'opération de triage a été réalisée par 40 manoeuvres pendant 6 jours portant le coût de l'opération à 6 FBU/kg de café (soit au cours actuel 0,09 FF/kg de café parche ou 0,12 FF/kg de café vert). Un échantillon de café parche de 60 kg a été prélevé avant triage pour la constitution du lot témoin.

RESULTAT ET DISCUSSION

Le triage du café parche a permis d'obtenir 12,800 kg de café à défaut représentant 0,128 % de la quantité traitée. Les résultats des dégustations nous indiquent une diminution du pourcentage de tasses à GPDT de 2,65 % à 1,59 % entre le lot témoin et le lot trié.

ELIMINATION DU GPDT AU COURS DE L'USINAGE

INTRODUCTION

Cet essai a pour but d'étudier au cours de l'usinage d'un échantillon de café vert l'évolution du nombre de tasses à GPDT au niveau des différentes transformations unitaires. L'usinage pratiqué en laboratoire consiste au départage, calibrage, passage sur tables densimétriques et élimination des défauts par triage manuel. L'échantillon utilisé pour l'essai n'est pas représentatif de l'ensemble de la production burundaise, l'essai visant principalement à comprendre à quelles étapes la diminution du GPDT est possible.

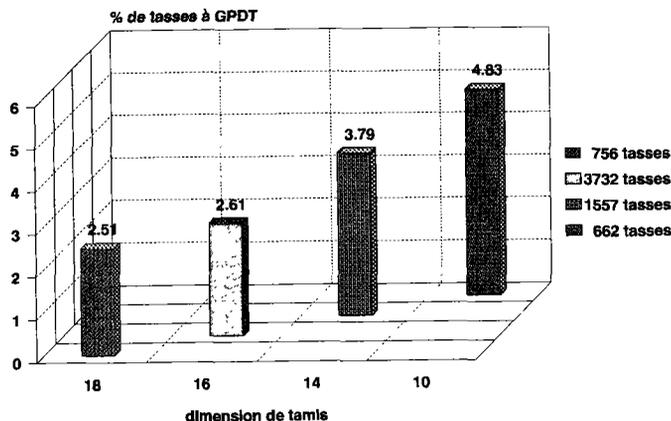
MATERIEL ET METHODE

L'échantillon de café utilisé pour cet essai est un mélange de parche catégorie A 1 (grade lourd du prégradeur AAGAARD) traité par voie humide provenant des SDL Murama, Korane et Ruvubu (30 kg par station). L'ensemble de l'échantillon est départagé et poli à l'aide d'un départeur de laboratoire de marque GERICO. Il est ensuite passé au catador de marque GORDON pour élimination des débris de parche restant. Une analyse granulométrique est effectuée sur cet échantillon. L'échantillon de café vert est ensuite divisé en deux parties : un premier échantillon de 24 kg environ (E1), et un autre de 48 kg environ (E2).

L'échantillon (E1) est dégusté directement après expertise du nombre de défauts. L'échantillon (E2) est criblé sur des cribles à trous ronds de dimensions 18/64^{ème}, 16/64^{ème}, 14/64^{ème} et 12/64^{ème} de pouce. La fraction inférieure au plus petit crible (petites brisures) est éliminée. Chaque grade ainsi constitué est ensuite passé sur une table densimétrique de laboratoire pour élimination de la fraction de densité moindre.

Après triage densimétrique, les différents grades sont remélangés proportionnellement de façon à obtenir la même répartition granulométrique que le lot d'origine. Cette mesure a pour but de ne pas fausser les résultats de la dégustation par modification de la granulométrie du lot. Des essais antérieurs nous ont montré que le nombre de tasses à GPDT était plus important sur les petits grains en comparaison aux gros (figure 6). On obtient ainsi un échantillon de 38 kg environ. L'échantillon (E2) est ensuite divisé en 2. L'échantillon (E3) ainsi créé est trié manuellement pour élimination des principaux défauts visibles à l'oeil nu (grains piqués, malformés, grosses brisures).

Fig. 6 : Tasses à GPDT en fonction de la taille des grains



RESULTATS ET DISCUSSION

Les tableaux 4 et 5 nous indiquent les résultats obtenus pour la répartition granulométrique et pour le nombre de défauts pour les différents échantillons traités.

Tableau 4 - Répartition granulométrique en poids (%)

CRIBLE	18	16	14	12
E 1	9,50	54,0	29,0	7,50
E 2 ET E 3	9,50	55,0	28,5	7,00

Tableau 5 - Pourcentage de défauts et tasses à gpdt

	BRISURES	PIQUEES	DEFECTUEUSES	TASSES A GPDT
E 1	3,1	6,1	2,0	3,04
E 2	1,6	7,5	3,0	2,06
E 3	1,0	3,3	1,3	1,25

DISCUSSION

La comparaison des résultats obtenus pour les échantillons 1 et 2 permet de constater qu'en dehors de fèves de densité moindre, on note une diminution du nombre de brisures. La légère augmentation des autres défauts doit être considérée comme non significative et être attribuée au problème d'échantillonnage. On constate une diminution relative du nombre de tasses à GPDT de 32,24%. La comparaison des résultats obtenus pour les échantillons 2 et 3 permet de constater une diminution générale du nombre de défauts. On note néanmoins encore 3,3 % de fèves piquées (24 en nombre pour 100 g). On constate une diminution relative du nombre de tasses à GPDT de 58,88% par rapport à l'échantillon N° 1. On constate donc en général une diminution du goût de pomme de terre en relation avec la diminution des défauts du café.

CONCLUSION

Si pour l'instant, nous n'avons pas la possibilité de contrôler la bactérie, nous pouvons offrir un café de haute qualité en intervenant par :

- une lutte efficace contre *Antestiopsis orbitalis* aux périodes où ce ravageur provoque les piqûres des cerises ;
- l'élimination des cerises flottantes ;
- un usinage précis permettant l'élimination d'un maximum de défauts sur café vert.

BIBLIOGRAPHIE

- BECKER (R.), DÖHLA (B.), NITZ (S.), VITZTHUM (O.G.) .1987. Identification of the "peasy" off-flavor note in Central African Coffees. ASIC, 12^{ème} colloque, Montreux.
- FASSI (B.) .1957. Le goût terreux des graines du caféier d'Arabie. Bulletin de l'INEAC, Vol 6, n°3, p 202-203.
- GOORMANS (C.) .1959. Le problème du goût de pomme de terre du caféier d'Arabie. Bulletin de l'INEAC, n°50, p 19-26.
- JEVREMOVIC (M.) .1960. Note sur un essai de lutte contre les mouches des fruits responsables de la transmission du goût de pomme du café d'Arabie au Kivu. Bulletin de l'INEAC, n° 51, p 31-42.
- KADANGA (M.J.) .1993. Aspect microbiologique du goût de "pomme de terre" du café au Burundi. Etudes exploratoires. Mémoire de fin d'études. Université du Burundi. Faculté des Sciences Agronomiques, 65 p.

- SNOECK (D.), NARAGUMA (J.). 1990. Recherche des relations entre les dégâts d'insectes et le goût de pomme de terre du café au Burundi. Note technique ISABU, n°148, 13 p.
- STOLP (H.). 1959. Über das Zusammenwirken von Bakterien und Insekten bei der Entstehung einer Geschmackbeeinträchtigung des Kivu-Kaffees und die Rolle von Bakteriophagen bei der Zusammenhänge Phytopathologische Zeitschrift, Bd. 39, Heft 1, p 1-15.

RESUME

La problématique du "goût pomme de terre" (GPDT) du café Arabica au Burundi a été examinée sous les aspects bactériologiques, entomologiques et technologiques. L'origine bactérienne du GPDT est confirmée. La bactérie responsable appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. L'étude de son potentiel de survie épiphyte sur feuilles de caféier a été abordée, ainsi que ses relations avec des insectes potentiellement vecteurs. Il est nécessaire de développer une méthode de détection de la bactérie plus précise afin de mieux comprendre son comportement dans l'environnement. Un essai de protection totale chronologique contre les insectes a montré qu'il existait une relation entre les dégâts d'*Antestiopsis orbitalis* et le taux de tasses à GPDT. Cette relation n'apparaît pas pour *Trirhithrum coffeae*. Cet essai remet en question le programme de lutte actuel contre *A. orbitalis* (poudrage en juillet-août). Une lutte par pulvérisation à l'époque où la punaise commet le plus de dégâts (février-mars) serait plus appropriée et pourrait permettre une réduction du taux de tasses à GPDT. L'étude du GPDT au niveau de différentes transformations unitaires permet de mieux appréhender les possibilités de diminution de la fréquence des tasses à GPDT.

SUMMARY

The bacteriological, entomological and technological aspects of "peasy off flavour" of Arabica coffee in Burundi were studied. The bacterial origin of this off flavour has been confirmed. The causal bacterium belongs to the family of *Enterobacteriaceae*. The study of its epiphytic survival on coffee leaves has been initiated, as well as its relationship with insects which are potentially vectors. A more efficient method to detect the bacterium is needed to understand its behaviour in the nature better. A trial of total and chronological protection against insects showed a relationship between the damage caused by *Antestiopsis orbitalis* and the frequency of coffee cups having this off flavour. This relationship has not been established for *Trirhithrum coffeae*. As a result of this trial the present protection program against *A. orbitalis* (dusting in July-Augustus) has been questioned. Control by spraying when the bug is most damaging (February-March) would be more appropriate and could reduce the level of the off flavour. The study of the peasy flavour, which was evaluated throughout various transformation units, has resulted into a better insight of the possibilities to lower the frequency of the cups with an off flavour.

TRAITEMENT DES EAUX RÉSIDUAIRES D'USINES DE TRANSFORMATION DU CAFÉ PAR VOIE HUMIDE

Analyse d'un projet pilote dans la région Xalapa-Coatepec (Mexique)

M. CASTILLO *, H. BAILLY **, P. VIOLLE **, P. POMMARES **, B. SALLÉE ***

* Consultant privé

** Volontaires du Service National au Ministère français des Affaires Etrangères

*** Chercheur CIRAD-CP

Projet SARH/CIRAD, Apartado Postal n° 391, 91000 Xalapa (Ver.), Mexique

Tout le café produit au Mexique (\pm 5 millions de sacs) est transformé par voie humide et génère une pollution organique évaluée à 13,2 millions de mètres cubes contenant 42 000 tonnes de DCO, soit environ 280 t/jour, l'équivalent des effluents quotidiens d'une ville de 5,6 millions d'habitants. Face à ce problème, les autorités nationales ont imposé des normes drastiques concernant le rejet des eaux usées des *beneficios*¹. Cependant, l'agro-industrie caféière traverse une crise économique sans précédent et ne dispose pas de techniques d'épuration ayant fait leurs preuves sur ce type d'eaux résiduares.

Cette problématique a été reprise dans le cadre du projet de recherche-développement SARH/CIRAD, dont le principal objectif est l'appui aux coopératives de producteurs transformant le café cerise en café parche sec.

1 - ANALYSE GLOBALE DU PROBLEME DE LA POLLUTION GENEREE PAR L'AGRO-INDUSTRIE DU CAFE DANS LA REGION.

1.1 - Qui pollue ?

Les *beneficios* consomment des quantités variables mais toujours importantes d'eau. Deux opérations en utilisent la quasi totalité: le dépulpage et le lavage. Cependant, ces usines n'ont pas toutes le même impact sur l'environnement.

Tableau n° 1: Structure de l'agro-industrie caféière au Mexique.

	Rural	Semi-industriel	Industriel	Total
Quantités transformées*	< 90 Qq/j	90 a 240 Qq/j	> 240 Qq/j	
Nombre total de <i>beneficios</i>	73 %	20 %	7 %	100 %
Capacité installée	34 %	34 %	32 %	100 %

* 1 Qq = 45,4 kg de café marchand = \pm 250 kg de café cerises

Source: INMECAFE, 91

1 Unité de transformation du café cerise en café parche sec, par voie humide.

Abstraction faite des unités artisanales, on peut définir trois types d'usines, selon la capacité installée (tableau n° 1). Ainsi, seulement 27% des *beneficios* concentrent 66% de la production et génèrent environ 70% de la pollution totale (INMECAFE, 1991).

1.2 - Une pollution organique, acide et dissoute.

Tableau n° 2 : Composition des eaux résiduaires générées par les *beneficios* de café.

	type d'eau analysée	pH	D.B.O.5 (mg O ₂ /l)	D.C.O. (mg O ₂ /l)	S.T. (mg/l)	S.D.T. (mg/l)	Source Biblio.
Colombie	Dépulpage	5		24 800	19 893	18 552	ZULUAGA, 89
Mexique	Dépulpage	5,3	1 659	8 124	5 917	5 265	INMECAFE, 88
Mexique	Dépulpage	6	5 000	10 000	8 500	7 500	BAILLY <i>et al.</i> , 92
Mexique	Dépulpage	4,7	19 000	24 000	19 000	15 500	BAILLY <i>et al.</i> , 92
Colombie	Lavage	4,4		15 465	10 685	9 377	ZULUAGA, 89
Mexique	Lavage	4,7	1 635	8 348	6 294	4 998	INMECAFE, 88
Mexique	1 ^{er} lavage	3,9	8 900	17 000	16 500	12 500	BAILLY <i>et al.</i> , 92
Mexique	2 ^e lavage	4,5	3 500	5 400	3 800	3 500	BAILLY <i>et al.</i> , 92
Mexique	3 ^e lavage	4,8		2 500	2 600	1 600	BAILLY <i>et al.</i> , 92
Colombie	Dép.+Lav.	4,7	6 083	15 450	741	410	ARIAS <i>et al.</i> , 87

D.B.O.5 : Demande Biologique en Oxygène à 5 jours

D.C.O. : Demande Chimique en Oxygène

S.T. : Solides Totaux

S.S.T. : Solides Dissous Totaux

Le tableau n° 2 montre que les eaux résiduaires issues de la transformation du café par voie humide contiennent une forte pollution organique, essentiellement dissoute. Chaque quintal² de café transformé produit 6 à 8 kg de DCO et 10 kg de Solides Totaux (Wasser, 1987). Cette matière organique, principalement constituée de sucres et de pectines, a une bonne biodégradabilité (valeur de la DBO.5 proche de celle de la DCO). On note néanmoins une forte variabilité des résultats, probablement imputable aux différents volumes d'eau utilisés.

1.3 - Une pollution concentrée dans l'espace et dans le temps.

La concentration des usines de transformation du café par voie humide dans les régions caféières provoque d'importants problèmes dans l'approvisionnement en eau en période de récolte. Ainsi les 118 usines situées dans la zone caféière de Coatepec³ (Etat de Veracruz) consomment 900 000 m³ d'eau pour transformer 500 000 Qq. Le caractère saisonnier de la récolte (180 jours d'octobre à mars) accentue l'effet de cette pollution. Durant cette période, on assiste à une forte compétition entre les besoins en eau de l'industrie caféière et les besoins domestiques.

Par ailleurs, la pollution se répercute sur la qualité du café. Les *beneficios* sont établis près des rivières; ceux qui se trouvent en aval travaillent avec de l'eau déjà polluée.

Tableau n° 3: Consommation d'eau dans les *beneficios* de café.

	Dépulpage *	Lavages *	Total *	Source Biblio.
Colombie	1,8	1,2	3,0	ZULUAGA, 89
Colombie	7,2	4,8	12,0	ZULUAGA, 89
Mexique	2,0	1,0	3,0	INMECAFE, 88
Mexique	2,3 à 4,3	1,7	4,0 à 6,0	BAILLY <i>et al.</i> , 92
Mexique	5,0	11,8	16,8	Mesures propres, 93
Kenya			26,0	FINNEY, 89
Nicaragua	6,0	3,6	9,6	Mesures propres, 88

* en litres/kg de cerises

2 Un quintal (Qq) correspond à 45,4 kg de café marchand, soit environ 250 kg de café cerise ou 57,5 kg de café parche.

3 Environ 500 km².

Dans le tableau n° 3, on remarque des consommations en eau élevées pour la majorité des pays, reflet de l'utilisation irrationnelle d'une ressource jusqu'alors non limitée. De plus, les consommations sont très variables, d'un *beneficio* à l'autre (suivant le type d'outillage utilisé et l'organisation du travail), mais aussi à l'intérieur d'un même *beneficio* (en fonction de l'opérateur et de la quantité de café à transformer).

1.4 - La réglementation: "celui qui pollue paie".

Une série de mesures ont été mises en place ces dernières années:

- la SEDUE⁴ a défini les normes de rejet pour les usines de transformation de café par voie humide (Bailly et al., 1992).
- deux nouveaux impôts ont été instaurés: l'un sur l'utilisation de l'eau (même provenant de sources ou pompée dans les rivières), l'autre sur le rejet des eaux résiduaires.

L'une des conséquences immédiates de l'application de la nouvelle législation est l'augmentation des coûts d'utilisation de l'eau.

Le pays est divisé en quatre zones par disponibilité en eau croissante. Toutes les régions caféières se situent en zone 4, possèdent de grandes ressources en eau et ont des droits d'utilisation faibles. Si l'on prend une consommation moyenne de 8 litres par kg de cerise, le coût de l'eau par *quintal* est de l'ordre de 0,29 US.\$, droits d'utilisation et de rejet inclus, ce qui représente entre 3 et 6% du coût total de transformation. Si l'on réduit la consommation d'eau à 2 litres par kg de cerises, ce coût est de l'ordre de 0,13 US.\$/Qq.

De 1991 à 1993, le coût de la "Loi nationale de l'eau" a été multiplié par trois. La prochaine signature du traité de libre échange nord-américain avec son cortège d'amendements "environnement" ne fera qu'accentuer cette tendance. Les *beneficios* peuvent aussi être condamnés à des amendes allant de 250 à 50 000 US.\$ en fonction de la gravité de l'infraction.

Cette augmentation des coûts de transformation n'est cependant pas suffisante pour inciter les transformateurs à réaliser des investissements destinés à réduire leur consommation et/ou à traiter les eaux usées.

1.5 - Les expériences régionales.

Dans la zone, il existe différentes installations de traitement des eaux:

<i>Beneficio</i>	<i>Type de traitement</i>
Chocaman.....	Physico-chimique et filtration (Morales, 1989)
Xalatla.....	Filtration
Bola de Oro.....	Anaérobie, 1 ^{ère} génération (Rivero, 1989)
Puerto Rico.....	Physico-chimique

La plupart de ces installations connaissent des difficultés de fonctionnement: celle de Bola de Oro ne traite que les eaux de lavage; celles de Puerto Rico et de Chocaman ont été abandonnées ou modifiées en raison de coûts d'opération trop importants. Ces expériences restent isolées, et il n'existe toujours pas de solution économiquement valable.

Devant la pression exercée par la loi sur l'environnement, certains transformateurs industriels paraissent considérer l'importation de technologies de pays développés comme la solution la plus réelle et la moins "risquée". Ils sont cependant limités par leurs coûts et par la crise économique que traverse la caféiculture.

De manière générale, toutes les études soulignent l'importante consommation d'eau (en volume) des *beneficios*. Pour traiter les eaux résiduaires de manière efficace et rentable, il est indispensable de concentrer la pollution au maximum.

4 Equivalent du Ministère de l'Environnement et de l'Urbanisme français.

On peut considérer deux manières d'économiser l'eau: réorganiser le circuit de transformation du café de façon à diminuer la consommation totale (dépulper en sec par exemple), ou recycler les eaux.

2 - LE PROJET PILOTE "TLAPEXCATL".

2.1 - "Tlapexcatl": un *beneficio* rural du secteur coopératif.

* Le *beneficio Tlapexcatl* a été construit en 1986 par un groupe de caféiculteurs minifundistes regroupés au sein de la Société de Production Rurale "*Beneficio Tlapexcatl*", laquelle est membre de la ROCA (*Red de Organización Cafetaleras Autogestivas*).

* Sa capacité installée est de 33 Qq/jour et il transforme en moyenne 400 tonnes de café cerises ($\pm 1\ 600$ Qq) par campagne. Son chiffre d'affaire fluctue entre 50 000 et 100 000 US.\$.

* Il fonctionne 120 jours par an, avec 25 jours sans entrées et un pic d'approvisionnement de deux semaines en janvier (5 à 10 tonnes de cerises par jour).

* L'eau est pompée dans un ruisseau où elle est rejetée après utilisation. La réception des cerises se fait dans un siphon ($V_{\text{siphon}} = 7\ \text{m}^3$). La transformation d'un kg de cerises requiert de 5 à 17 litres d'eau suivant l'opérateur et la quantité de café du jour.

2.2 - La digestion anaérobie: le procédé le plus adapté.

Il existe 3 principaux types de systèmes de traitement des eaux:

- Le premier, physico-chimique, utilise des filtres et des produits flocculants (chaux par exemple) qui augmentent le pH jusqu'à 12 de façon à obtenir une réaction chimique où se forment des composés insolubles de type colloïdal. Ces composés sont ensuite enlevés par sédimentation et filtration.
- Les deux autres sont des systèmes de traitements dits biologiques, dans la mesure où ils utilisent la pollution de l'eau comme substrat, (principalement de la matière organique) pour la croissance de micro-organismes:
 - * Le procédé aérobie implique la construction de grands bassins de stockage et une agitation permanente pour être efficace, d'où un coût énergétique élevé. De plus, il produit d'importantes quantités de boues qui doivent ensuite être traitées.
 - * Le procédé anaérobie permet de transformer la matière organique en méthane et CO_2 .

Cette dernière technique paraît la plus adaptée aux *beneficios*: elle consomme peu d'énergie, produit peu de boues et génère un biogaz utilisable sur le site même de production.

Si on prend pour base de calcul une consommation d'eau de 2 l/kg de cerise, et des entrées moyennes de 20 Qq/jour générant une pollution de 6 à 8 kg de DCO/Qq, il faudra épurer 10 m³ par jour, avec une charge moyenne de 14 000 mg de DCO/l.

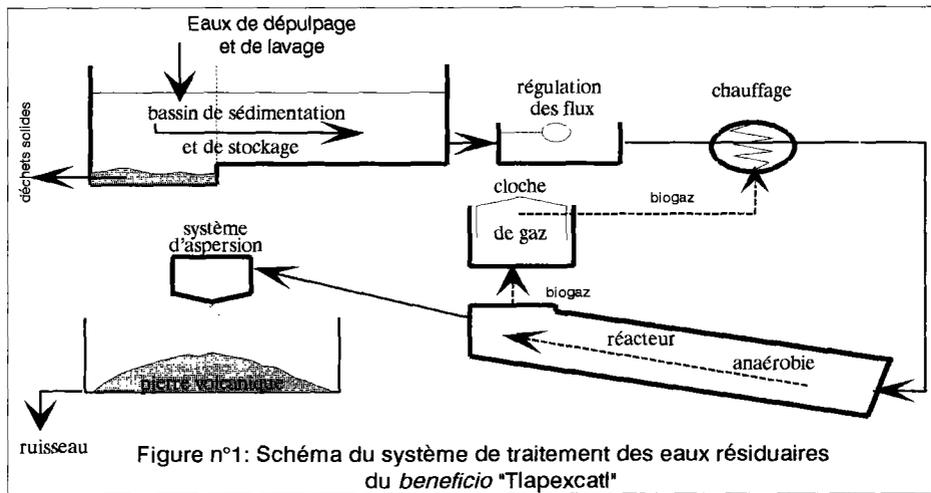
Actuellement, le "*beneficio Tlapexcatl*" utilise une moyenne de 8 l d'eau par kg de cerise, avec une charge moyenne de 3 000 mg de DCO/l.

Il a été décidé de construire un digesteur anaérobie pilote de 10 m³ utiles. Il fonctionne avec un temps de rétention d'un jour, suffisant pour traiter 3 kg de DCO/m³ de digesteur, avec une efficacité de 80%. Un tel digesteur est capable de traiter la totalité des eaux résiduaires produites par le *beneficio* remodelé pour consommer le quart de la consommation journalière moyenne actuelle. Le bassin de stockage, de 36 m³, sert de tampon pour réguler le rejet d'importantes quantités d'eau lors du pic de production.

Un traitement aérobie de finition est prévu afin d'atteindre une efficacité totale de 95%.

2.3 - Construction et inoculation du digesteur.

* Description du système: (cf figure n° 1).



- Le bassin de stockage ($V = 36 \text{ m}^3$).

Il se compose de deux parties: dans la première, plus profonde de 50 cm, se sédimentent les éléments solides les plus importants. Ce bassin sert de réserve pour stocker des débits instantanés élevés, mais possède en plus un rôle biologique.

- Le réservoir de régulation ($V = 0,25 \text{ m}^3$).

Il sert à maintenir un niveau d'eau constant grâce à un système de flotteurs. Toute la circulation d'eau se fait uniquement par gravité. Il faut donc maintenir un dénivelé suffisant entre l'entrée et la sortie du digesteur afin d'obtenir un flux constant en jouant uniquement sur l'ouverture des vannes.

- Le système de chauffage ($V = 40 \text{ l}$).

C'est un chauffe-eau domestique à thermostat. Il fonctionne au butane en début de campagne puis ensuite au biogaz. Il sert à chauffer l'affluent de $15-20^\circ \text{C}$ à $23-25^\circ \text{C}$, température à atteindre pour augmenter l'activité bactérienne.

- Le digesteur anaérobie ($V_{\text{total}} = 13 \text{ m}^3$, $V_{\text{utile}} = 10 \text{ m}^3$).

C'est un digesteur hybride, composé de deux parties séparées par une paroi perforée: un lit de boues type UASB⁵ dans la partie inférieure, et un système de filtre anaérobie dans la partie supérieure, constitué de pierres volcaniques ($1/3$ du volume total, c'est-à-dire 4 m^3). Ce filtre permet une meilleure digestion des solides en suspension grâce à l'augmentation du Temps de Rétention Hydraulique.

Il a été construit localement, en fibre de verre. Il est isolé par une couche de polystyrène et enterré en suivant la pente naturelle du terrain. 13 tubes d'échantillonnage permettent de suivre les phénomènes biologiques tout le long du traitement, à l'intérieur du réacteur. Il est incliné à 20° pour, en principe, améliorer le mélange et augmenter le contact bactéries-matière organique. Cette inclinaison a aussi permis l'isolation à moindre coût.

- Cloche à gaz ($V = 7 \text{ m}^3$, en basse pression).

C'est un cylindre d'acier hermétiquement fermé d'un côté qui se déplace dans un réservoir d'eau au fur et à mesure qu'il se remplit de biogaz. Il est connecté au chauffe-eau.

5 Upflow Anaerobic Sludge Blanket.

- Bassin de finition ($S = 25 \text{ m}^2$).

Il contient 6 m^3 de pierres volcaniques qui jouent le rôle de filtre aérobie. En sortant du réacteur, l'eau est stockée dans un réservoir de PVC ($V = 750 \text{ l}$). Quand il est plein, il se vidange automatiquement grâce à un système de siphon. L'eau tombe en pluie (pour se charger en O_2) et ruisselle sur le tas de pierre sur lesquelles se développe une couche de micro-organismes aérobies qui va digérer une partie de la DCO restante avant le retour de l'eau au ruisseau. Avec ce dernier traitement, l'efficacité totale du système pourrait atteindre les 95%.

Respecter le coût de construction a été le principal problème ($< 1\,000 \text{ US.}\$/\text{m}^3$ de réacteur). Par exemple, la circulation de l'eau se fait par gravité, en profitant de la pente naturelle du terrain.

De même, tous les bassins ont été construits avec des matériaux communs (pierres, blocs et ciment), sauf le digesteur fabriqué en fibre de verre et résine de polyester. Avec un nombre suffisant de digesteurs (>10 unités), un moule serait construit, ce qui permettrait de diminuer considérablement les délais et coûts unitaires de construction.

*** Inoculation; discussion sur les sources:**

Comme tous les processus biologiques, le procédé de traitement anaérobie des eaux usées a besoin d'une période d'adaptation pour atteindre sa capacité maximale. Les bactéries de l'inoculum doivent s'adapter à leur nouveau milieu et s'y multiplier. Il est donc important de disposer d'un bon inoculum. L'idéal serait d'utiliser des bactéries issues d'un réacteur similaire. D'une façon générale, un bon inoculum doit avoir l'activité méthanogénique la plus élevée possible, et une bonne sédimentabilité pour éviter le lessivage. Wasser et al., (1987), ont comparé 4 sources d'inoculum, par ordre de disponibilité décroissant: fumier digéré, boues de fosses septiques, vase de rivière et de lagune. La faible activité méthanogénique de ces inoculums reste le problème majeur avec en plus, pour le fumier digéré communément utilisé, un lessivage dû à sa mauvaise capacité de sédimentation. Les boues issues de fosses septiques sont les plus adaptées, par leur bonne sédimentabilité (très important pour un réacteur type UASB). Ainsi, le digesteur "Tlapexcatl" a été inoculé avec 8 m^3 de boues provenant d'une station d'épuration urbaine, type "fosse septique", de Xalapa.

*** Coût de l'installation:**

L'installation du système a coûté $960 \text{ US.}\$/\text{m}^3$ de digesteur (V_{Total}) dont 33,7% correspondent au coût du seul réacteur, c'est-à-dire $323 \text{ US.}\$/\text{m}^3$. Le reste comprend le génie civil et l'inoculation.

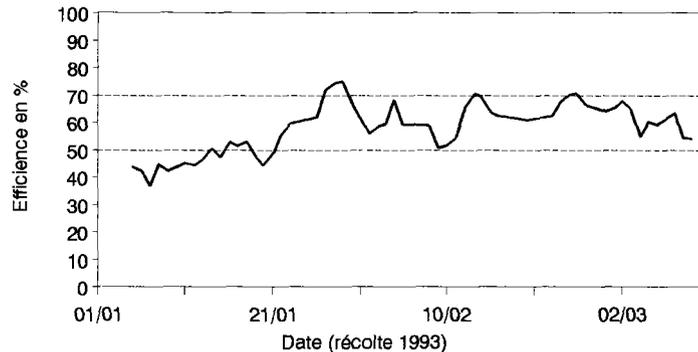
2.4 - Evaluation après une campagne.

*** Evaluation technique du digesteur: efficacité et production de gaz.**

L'inoculation du digesteur s'est faite en deux étapes. Une première inoculation de 8 m^3 a eu lieu en février 1992. Elle a été suivie d'une courte période d'adaptation (3 semaines), très perturbée par des problèmes d'acidification et de lessivage des boues. En décembre 1992, au moment de commencer la nouvelle récolte, un complément de 750 litres d'inoculum de la même origine a été apporté. L'évaluation du digesteur a pu commencer en janvier 1993.

Le principal paramètre choisi pour évaluer le réacteur est l'efficacité à savoir la diminution relative de la charge organique (DCO exprimée en $\text{mg d'O}_2/\text{l}$) entre affluent et effluent. Un problème de flux n'a pas permis de déterminer le Temps de Rétention Hydraulique en continu; tous les calculs seront fait en utilisant un TRH moyen (sur la durée totale de la campagne) de 3 jours. Pour calculer l'efficacité d'un jour X, on prend la DCO moyenne à l'entrée du digesteur du jour choisi et des deux précédents (DCO affluent), à laquelle on retire la DCO moyenne à la sortie du digesteur de ce même jour et des deux suivants (DCO effluent). En divisant ce résultat par la DCO affluent, on obtient la courbe d'efficacité de la figure n° 2.

Figure n°2: Efficacité du réacteur anaérobie "Tlapexcati" calculée sur la base d'un Temps de Rétention Hydraulique de 3 jours



En un mois environ, une efficacité maximale un peu supérieure à 70% a été atteinte, mais avec des charges journalières assez faibles (0,5 à 1,0 kg de DCO/m³ de réacteur et par jour). Une baisse de cette efficacité due à une surcharge accidentelle (évaluée à 4,0 kg de DCO/m³/jour) a ensuite été observée. Le digesteur est alors resté fermé trois jours. Puis, travaillant avec des charges fluctuant entre 1,5 et 3,0 kg de DCO/m³/jour, l'efficacité s'est maintenue entre 60 et 70%, baissant à 50% quand la charge journalière était trop importante.

La production de biogaz varie en fonction de l'efficacité et de la charge administrée. D'après les mesures réalisées, la production maximale a atteint 7,7 m³/j, c'est-à-dire 0,77 m³ de biogaz/m³ de réacteur/j, ce qui correspond au traitement de 3,0 kg de DCO/m³/j avec une efficacité de 70%. La composition du biogaz produit fluctue entre 76 et 82% de méthane.

*** Autres fonctions du bassin de stockage:**

La première est de diminuer la charge organique moyenne des eaux usées (5 500 à 6 000 mg de DCO/l à l'entrée du bassin, mélange d'eau de dépulpage, de premier et de second lavage) sous l'effet conjugué de deux phénomènes: la sédimentation des particules les plus denses et le flottement des plus légères qui vont former une nappe en surface. La DCO de ces eaux se réduit ainsi en quelques heures de près de 30%. Ces phénomènes peuvent être considérablement augmentés (jusqu'à une baisse de 50%) si l'on ajoute de la chaux ou un autre alcalinisant.

La seconde est une fonction biochimique: dans ce bassin commence la première phase du processus microbologique, l'hydrolyse des molécules complexes de l'affluent en molécules plus simples directement utilisables par les premières bactéries de la digestion anaérobie. Si le temps de rétention de ce bassin est suffisant, le processus d'acidification débute, conduisant à la formation d'Acides Gras Volatils (AGV), substrat des bactéries méthanogènes. Ainsi, avec un pH légèrement acide (5 à 6) et un peu d'alcalinité (conditions atteintes avec une légère alcalinisation en utilisant de la soude par exemple), l'activité microbienne va permettre d'atteindre une efficacité d'environ 6% par jour.

*** Problèmes techniques du système: débit et acidité.**

Deux problèmes principaux apparaissent après une campagne de fonctionnement:

- la régulation du flux d'alimentation du digesteur et donc par voie de conséquence, de la charge organique,
- le contrôle du pH de l'affluent.

Ces problèmes ont une grande incidence sur le fonctionnement optimum du digesteur.

Les problèmes de flux sont dûs à la volonté de minimiser les coûts d'installation, en utilisant uniquement la gravité comme force motrice. Le fonctionnement du digesteur est soumis à différents phénomènes de pression: celle de l'affluent mais aussi celle du gaz produit dans le digesteur qui vient perturber le flux dû à la gravité. Dans ces conditions, il est impossible d'obtenir un débit constant. Les tubes d'alimentation se bouchent avec du gaz ou avec des boues denses qui se sédimentent (quand on ferme le digesteur). La seule solution est d'installer une pompe à débit réglable, de façon à obtenir un flux constant et contrôler parfaitement la quantité de DCO qui va entrer dans le réacteur durant une période donnée.

L'autre problème est le contrôle du pH à l'entrée du digesteur. A la sortie du *beneficio*, les eaux usées ont un pH moyen de 6. Mais très vite, ce pH diminue sous l'influence des processus d'hydrolyse et d'acidification qui se poursuivent jusqu'à consommer toute l'alcalinité contenue dans l'eau. Normalement, un digesteur anaérobie fonctionne avec des affluents dont le pH se situe entre 6,5 et 7,0. Pour traiter les eaux de café, il faut donc ajouter des quantités importantes d'alcalinisants, ce qui conduit à des coûts de fonctionnement importants. Mais, une neutralisation même incomplète reste indispensable à un fonctionnement correct du digesteur. Il a donc été décidé d'opérer à un pH maintenu aux alentours de 5,0-5,5, qui sera atteint en diminuant le pH de l'affluent progressivement, de façon à sélectionner peu à peu les bactéries les mieux adaptées à ce milieu. Pour neutraliser, l'hydroxyde de sodium (NaOH) a été préféré à la chaux pour éviter le remplissage du réacteur par de la matière inorganique (CaCO₃). De plus, en neutralisant, l'alcalinité de l'affluent augmente. Le processus d'acidification commencé dans le bassin de stockage peut se poursuivre.

On contrôle l'activité méthanogène du réacteur en mesurant la quantité d'Acides Gras Volatils de l'effluent. Quand la charge qui entre dans le réacteur est supérieure à celle que peut digérer l'écosystème bactérien, les AGV et l'hydrogène s'accumulent, le pH diminue et tout le processus se déstabilise. Si le digesteur est correctement dimensionné et alimenté, ce genre de problème ne doit pas se produire. Ainsi, un réacteur anaérobie nécessite un suivi d'autant plus rigoureux qu'il est alimenté avec des charges organiques élevées (Moletta, 1992).

Enfin, il existe des problèmes de répartition des boues à l'intérieur du digesteur, dûs à sa conception (incliné à 20°). Il se forme des zones "mortes" et des flux préférentiels. De temps en temps, il faut alimenter le réacteur à pleine puissance en se servant de toutes les entrées, pour obtenir une expansion maximale du lit de boues. Il s'est produit aussi un début de lessivage en fin de récolte qui s'est traduit par une perte de boues, probablement entraînées à travers le filtre par les volumineuses bulles de gaz qui se forment plus bas. Bien que mineure, cette perte de boues pourrait être enrayerée en installant un sédimentateur à la sortie du digesteur qui permettrait la recirculation d'une fraction (à déterminer) de l'effluent. Il serait alors possible de travailler avec des charges journalières et donc des flux plus importants, en mettant à profit la forte alcalinité de l'effluent pour neutraliser partiellement les eaux d'entrée.

* L'avenir du système:

La finalité de ce projet est de pouvoir fonctionner avec les seuls employés de l'usine. Durant la campagne 92-93, le responsable du *beneficio* a été formé pour suivre le fonctionnement du digesteur. Comme tout système biologique, il est délicat. Ainsi, même si l'on comprend la gestion du système, son fonctionnement optimal ne sera possible qu'avec un suivi quotidien et précis de l'affluent, afin de contrôler le pH et la charge pour ajuster le flux d'alimentation le plus proche possible de la capacité maximale admissible en DCO/jour/m³ de réacteur. L'idéal serait qu'un laboratoire spécialisé suive plusieurs systèmes de ce type dans la zone.

CONCLUSION DISCUSSION.

L'installation d'un système pilote de traitement des eaux a permis d'expérimenter une nouvelle alternative face au problème de pollution généré par l'agro-industrie caféière. Avec un coût d'installation compatible avec les exigences économiques des *beneficios* (960 US.\$/m³ de réacteur installé), l'efficacité atteint 70% pour le seul digesteur et monte à 85% lorsqu'on considère le système dans son ensemble, avec le premier bassin de stockage/sédimentation, pour un TRH total de 6 jours. Mais, le digesteur a été conçu pour traiter toutes les eaux d'un *beneficio* consommant seulement 2 l/kg de cerise. A l'heure actuelle, "Tlapexcatl" utilise en moyenne 8 l/kg de cerise; le système installé ne peut donc traiter plus d'un quart des eaux résiduelles totales.

La stratégie de dépollution est indissociable d'une redéfinition de tout le processus technologique de la transformation du café par voie humide axée vers l'économie d'eau. En effet, il vaut mieux traiter une pollution concentrée, pour augmenter le TRH. Par exemple, 20 kg de DQO peuvent être contenus dans 10 m³ d'une eau ayant une charge moyenne de 2 000 mg DQO/l ou dans 5 m³ d'une eau chargée à 4 000 mg DQO/l. Dans le premier cas, nous aurons un TRH d'un jour ($V_{\text{réacteur}} = 10 \text{ m}^3$), alors que dans le second, il sera de deux jours, avec une efficacité forcément meilleure. Avec les nouvelles lois sur l'utilisation et le rejet des eaux, investir dans des systèmes intégrés de transformation du café par voie humide peu consommateur d'eau et traitant ses effluents, peut vite devenir rentable au Mexique.

Après une seule campagne de fonctionnement, les résultats actuels de ce système pilote peuvent être améliorés d'une part par la sélection progressive des bactéries les plus adaptées à ce substrat, d'autre part par l'amélioration et l'optimisation de chaque élément du système. Avec la dernière phase (aérobie) du schéma de dépollution, les 95% d'efficacité globale devraient pouvoir être atteints, conformément à l'objectif initial.

RESUME

La pollution de l'eau générée par l'agro-industrie caféière mexicaine représente au total 42 000 tonnes de DCO en 6 mois. Elle est fondamentalement organique, acide et dissoute. Face à ce problème, le gouvernement mexicain a instauré un permis d'utilisation de l'eau ainsi qu'une taxe de droit à polluer. Dans un premier temps, un diagnostic a permis de déterminer les volumes d'eau utilisés (de 2,2 à 6,2 l/kg de cerise) et la charge organique (de 2,5 à 24 g de DCO/l).

Sur ces bases, un réacteur anaérobie pilote mixte (lit de boues et filtre anaérobie) de 10 m³ utiles est mis en place en 1991-92. Inoculé avec des boues urbaines en début de campagne 1992-93, il traite, après 4 mois de fonctionnement, 3 kg de DCO/m³ de réacteur/j, avec un rendement d'environ 70% et produit 7,7 m³ de biogaz/j. L'investissement total est de 960 US.\$/m³ de réacteur.

SUMMARY

In Mexico, coffee processing via wet method gives origin to 42 000 tons of COD in 6 months. This water pollution is fundamentally organic, acid and consists of dissolved substances. Facing this problem, the Mexican government set up a permission to use the water and a tax to be allowed to pollute.

First, a diagnosis study led to measure the water volumes used (from 2.2 to 6.2 l/kg coffee cherries) and the organic load (from 2.4 to 24 g COD/l).

According to this basis, an upflow anaerobic reactor combining a sludge blanket and a filter of 10 m³ of usable capacity was built in 1991-92. Inoculated with urban sludge at the beginning of the 1992-93 harvest, after 4 months of working, it processes 3 kg of COD/m³ of reactor/day, with an efficiency rate of 70 percent and a biogas production of 7.7 m³/day. The total investment reaches 960 \$ US/m³ of reactor.

BIBLIOGRAPHIE

- ARIAS U. (R.), NIGIANI (R.). - Tratamiento anaeróbico y reutilización de las aguas residuales de lavado de café en reactores UASB a temperaturas entre 20-25 °C. Tercer simposio internacional sobre utilización integral de los subproductos del café, Guatemala, 16 a 18 de febrero de 1987, PNUMA/ANACAFE/ICAITI (Guatemala), s.f., p. 111-121.
- BAILLY (H.), SALLEE (B.), GARCIA G. (S.). - Proyecto de tratamiento de aguas residuales de beneficios húmedos. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. 36, n° 2, avril-juin 1992, p. 129-136.
- FINNEY (A.). - Technologie de traitement du café Arabica "fully washed". Notes sur les pratiques d'usinage appliquées en plantations privées en Afrique Orientale. 1. Technologie de dépulpage, fermentation et lavage. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. 33, n° 2, avril-juin 1989, p. 117-124.
- Instituto Mexicano del Café (INMECAFE). - Gerencia de operaciones industriales, 1988.
- Instituto Mexicano del Café (INMECAFE). - Evaluación sobre el problema de aguas residuales en los beneficios húmedos de café. Foro del Café, Xalapa, México, 6/12/1991, 57 p.
- MOLETTA (R.). - La digestion anaérobie: du plus petit au plus grand. *Biofutur* (Paris), n° 119, janvier 1993, p. 16-25.
- MORALES (J.J.). - Tratamiento de aguas residuales, reutilización y prensado de la pulpa en el beneficio de café. I. Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Cafetalera, Xalapa, México, 12 a 15 de abril de 1989. Instituto Mexicano del Café, Universidad Autónoma Metropolitana/ORSTOM (México), 1990, p. 77-93.
- WASSER (R.), OROZCO S. (C.), CANTARERO P. (V.R.), MESIAS R. (O.). - Experiencias sobre el tratamiento anaerobio de las aguas residuales del café en Matagalpa, Nicaragua. Seminario taller sobre tratamiento de aguas residuales agroindustriales., Cali, Colombia, 9-13 de diciembre de 1991, 13 p.
- RIVERO F. (L.), FERNANDEZ V. (A.). - Diseño, construcción, operación y evaluación de un filtro anaerobio piloto para el tratamiento de las aguas residuales provenientes de beneficios de café. Tesis profesional, Universidad Veracruzana, Xalapa, México, 1989, 209 p.
- ZULUAGA V. (J.), COOKMAN (G.P.). - Un sistema de filtro anaeróbico de flujo ascendente (UAF) para la biodigestión de aguas residuales del beneficio de café. Tercer simposio internacional sobre utilización integral de los subproductos del café, Guatemala, 16 a 18 de febrero de 1987, PNUMA/ANACAFE/ICAITI (Guatemala), s.f., p. 122-128.

AN APPROACH TO REDUCE THE TIME REQUIRED FOR BEAN YIELD EVALUATION IN COFFEE BREEDING

M. d. P. MONCADA BOTERO

Centro Nacional de Investigaciones de Café
Chinchiná, Caldas, Colombia

INTRODUCTION

Coffea arabica L. (Rubiaceae) accounts for approximately 78% of the coffee consumed in the world. Though more than 100 species that have been described for this genus, only two, *C. arabica* and *C. canephora* Pierre ex Froehner, are commercially cultivated.

The main objective of the coffee breeding program at CENICAFE in Colombia is development of cultivars resistant to *Hemileia vastatrix* Berk & Br. (coffee leaf rust) and *Colletotrichum coffeanum* Noack. sensu Hindorf. (coffee berry disease). However, efficiency of selection for high bean yield and good beverage quality is the major factor limiting development of new disease resistant cultivars.

In a coffee breeding program, selection for yield is a long-term process. Production is normally measured over 5-year periods by picking the crop 12 to 15 times throughout each year. This process is required for each sexual generation. Shortening the time required to obtain an accurate evaluation of yield potential would be very useful. If early yield selection is effective, the time necessary to obtain a new cultivar could be reduced. Time is certainly a decisive factor when a dangerous pest threatens commercial production. A gain of even 1 year in the selection process would allow a faster release resistant cultivars to that pest, which would mean a significant reduction in potential economic and social risks associated with pest epidemics.

Correlations between juvenile and mature traits are receiving increased consideration from tree breeders because of the economics of shortening breeding cycles and increasing gain per unit time (Namkoong and Kang, 1990). Genetic correlations between early and mature traits are often considerably less than unity, indicating that correlated gain from indirect selection for early generation traits is usually less than gain

from direct selection for mature traits for a given breeding cycle. However, increased gain per unit time has been demonstrated where several breeding cycles can be carried out in the time required for one cycle of direct selection (McKinley and Lowe, 1986). Savings in cultural and data-collection costs can also be realized from selection for juvenile traits as opposed to mature traits.

Gallais (1983) proposed that such selection with low intensity can also be useful as a preliminary selection technique. It can also reduce cost of selection by eliminating undesirable plants or families thereby allowing a better evaluation of remaining material, or an evaluation of more material. Efficiency of indirect selection increases if a greater selection intensity is applied to the secondary trait compared to the primary trait of interest.

Accumulated coffee bean yields of 2- to 3-year-old trees are positively correlated ($P < 0.05$) with accumulated bean yields of 5- to 6-year-old trees (Stoffels, 1941; Dublin, 1967; and Ferwerda, 1969, cited by Walyaro and Van der Vossen, 1979). Thus, early selection for yield potential based on a few years of yield data may be an efficient way to reduce generation time.

Walyaro and Van der Vossen (1979), working with 16 different varieties of *C. arabica* in Kenya, created selection indices for coffee yield based on morphological characters and productivity in the first years and compared them with direct selection for yield after 10 years of production. They found that heritability for yield (mean of four trees) was 0.29 for the 1st year, 0.72 for a total of the first 2 years, and 0.81 for a total of 10 years. They also found that cumulative yield of the first 2 years is correlated highly with yield over 10 years, shown by its relative efficiency of 89%.

Walyaro (1983), based on results obtained from a diallel cross among 11 varieties of *C. arabica*, found that 3-year total yield had a high broad sense heritability on a plot mean basis (0.70 to 0.74).

Fazuoli (1977), studying yield of *C. arabica* cultivars Mundonovo and Borbon during 17 years of harvest, found that the most effective yield selection criterion for individual trees was based on at least 10 to 12 years of production. Also, there were positive and significant correlations between total yield after 4, 6, and 8 years with total yield of 17 years. The accumulated production of the first 4 or 6 years was indicative of the most productive families, but not the most productive individual trees. It was concluded that early selection for yield could be efficient, but only on a plot-mean basis.

The objective of this research was to estimate direct response to selection for coffee bean yields accumulated over 48 months (corresponding to 69 months of tree age), and the correlated response of different variables created by partial accumulated bean yield at different tree ages. Comparisons of direct and correlated responses, per unit of time, will be used to identify yield selection criteria which will allow improvement in efficiency of the selection program.

MATERIALS AND METHODS

The breeding material used in this study resulted from a cross between *C. arabica* cv. Caturra and Timor hybrid.

The F_1 plants resulting from the Caturra (emasculated mother plant) x Timor cross were selfed to obtain 85 F_2 progenies. Selection for bean yield, leaf rust resistance, small plant stature, vigor, and low frequency

of bean abnormalities was performed through the F_4 generation. Reduced plant size, which depends upon a homozygous dominant state of the single gene "caturra" CtCt (Krug and Carvalho, 1951), was selected for early in the F_2 and F_3 generations. Selection for beverage quality and production stability in different environments was practiced in the F_3 and F_4 generations. One hundred thirty-eight F_4 trees were selected at five different stations located in the coffee growing region of Colombia across an elevation range of 1280 to 1600 m, with a mean temperature of 20.5°C. The F_4 trees were selfed to provide F_5 trees for evaluation.

The experimental station on which F_5 families were grown is part of CENICAFE, The National Center of Coffee Research-Colombia. CENICAFE is located at 4°58' N, with an elevation of 1400 m, a mean annual precipitation of 2650 mm, a mean of 1820 sunshine hours year⁻¹, and a mean temperature of 20.7°C. The 138 F_5 families were randomly distributed among four experiments seeded on a Typic Dystrandept soil. Each experiment was designed as a 6x6 simple lattice design with 10 plants per experimental plot.

Three experiments included 35 families and one check cultivar ('Caturra rojo') and were planted in September 1981. The other experiment included 33 families and three check cultivars ('Caturra rojo', 'Caturra amarillo', and 'Caturra 19') and was planted in October 1982. All trees were spaced 1 m apart within plots and 2 m apart between plots.

Trees were fertilized twice per year. Fertilizer was incorporated into a 0.09-m² area of soil surrounding each tree. During the first two years, 28 g N tree⁻¹ year⁻¹ was applied. After the second year, fertilizer was applied to each tree at a rate of 7.21 g N tree⁻¹, 1.11 g P tree⁻¹, 6.37 g K tree⁻¹, and 0.51 g Mg tree⁻¹ once during each growing season.

Beans were harvested by hand from each tree, beginning 22 months after each experiment was planted. Fresh bean yield was determined for each tree on 48 harvests over a 4-year period. Harvests occurred approximately monthly.

A total of 68 variables were created from the yield data over 48 harvests. Variable Y was the sum of bean yield over all harvests, and was the variable to which all other potential selection criteria were compared. Variables Z_{22}, \dots, Z_{68} were accumulated bean yields for all the harvests prior to and including the age (months) indicated in the index value, e.g., Z_{22} was bean yield of the first harvest, Z_{23} was the sum of the first two harvests, etc. Variables W_1, \dots, W_{12} were 4-year-total bean yields for each month of the year: 1= July, 2= August, ..., 12= June. For example, W_1 was 4-year-total bean yield for all July harvests. Variables V_1, \dots, V_4 were accumulated bean yields for the number of years indicated by the index value and corresponding to the three months of typical maximum bean production (September, October, and November; see Fig. 1). For example, V_2 was total bean yield for September through November harvests of the first 2 years. Variables U_1, \dots, U_4 were accumulated bean yields for the number of years indicated by the index value and corresponding to the five months in which both the primary and secondary (March and April) bean yield peaks typically occur (Fig. 1). For example, U_3 was total bean yield for harvests made during these 5 months in the first 3 years.

Analyses of variance for the simple lattice and for a randomized complete block design were done for Y and for bean yield of each harvest in order to estimate the relative efficiency of the simple lattice design (Cochran and Cox, 1957). Genetic parameter estimates were computed separately for each of the four experiments. Four multivariate analyses of variance were performed, one for each of the four groups of variables: Z, W, V, and U. Variable Y was included in each analysis. Mean squares and mean products

for families and experimental error were used to estimate family variance and covariance components for each Z, W, V, and U variable of each experiment. Covariance components of interest were those between Y and each other variable.

Heritability (h^2) was estimated on a family mean basis from components of variance (Falconer, 1989) for each variable:

$$h^2 = s^2f/[s^2f + s^2e/r + s^2w/rn]$$

where s^2f , s^2e , and s^2w are the family, error, and within-plot variance components, respectively; r is the number of replicates and n is the number of trees per plot. Genetic correlation (r_g) estimates (Falconer, 1989) were computed for each Z, W, V, and U variable with Y. Expected direct selection response for variable Y (R_Y) and expected correlated response of the variable Y, due to selection for each Z, W, V, and U variable (CR_Y), were computed according to Falconer (1989).

Values of R_Y were expressed as $R_Y/69$, the expected change in the population mean per month required to determine Y. Values of CR_{Y,Z_h} were expressed as $CR_{Y,Z_h}/t_{Z_h}$, where t_{Z_h} = the number of months required before Z_h could be determined. Because these trees were indeterminate, selection could be conducted and the generation advanced immediately after any of the Z, W, V, and U selection criteria are determined. Values of CR were expressed as a percentage of R_Y for all Z, W, V, or U variables. Selection intensities were assumed to be equal for all potential selection criteria.

Three different criteria were used to identify the youngest age (Z_h) in which harvesting may be ceased and selection among F_5 families conducted for bean yield.

1. For each of the four experiments, the youngest age for which the estimated CR/R of the associated Z variable were greater than 100% were determined. Subsequently, the mean and standard deviation of these four age estimates were computed and used to compute the upper limit 95% confidence interval for the mean youngest age at which CR/R can be expected to exceed 100%.
2. Criterion 1 was repeated following logarithmic transformation of the four age estimates. This was done to transform the data to a more normal-shaped distribution.
3. For each tree age, the CR/R ratio corresponding to each of the four experiments was determined. For each Z variable, the mean and standard deviation of CR/R for the four experiments were computed. The lower limit 95% confidence intervals for m (CR/R) were computed for each tree age. From the 47 lower limits obtained, the first chronological value greater than 100 was selected. The tree age corresponding to this selected lower limit was chosen as the optimum Z variable for this criterion.

RESULTS AND DISCUSSION

The lattice design generally had a low relative efficiency compared to the randomized complete block design. Relative efficiency values for Y and the bean yields of the 47 individual harvests ranged from 70 to 178%, with a mean of 95%. Only 58 out of 188 relative efficiency values were greater than 100%. Therefore, all analyses were based on a randomized complete block design.

Heritability estimates for Y ranged from 0.60 to 0.86 among the four experiments. These values were similar to those reported in other studies (Walyaro and Van Der Vossen, 1979; Walyaro, 1983).

Heritability of accumulated bean yield reached 90% of its maximum value on or before 27 months of age (Z_{27}) for each of the four experiments. Heritability of bean yield remained within 10% of the maximum value for all Z variables, except for Z_{36} through Z_{50} of experiment 81.4, where it ranged from 83 to 89% of its maximum. Srinivasan (1982) also calculated heritability for accumulated bean yield following the 1st, 2nd, and 3rd production years, finding moderate heritability which increased progressively in the 2nd and 3rd years.

Heritability values for the W variables (Table 1) were highest and most consistent in March (0.82 ± 0.02) and April (0.82 ± 0.01), the months corresponding to the secondary peak of bean production (Fig. 1). Heritability was lowest and most variable among the experiments in May (0.64 ± 0.20), June (0.56 ± 0.20), July (0.59 ± 0.07), and August (0.60 ± 0.10), the months corresponding to and immediately following maximum bean production. These results could be influenced by variation in timing of the change from the dry season (June, July, and August) to the wet season (March-April). Heritability was high (0.75 ± 0.08) for all V and U variables, and did not show any relationship with the number of years of data collection. It is assumed, in order to estimate heritability, that the variance between families is due mainly to genotypic differences and can be regarded as an estimate of s^2_g . However, it is possible that genotype x environment interaction exists for these families, and that the estimated heritability is biased.

Genotypic correlation estimates (r_g) between total bean yield (Y) and the variable Z_h (partial yields) were positive and increased as the number of harvests increased. Values were particularly high (>0.70) between total yield over 48 months (69 months tree age) and for all variables after Z_{41} . From variable Z_{53} (corresponding to an age of 53 months) on, the correlation value for all the experiments exceeded 0.90 suggesting a strong genetic relationship between accumulated yield estimates between 53 and 69 months of age. For variables W, V, and U there was not a consistent trend in the genetic correlation coefficient.

Ratios of $CR_{Y,Z_h}/R_Y$ were highly variable between 22 and 35 months of age (Fig. 2). Experiments 81.3 and 81.4 had a rapid rise in the $CR_{Y,Z_h}/R_Y$ ratio, with maximum values near 200% at less than 30 months of age. Experiments 81.2 and 82.2 had a considerably slower rise in $CR_{Y,Z_h}/R_Y$, with maximum values near 140%. There were no obvious factors to which differences in response for the two groups of experiments could be attributed. These differential responses may be due to unknown environmental effects, to sampling variation among environments, and/or sampling variation within the population of F_5 families. The $CR_{Y,Z_h}/R_Y$ ratios were surprisingly high, surpassing 100% for total yield after 32 months of age, and thereafter, for all experiments. These values were partly influenced by high genetic correlation coefficients between Y and the Z_h variables (Falconer, 1989). These correlation coefficients may be inflated due to the autocorrelation that exist between Y and each Z_h variable. The $CR_{Y,Z_h}/R_Y$ curves for the four experiments (Fig. 2) converge after 37 months of age and slowly decline to their mathematical limit of 100%.

The upper-limit 95% confidence interval estimates were 35 and 36 months for criteria 1 and 2, respectively. For criterion 3, the lower 95% confidence limits of $CR_{Y,Z_h}/R_Y$ first exceeded 100% at 36 months of age (Fig. 3). Indirect selection for yield at 36 months of age would be, on average, 37% more efficient than direct selection at 69 months of age.

Estimates of the CR/R ratio for the W variables were highly variable among the four experiments for most months. All estimates were lower than 82%. Therefore, indirect selection using these variables was not expected to be efficient. Yield obtained in only 1 month per year was never representative of the total yield for 69-month-old trees.

The CR/R ratio was highly variable for 1-year total and 2-year total yield of the 3 months coinciding with the maximum production period. The V_1 and V_2 variables had a mean CR/R greater than 100%, but their standard deviations were extremely high (58 and 25%, respectively). The V_3 and V_4 variables had mean CR/R ratios lower than 92%. Early selection based on yields from only these 3 months is not expected to be effective in improving total yield of 69-month-old trees.

The trend for the U variables was similar to that for the V variables. However, for the 2-year total of the 5 months corresponding to the two maximum production periods (U_2), the mean CR/R ratio was $121 \pm 9\%$. Thus, selection based on the first 2 years of accumulated bean yield for the 5 months of typically maximum production is expected to be 21% more efficient than direct selection.

Selection of the 14 F_5 families (10.1%) with highest yield based on the Z_{36} and U_2 variables identified seven (50%) of the families with the highest yield based on Y. Selection differentials, measured in terms of Y, were 70.4 kg tree⁻¹ for Z_{36} and 71.4 kg tree⁻¹ for U_2 , 23% and 22% lower, respectively, than the selection differential for Y per se (91.5 kg tree⁻¹).

CONCLUSIONS

Results of the present study indicate it may be efficient to select among F_5 families for accumulated yield of the first 15 bean harvests (36 months of tree age), increasing efficiency by 37% compared with that of direct selection for 4-year accumulated bean yield. This early selection can reduce the F_5 generation of the overall breeding cycle by 32 months (a 47% reduction). This 32-month reduction in F_5 generation time translates to a 13% reduction in average breeding cycle time, typically 20 years from the initial parental cross to the conclusion of F_5 advanced yield tests. Thus, even if the true CR/R ratio for accumulated yield of 36-month-old trees is little more than 100%, the 2.7-year reduction in the breeding cycle would result in more rapid cultivar development without reducing yield potential. This would be extremely valuable, because the most important goal is improved pest resistance. Any significant reduction in the breeding cycle would allow cultivars with new and/or improved pest resistances to move more rapidly into commercial production.

Results apply to selection among F_5 families, which are approximately 94% inbred. Knowledge of potential reductions in cycle time for earlier, more heterozygotic generations will require similar studies of early generation materials.

Previous research suggests that heritability of bean yield on an individual tree basis is extremely low, suggesting that selection within families should be based upon traits other than bean yield. An optimal F_5 evaluation scheme, based upon these results, would combine among-family selection for bean yield with within-family selection for other traits on an additional set of trees.

REFERENCES

- Bettencourt, A. J. 1974. Consideracoes gerais sobre o "Hibrido de Timor". Instituto Agronomico. Circular # 23. Campinas, Brazil.
- Castillo, Z. J., and R. G. Moreno. 1988. La Variedad Colombia. Selección de un cultivar compuesto resistente a la roya del cafeto. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. Cenicafé. Colombia. 171 p.

- Cochran, W. G., and G. M. Cox. 1957. *Experimental designs*. 2nd ed. John Wiley & Sons. 611p.
- Falconer, D. S. 1989. *Introduction to quantitative genetics*. 3rd. ed. Longman Scientific & Technical 438 p.
- Fazuoli, L. C. 1977. *Avaliacao de progenies de Cafe Mundo Novo (C. arabica L.)*. Master thesis. Universidade de Sao Paulo, Brasil. 146p.
- Gallais, A. 1983. Use of indirect selection in plant breeding. p. 45-60 *In* Large, W. A., C. Zeven, and N. G. Hogenboom (ed.). *Efficiency in plant breeding*. Proc. 10th Congr. European Association for Research on Plant Breeding, EUCARPIA. Wageningen, The Netherlands, 19-24 June. 1984. Pudoc Wageningen. 383 p.
- Krug, C. A., and A. Carvalho. 1951. The genetics of Coffee. *Adv. in Genet.* 4: 127-158.
- McKinley, C. R. and W. J. Lowe. 1986. Juvenile-mature correlations. Advanced generation breeding of Forest Trees. So. Coop. Series Bul. # 309. Louisiana Agric. Exp. Stn. p. 11-16.
- Namkoong, G., and H. Kang. 1990. Quantitative genetics of forest trees. pp. 139-188. In: Jules Janick, Ed. *Plant Breeding Reviews*, Vol 8. Timber press.
- Parra, A. 1975. *Ensayos de Uniformidad en Cafe*. Centro Nacional de Investigaciones de Cafe. Informe Anual 1975.
- Walyaro, D. J. A. 1983. Considerations in breeding for improved yield and quality in arabica coffee (*Coffea arabica* L.). Ph. D. diss. University of Wageningen. Wageningen, The Netherlands. 119 p.
- Walyaro, D. J., and H. A. M. Van Der Vossen. 1979. Early determination of yield potential in arabica coffee by applying index selection. *Euphytica* 28:465-472.

ABSTRACT

Efficiency of plant breeding programs, particularly in perennial crops, may be improved by reducing time required for evaluation prior to selection. The objective of this work was to study expected selection responses of several variables based on partial bean yields compared to total accumulated bean yield of coffee (*Coffea arabica* L.) over the first 48 months of production. One hundred thirty-eight F₂ families of a cross between *C. arabica* cv. Caturra and Timor hybrid were randomly distributed among four experiments transplanted in 6x6 simple lattice designs. Beans were harvested monthly, by hand, from each tree. Fresh bean yield was determined for each tree on 48 harvests over a 4-year period. Sixty-eight variables were created from bean yield data collected over the 48 harvests. Heritability was estimated on a family mean basis from components of variance for each variable. Direct selection response for total yield (R) as well as correlated response for total yield (CR), due to selection for a correlated variable, were also computed. The CR/R ratios exceeded 100% for accumulated bean yield of all harvests after 32 months of age in each experiment. Confidence interval estimates (95% level) of mean CR/R or mean age at which CR/R exceeded 100% suggested an optimum age of 36 months. Selection for accumulated bean yield at 36 months-of-age was estimated to be 37% more efficient, per year, as selection at 69 months-of-age. The only other variable with potential as an efficient selection criterion was accumulated bean yield for the 5 months of typically maximum bean production during the first 2 years.

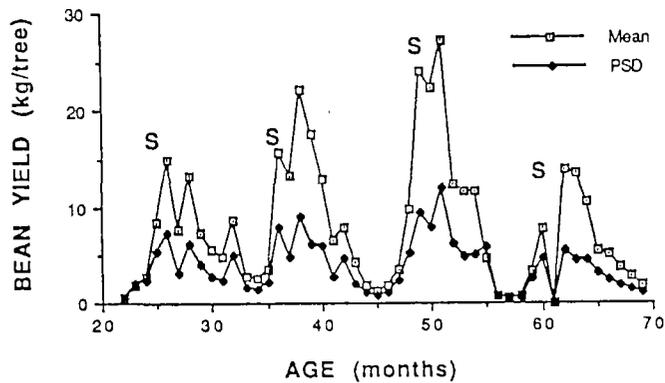


Fig. 1. Coffee bean yield distribution, illustrated as means and phenotypic standard deviations (PSD) of 138 F_5 families from a cross between *C. arabica* cv. Caturra and Timor hybrid grown in two replicates near Manizales, Colombia. The letter S indicates September in each of the 4 harvest years.

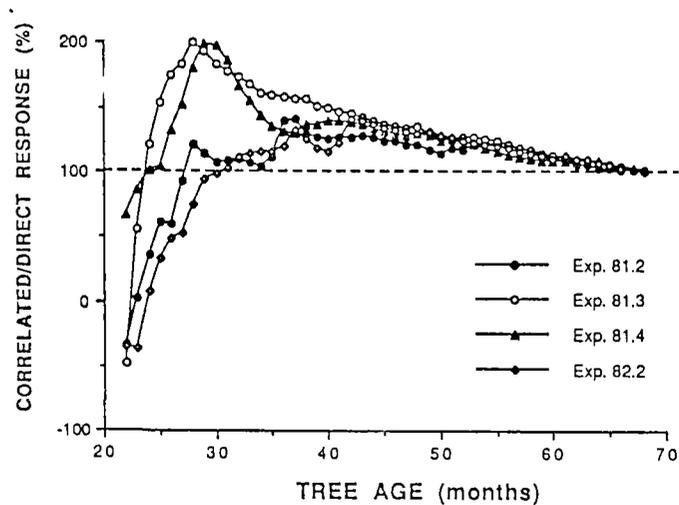


Fig. 2. Estimated correlated response for total coffee bean yield over 47 months, expressed as a percentage of direct response to selection, and based on selection for accumulated bean yield for 22 to 69 months of age.

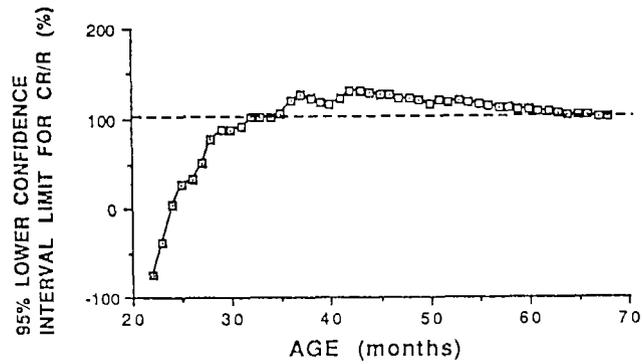


Fig. 3. Lower 95% confidence limits for the ratio CR/R (CR=correlated response to indirect selection at specified age, R=direct response to selection at 69 months of age).

Table 1. Heritability for total monthly bean yield over 4 years.

Month	Heritability		Genetic correlation with Y^{\dagger}	
	Mean [‡]	Standard deviation [‡]	Mean [‡]	Standard deviation [‡]
July	0.59	0.07	0.01	0.41
August	0.60	0.10	0.33	0.04
September	0.68	0.08	0.45	0.27
October	0.79	0.07	0.52	0.07
November	0.64	0.14	0.55	0.17
December	0.67	0.08	0.53	0.25
January	0.77	0.08	0.40	0.24
February	0.73	0.03	0.60	0.06
March	0.82	0.02	0.34	0.18
April	0.82	0.01	0.34	0.16
May	0.63	0.17	0.24	0.26
June	0.56	0.19	-0.02	0.45

[†] Y= Total bean yield over 47 harvests.

[‡] Mean and standard deviation among the four experiments.

LA COOPERACIÓN TÉCNICA FRANCESA EN AMÉRICA CENTRAL : LA EXPERIENCIA DE IICA/PROMECAFÉ

J. J. OSORTO

Former Executive Director, PROMECAFE. TECNI-CONSULT, President, P.O. Box 7529, San Pedro Sula, Honduras

1. INTRODUCCION

El Programa Cooperativo Regional para la Protección y Modernización de la Caficultura en América Central, México y República Dominicana, fue creado en 1978 con el propósito de establecer una red de cooperación técnica en aspectos de generación y transferencia de tecnología, capacitación y de promover el intercambio de información y conocimientos entre los países miembros del Programa.

Desde su inicio, PROMECAFE recibió la colaboración de diferentes organizaciones, entre las que se pueden mencionar el Instituto Brasileiro del Café (IBC), la Agencia Internacional para el Desarrollo de los Estados Unidos y en aquel entonces el Instituto Francés de Café y Cacao del GERDAT, que hoy funciona dentro del Centro de Cooperación Internacional para la Investigación Agronómica y el Desarrollo de Francia, en el Departamento de Cultivos Perennes (CIRAD/CP).

Al cumplir 15 años de una labor fructífera en favor de la caficultura regional, es importante hacer un reconocimiento a la labor realizada por el CIRAD/CP, quien ha contado con el apoyo decidido del Ministerio de Asuntos Exteriores del Gobierno Francés, por el apoyo o en la ejecución de las diferentes actividades del Programa Regional.

En el presente trabajo, se hace una revisión de las principales acciones desarrolladas en el ámbito de esta cooperación que debe servir de modelo para su utilización en otras regiones del planeta.

2. ANTECEDENTES DEL CONVENIO DE COOPERACION ENTRE EL CIRAD Y EL IICA

El Programa Cooperativo funciona en base al Convenio de Operación suscrito por los países participantes, el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA) y el Centro Agronómico Tropical para la Investigación y Enseñanza (CATIE), quienes conforman el Consejo Directivo del Programa, en el que también participa un delegado de la Oficina de Cooperación Francesa en América Central y el Delegado del CIRAD para América Latina. El convenio se suscribe por períodos de cinco años, y ha sido renovado en 1982, 1987 y en 1992, estando vigente hasta el 31 de diciembre de 1997.

El convenio de cooperación entre el CIRAD/IRCC y el IICA/PROMECAFE se ha suscrito por períodos de cuatro años hasta 1992, cuando se acordó que la cooperación técnica del CIRAD, se debe enmarcar en el convenio general suscrito entre el IICA y este organismo del Gobierno Francés.

Los objetivos del Convenio IICA/PROMECAFE-CIRAD se orientan a la asistencia técnica en diferentes aspectos de interés para los países beneficiarios del Programa: implementación de programas de investigación, con el propósito de encontrar solución a problemas específicos de la caficultura; apoyar la capacitación de técnicos en diferentes disciplinas a corto y mediano plazo en instituciones educativas de Francia y en general a promover el establecimiento de redes de cooperación horizontal a nivel regional, entre los programas nacionales de investigación.

3. AREAS DE COOPERACION

La cooperación técnica del CIRAD con IICA/PROMECAFE se inició en 1980 con al asignación del Dr. Raoul Muller, especialista en Fitopatología del IRCC, misma que fué ampliada a otras disciplinas como se presenta a continuación:

3.1 Fitopatología

La asesoría en el área de Fitopatología fué muy valiosa en el inicio del Programa en 1980, considerando que existía mucha preocupación en la región por el apareamiento de la Roya del Cafeto (*Hemileia vastatrix*) en Nicaragua en 1976 y que se diseminó por los demás países en el termino de cinco años. Esta enfermedad era desconocida por técnicos y productores por lo que se requirió implementar campañas educativas y el establecimiento de Programas de Investigación orientados al estudio epidemiológico para conocer el comportamiento de la enfermedad en las diferentes zonas de producción. En forma paralela, se establecieron experimentos para determinar las recomendaciones de control químico más económicas y menos contaminantes para el ambiente.

La realización de estas actividades, permitió que a mediados de la década se tuvieran recomendaciones para un control adecuado de la enfermedad con dos a tres aplicaciones de fungicidas cúpricos con una dosis de 1.5 a 2.0 kilogramos por hectárea, espaciadas de 30 a 45 días. La época de aplicación varía de mayo a agosto, dependiendo de las condiciones climáticas de cada zona productora. Estas recomendaciones tuvieron un impacto positivo en los costos de producción y en la reducción de la contaminación ambiental, considerando que las recomendaciones iniciales de control de la enfermedad, eran basadas en informaciones de Brasil, que consideraban 5 aplicaciones por año y una dosis de 3,5 kilogramos por hectárea de fungicidas cúpricos.

Posteriormente, a finales de la década del 80 se dió un nuevo impulso a las investigaciones en Fitopatología, por medio de un especialista del IRCC, que realizó estudios, en coordinación con el INIFAP en Chiapas, México; que permitieron conocer en forma mas precisa, el comportamiento de la Roya bajo diferentes condiciones climáticas en relación al comportamiento del hiesped, demostrando que dependiendo del estado de crecimiento de la planta puede adoptarse un sistema determinado de control químico o de manejo que reduce los efectos dañinos de la enfermedad.

Actualmente se están realizando nuevas actividades en coordinación con ANACAFE en Guatemala, donde ademas de los estudios sobre Roya se realizan experimentos para conocer el comportamiento de la enfermedad conocida como "Ojo de Gallo", (*Mycena citricolor*), así como para determinar el método de control más adecuado. Al cabo de dos años de investigación de campo, se logró determinar que el fungicida Caldo Bordelés, tiene un control eficiente de la enfermedad, comparable con los fungicidas sistémicos modernos que tienen un costo más alto y se establecieron las épocas de aplicación correspondientes.

3.2 Biotecnología

Con el establecimiento del laboratorio central de cultivo de tejidos de PROMECAFE en el CATIE, se dió un mayor impulso al desarrollo de metodologías rápidas para la multiplicación *in vitro* de *Coffea arabica*, especie con la cual no se tenía mucha tecnología aplicada para su uso a corto plazo.

La experiencia del IRCC en la reproducción asexual de Robusta, sirvió de base para el programa de investigación que se inició en el CATIE y cuyos resultados fueron utilizados en la reproducción de las nuevas variedades resistentes a la Roya, tecnología muy necesaria para acelerar el proceso de selección de nuevas variedades en los programas nacionales de fitomejoramiento.

En el desarrollo de estas actividades es importante mencionar los nombres de los Doctores Pierre Dublin y Marc Berthouly del equipo del IRCC, quienes tuvieron la responsabilidad de dirigir esta importante actividad. Entre los resultados mas relevantes, se puede mencionar la adaptación de la metodología de reproducción por microestacas, que permitio establecer experimentos de evaluación de materiales genéticos reproducidos *in vitro* en los diferentes países miembros del programa cooperativo. En estos experimentos se comprobó el buen comportamiento de los genotipos reproducidos en el laboratorio por micro estacas, en relación a los reproducidos por semillas, durante un período de cinco cosechas.

En los últimos años se ha dado énfasis a la adaptación y búsqueda de nuevas tecnologías de reproducción, como la embriogenesis somática, cultivo de anteras, utilización de haploides, etc., con la esperanza de que en un futuro cercano se pueda disponer de una metodología eficiente y de bajo costo para su aplicación a nivel comercial.

El CIRAD/CP tiene asignado en la actualidad a una Biotécnologa, con sede en el CATIE, quien coordina actividades de PROMECAFE a nivel regional.

3.3 Entomología y Nematología

Con la asignación en 1986 del Dr. Bernard Decazy, como Asesor en Entomología, el IRCC dió un fuerte impulso a la investigación que realizaba PROMECAFE en el área del manejo integrado de plagas, principalmente con la Broca del Fruto, (*Hypothenemus hampei*) que es la plaga de mayor importancia económica

en la producción de café. El Dr. Decazy fue apoyado por el Dr. Emile Lavabre, Jefe del Departamento de Entomología del IRCC, logrando formar un excelente equipo de trabajo con el personal técnico contraparte de ANACAFE y de los demás países donde se realizaron actividades.

La mayor parte de las actividades de investigación sobre la Broca del Fruto, se llevaron a cabo en Guatemala en colaboración con ANACAFE, pero se realizaron experimentos colaborativos con el ISIC en El Salvador y con el IHCAFE de Honduras.

Los resultados obtenidos, permitieron reducir los volúmenes de agua, tanto con equipos de espalda de motor como con aspersoras manuales en las aplicaciones de pesticidas. Lo anterior, tiene mucha importancia en las zonas cafetaleras por la escasez de agua. Asimismo se confirmó la efectividad del Endosulfán para el control de la plaga con una o dos aplicaciones como máximo por año, con una dosis de 600 gramos de ingrediente activo por hectárea.

La determinación de pérdidas causadas por la Broca, y de umbrales económicos para las aplicaciones y sistemas de muestreo de la plaga, han servido para la elaboración de recomendaciones más precisas para que los productores practiquen un manejo integrado de la Broca.

Con el propósito de identificar productos químicos alternos al Endosulfán se realizaron evaluaciones de diferentes formulaciones de insecticidas de reciente generación. A pesar del número elevado de productos incluidos en la evaluación, solamente el producto identificado como Pirimifos Metil tuvo una eficiencia aceptable, aunque siempre fue inferior al Endosulfán. La inconveniencia de este producto es que tiene un precio más alto, y posiblemente se pueda utilizar en mezclas con Endosulfán para reducir el costo y el riesgo de desarrollar resistencia a este insecticida.

La Comunidad Económica Europea, aprobó en 1988 un proyecto denominado "Control Biológico de la Broca por medio de Parasitoides de Origen Africano", que contempló actividades en Chiapas-México, Guatemala, El Salvador y Honduras y por parte de Europa se ha tenido la participación del CIRAD/CP de Francia y el IIBC de Inglaterra. Por medio de este proyecto se introdujo y se reprodujo en el Centro de Investigaciones del Sureste de México (CIES), el parasitoide *Cephalonomia stephanoderis*, originario de Togo. Posteriormente, este insecto se distribuyó a los demás países de la región para su reproducción a nivel local y su liberación en las zonas productoras de café.

Después de tres años de actividades, se ha logrado un avance significativo en este proyecto, que puede considerarse un modelo para otros países, en vista de que no ha requerido de grandes inversiones y con el esfuerzo colaborativo se ha llegado a la reproducción del parasitoide a nivel de pequeños productores rurales, en condiciones bastante rústicas y a su liberación en el campo, lo que ha permitido su adaptación a las condiciones de la región, con una eficiencia de control (parasitismo) similar al observado en su habitat natural en Africa.

El manejo integrado de la Broca, incluye la utilización de *Cephalonomia*, prácticas culturales y por último el control químico basado en el umbral económico. En un futuro cercano se espera tener a la disposición el parasitoide *Prorops nasuta*, también de origen africano, que vendrá a complementar el control biológico de la plaga y es posible que en determinadas zonas se elimine el control químico.

El éxito alcanzado en este proyecto se debe en gran parte a la participación del CIRAD, en conjunto con el CIES de Mexico y las instituciones de café de los países participantes en el proyecto. La participación del IIBC

de Inglaterra en el entrenamiento de personal en la cría y en la cuarentena de los parasitoides fué muy valiosa en la ejecución del mismo.

Las investigaciones en Nematología, se han concentrado en el estudio de la dinámica poblacional de *Pratylenchus sp.* y a la evaluación de diferentes medidas de control. Este trabajo se realiza principalmente en Guatemala, donde el problema de nemátodos es endémico, causando graves pérdidas a los productores de café. Recientemente la CEE, aprobó un proyecto a nivel regional para la evaluación de germoplasma, para la identificación de materiales resistentes y/o tolerantes a este problema, lo que permitirá la ampliación de las actividades en ejecución. El CIRAD/CP, tuvo una participación muy importante, en los trámites para la aprobación de este proyecto, en la Comisión de las Comunidades Europeas.

En la actualidad el CIRAD/CP tiene asignado un Especialista en Entomología con sede en Nicaragua y un Especialista en Nematología con sede en Guatemala, quienes tienen funciones de asesores a nivel regional en el área de su especialidad.

3.4 Recursos Genéticos y Mejoramiento Genético

Las instituciones francesas ORSTOM y el IRCC, han tenido un papel muy sobresaliente en la recolección y envío de materiales genéticos de diferente origen africano, tanto de Robusta como de Arabica. Las colecciones efectuadas por estas organizaciones, han sido introducidas en la colección del CATIE en Turrialba, Costa Rica, que constituye en la actualidad, una de las colecciones de germoplasma de café más completas del mundo.

Parte de esta colección, la constituyen los materiales de origen etíope, que presentan factores de resistencia y/o tolerancia a la Roya y a los Nemátodos, que están sirviendo de progenitores en el programa de mejoramiento genético, que se está implementando con la colaboración del CIRAD/CP, a nivel regional en coordinación con el CATIE y el ICAFE de Costa Rica, que beneficiará no sólo a los países miembros de PROMECAFE, sino que a todos los países productores de café arábico, en vista de la importancia que tienen estos problemas fitosanitarios, en la producción de café.

La evaluación de diferentes clones de Robusta, tanto en Francia como en América Central, en relación a su resistencia a los Nemátodos, ha permitido identificar materiales promisorios para su uso futuro, como porta injerto en aquellas zonas con poblaciones altas de esta plaga.

La asesoría prestada por el Doctor Albertus Eskes del CIRAD/CP, junto con el especialista en Mejoramiento Genético asignado a PROMECAFE, ha permitido establecer las bases de un proyecto regional de mejoramiento genético, y que trabaja en estrecha coordinación con los programas nacionales de fitomejoramiento. El financiamiento de esta actividad depende de las aportaciones de los países miembros y del proyecto de Mejoramiento para Resistencia a las principales Enfermedades del Café, que tiene recursos de la CEE y que se ejecuta en forma conjunta con el IICT/CIFC de Portugal y el CIRAD de Francia.

Entre 1990 y 1992, este proyecto de mejoramiento genético ha generado nuevas fuentes de variabilidad genética con diferentes factores de resistencia y/o tolerancia a la Roya y a los Nemátodos, a través del Programa de Hibridación entre materiales selectos de la colección de Etiopía y las variedades élites experimentales y comerciales que han manejado los programas nacionales. La semilla de los nuevos híbridos ha sido distribuida a varios países para su evaluación bajo diferentes condiciones ambientales, que permita la

identificación de los mejores híbridos para trabajos posteriores en el proceso de selección.

3.5 Capacitación

La Cooperación Francesa en el área de capacitación ha sido un componente permanente, gracias al apoyo recibido por la Oficina de Cooperación Francesa en América Central, que depende del Ministerio de Asuntos Exteriores, actividad se coordina en forma excelente con el CIRAD/CP.

Las oportunidades de capacitación pueden ser de corto y largo plazo en disciplinas que se determinan en forma conjunta entre el país miembro, PROMECAFE y e CIRAD/CP, tomando en consideración, las necesidades de formación de recursos humanos que tienen los países miembros. Anualmente, se ofrecen dos becas de capacitación a corto plazo y dos becas a largo plazo para obtener título de Doctorado.

El personal capacitado, ha venido a fortalecer la capacidad de ejecución de los programas nacionales de Investigación, dando como resultado un mejoramiento cualitativo de los trabajos de generación de tecnología, con el consiguiente efecto positivo para la obtención de recomendaciones tecnológicas adaptadas a las condiciones del productor de café.

3.6 ASESORIAS

En adición a las áreas mencionadas, PROMECAFE ha recibido la asistencia técnica de parte del CIRAD, por medio de visitas periódicas que realizan especialistas del CIRAD/CP con sede en Montpellier. Entre las principales disciplinas se pueden mencionar, el apoyo en aspectos de biometría, manejo y fertilidad de suelos, socioeconomía, identificación y formulación de proyectos; así como el seguimiento a las solicitudes de financiamiento de nuevos proyectos ante la Comunidad Económica Europea.

4. CONCLUSIONES

4.1 La cooperación francesa en América Central a través del CIRAD/CP, ha tenido un papel muy importante en el éxito alcanzado por el Programa Cooperativo Regional PROMECAFE.

4.2 La generación de nuevas tecnologías en el manejo integrado de la Roya, y otras enfermedades, y la Broca han tenido un impacto positivo en la reducción de los costos de producción y en la disminución de la contaminación ambiental debida al menor uso de pesticidas.

4.3 Los resultados obtenidos en la reproducción *in vitro* del café, permiten acelerar al proceso reproductivo y son una herramienta muy valiosa para reducir el ciclo de mejoramiento genético tradicional.

4.4 La introducción de nuevas fuentes de germoplasma, provenientes de Africa, han vido a enriquecer el banco de germoplasma del CATIE, permitiendo la utilización de esta variabilidad genética en nuevas combinaciones híbridas, con características agronómicas y de producción, resistentes a las principales enfermedades que atacan al café, como es la Roya y los Nemátodos.

4.5 El programa de capacitación ha fortalecido la capacidad técnica de los recursos humanos en las instituciones contraparte de PROMECAFE en cada uno de los países miembros, gracias a la colaboración del Ministerio de Asuntos Exteriores de Francia y al CIRAD. El personal capacitado al regresar a sus respectivos países, ha mejorado en forma significativa la calidad de la investigación, con el consiguiente efecto positivo en la elaboración de mejores recomendaciones tecnológicas para los productores.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- IICA/PROMECAFE, 1988. "Memoria 10 Años de Labores". IICA, San José, Costa Rica. 173 pp.
- , 1992. Documento Básico. IICA/Guatemala. 29 pp.
- , 1992. Informe Final del Proyecto de Control de Plagas del Cafeto USAID/ROCAP. 135 pp.

RESUME

La Coopération Technique Française pour le Café en Amérique Centrale a débuté à la fin des années 70 dans le but d'apporter une assistance technique au Programme Coopératif pour la Protection et Modernisation de la Caféculture (PROMECAFE), lequel a été créé en 1978 par l'action conjointe des pays d'Amérique Centrale, du Mexique, de la République Dominicaine, de l'IICA et du CATIE. A cette époque, une grave préoccupation existait au niveau phytosanitaire, du fait de l'introduction dans la région de deux nouveaux ravageurs d'importance économique : la rouille orangée du caféier et le scolyte des baies du caféier. Durant les années 80, une importante quantité de travaux a été réalisée en coopération avec les Institutions Nationales du Café et le CATIE, ce qui a permis l'élaboration de moyens efficaces de lutte adaptés aux conditions locales et qui tiennent compte des dangers pour l'environnement, de l'usage intensif des produits chimiques nécessaires au contrôle de ces ravageurs. Dans le champ de la biologie, différentes techniques de culture *in vitro* ont été mises au point pour multiplier *Coffea arabica* par microbouturage et embryogenèse somatique. Un aspect important de cette coopération est la possibilité donnée aux chercheurs de la région de suivre des études de haut niveau ou de participer à des stages de courte durée en France. L'apport financier du Ministère des Affaires Etrangères du Gouvernement français obtenu à travers le CIRAD/IRCC (maintenant CIRAD/CP) a été capital pour la réalisation de ces activités durant cette période de douze ans de coopération.

SUMMARY

The French Technical Cooperation on Coffee in Central America, started in the late seventies, in order to provide technological support to the Program for the Protection and Modernization of the Coffee Cultivation (PROMECAFE), which was established in 1978, with the membership of the countries of Central America, Panama, Mexico and Dominican Republic. At that time, there was a serious concern about the phytosanitary problems related with the appearance of two important pests in the technical assistance was concentrated in the studies of this pests, to have better knowledge under local conditions and also to the development of "in vitro technologies" to reproduce the best genotypes with genetic resistance to the Leaf Rust. During the eighties a lot of work was carried out in cooperation with the National Counterpart Institutions of the Regional Program and at the Tropical Agricultural Center for Research and Training (CATIE), which permitted the design of adequate measure control, taking in account the environmental hazards of the intensive use of agrichemicals and the improvement of techniques for the *in vitro* reproduction of coffee through micro-cuttings and somatic embryogenesis. This cooperation was carried out with the financial support of the Ministry of Foreign Affairs (MAE) of the French Government and the CIRAD/IRCC Department. Also this, has been strengthening in the nineties with several specialists in different disciplines, who are working very closely with the national coffee scientist. It is important to mention, the training program which has permitted, that a significant number of technician have had the opportunity to carry out graduate studies in French Universities, to get doctorate degrees in different fields. In addition, every year a number of young researchers are granted with scholarships, to attend in service short time training courses in France.

REVIEW : DEVELOPMENT OF MECHANISED COFFEE PRODUCTION SYSTEMS IN AUSTRALIA

E. C. WINSTON *, C. P. NORRIS **

* Senior Horticulturist, ** Executive Engineer

Queensland Department of Primary Industries, Walkamin Research Station, Walkamin, Queensland 4872, Australia

1. INTRODUCTION

Coffee is produced in numerous countries, most having plentiful low cost labour by Australian standards. Coffee growing in Australia must utilise as little labour as possible to be economically viable. For this reason production systems developed for different social and economic conditions have proven inappropriate.

Coffee is traditionally hand harvested. In Hawaii, Puerto Rico, Costa Rica and Guatemala, hand harvesting has been estimated at 40-60% of total production costs (Cannell, *et al.*, 1970). At Australian labour rates, the cost of hand harvesting usually exceeds the value of the crop.

Coffee is not a new crop for Australia, as a viable industry existed in the 1890s-1920s with centres spread over 1500 km of Queensland coastline into northern New South Wales (13-28°S). High labour costs and competition from the developing sugar industry were major factors in demise of the industry. In the late 1970s commercial interest was regenerated following high coffee prices and the development of the first mechanical harvesters in Brazil (Winston, 1987). The potential market for locally grown coffee is high as Australia currently imports around 30 000 tonnes of coffee per annum (Hosegood *et al.*, 1988).

In 1981 the Queensland Department of Primary Industries initiated a program to determine the potential for a mechanised coffee industry and in 1988, in conjunction with the Australian Rural Research Industries and Development Corporation, commenced a large research program on development of a mechanised coffee industry.

2. HISTORY OF MECHANICAL HARVESTING

The first work on mechanical harvesting of coffee was performed in Hawaii using limb-shaking techniques (Wang, 1965; Wang & Shellenberg, 1967; and Monroe & Wang, 1968;). Although a significant degree of selectivity was attained, acceptable levels of ripe fruit removal were always accompanied by significant proportions of immature cherry. Cannell *et al.*, (1970) continued trials in Kenya with similar results.

Full mechanical harvesting of coffee was achieved in the late 1970s with the development of large "over the row" coffee harvesters in Brazil, designed to harvest predominantly ripe and tree dried cherry in a one pass non-selective operation (Watson, 1980; Ometto, 1987a,b).

In Australia, the first mechanical coffee harvester, a modified New Zealand PEKO quad shaker berry harvester, was imported in 1982. An FMC-COCO (Brazil) coffee harvester was imported in 1984.

Following problems with the durability and performance of the PEKO machine, it was redeveloped to incorporate shakers of a modified Brazilian design. This shaker design was then used as the basis for the "Coffee Shuttle 1" developed by North Queensland Engineers and Agents (NQEA), Cairns, and later in a large harvester for the "Skyberry" plantation at Mareeba and in an experimental "skeleton" harvester built for the Queensland Department of Primary Industries's (QDPI) research program.

The next major development in machine harvesting was by McBryde Sugar Company in Hawaii who commissioned Mr. Roy Scudder, a designer of the original FMC machine, to develop a "state of the art" selective coffee harvester. The machine designed was a large, self-propelled harvester with four large shakers operating in an unphased paired, tandem arrangement. The machine set new standards in selectivity and harvesting performance (Norris and Peasley, 1989), however it was de-commissioned due to problems outside the original design brief.

Following an initial research program on harvester performance, QDPI developed a self-propelled coffee harvester, which was a radical departure from previous coffee harvesters, incorporating major changes to the shaker system and overall machine layout. This machine has been licensed for manufacture to AUSTOFT, a major manufacturer of sugar cane harvesting equipment and is now commercially available from that company.

3. DEVELOPMENT OF AUSTRALIAN COFFEE INDUSTRY - AGRONOMY.

3.1. CULTIVARS AND ENVIRONMENT

Pioneer growers were limited in available cultivars, with initial plantings based on the local Kairi Typica (origin uncertain- imported by the first coffee industry in the late 1890s) and a Bourbon/Arusha mixture, Caturra, and Blue Mountain, all imported from Papua New Guinea.

Commencing in 1981, the Queensland Department of Primary Industries obtained 60 arabica (*Coffea arabica* L.) and 15 robusta (*C. canephora* Pierre) selections from several overseas coffee research institutes as well as all available local lines. Cultivar trials were established at a number of sites in a wide range of climatic conditions and soil types. At all sites, plant spacings were approximately 4 x 1 m (2500 plants/ha) with plants trained to a single stem, under full sun. The lines were classified into early, mid or late maturing types as well as tall, semi-dwarf and dwarf. Catimor lines mature early while Catuai Rojo, Catuai Amarillo, and Mundo Novo have proved late maturing types (Winston and O'Farrell, 1993a).

Research has determined the most suitable cultivars and areas of best potential. The dry elevated area where most of the revived industry has established has poor shallow soils and a harsh climate. Yields in this area have been considerably less than in other areas with only three lines averaging in excess of 1 300 kg/ha green bean in trials. In this environment, even with a high level of nutritional and irrigation management, yields are lower than at other sites. At a coastal site, ten arabica selections in the period 1984-8 gave annual mean hand-picked yields in excess of 2 700 kg green bean/ha with mean yields of some varieties up to 3 500 kg (Winston and O'Farrell, 1993b). At Walkamin (altitude 550 m), on a deep volcanic soil site, hand-picked yields on 9 of the 14 lines evaluated over a similar period gave mean yields in excess of 4 000 kg green bean/ha. Mundo Novo and Catuai Amarillo had mean yields over 5 000 kg/ha (Winston, unpublished data).

The best performing lines at most locations were the semi dwarf Catuai Rojo and Catuai Amarillo. The semi dwarf Catimor and Caturra along with the tall Mundo Novo, Kierperson Local, SL 6 and the local Kairi Typica also yielded well, but were less favoured for agronomic reasons which included time of early maturity (Catimor), small bean size (Kairi Typica), and excessive growth rates for the taller selections (Winston and O'Farrell, 1993a,b; Winston and Thomson, in press). In cooler elevated areas and areas furthest from the Equator where growth is slower, taller cultivars such as Mundo Novo, K7 and SL 6 are also favoured. Preliminary work found robusta coffee unsuitable for a machine harvested production system.

3.2. FIELD PRACTICES FOR MECHANICAL HARVESTING.

Initial plant spacings of 4 x 1 m were based on Brazilian recommendations. Higher populations were found necessary to increase yield and hedge rows of 3 x 0.75 m for semi dwarf and 3.5 x 0.75 m for tall cultivars are now recommended because of machinery considerations and shading effects. Closeness in the row encourages primaries to develop at right angles to row direction. Primaries developing parallel with the row are less exposed to the harvester fingers resulting in poorer fruit removal. Single stems are recommended for more effective harvesting efficiency and minimisation of losses. Multiple uprights of thick older wood reduce harvester efficiency by damping the vibratory activity of the fingers.

All growers field-plant seedlings mechanically with modified tree or vegetable planters. Planting costs of bare rooted plants are lower, but they have a lower survival rate than seedlings raised in poly bags. Windbreaks are essential for establishment of upright plants and a variety of successful techniques have been developed. Side slopes of 6-8% on contoured coffee and slopes up and down the hill of up to 15% have been successfully harvested.

3.3. TREE SIZE AND CULTIVAR FOR MECHANICAL HARVESTING

Ometto (1987a, 1989) stated that for Brazil the ideal plant height is 2-3 m. Local experience is that plants up to 4 m tall can be successfully harvested, however, losses do occur because of the physical problem of crop accessibility and crowding of limbs in the shaker system. Limbs below shaker height cause problems with the catching mechanisms. Watson (1980) found more

Catuai was lost in the catching mechanism than Mundo Novo due to low branches stopping the fish plates on the catching frame from closing. Improvements in harvester design have helped to reduce this problem, but it still reduces yield in the first season especially on semi dwarf types.

In the Australian variety evaluations, coffee selections were divided into three groups i.e. dwarf e.g. San Ramon; semi-dwarf e.g. Catuai; and tall e.g. Mundo Novo. Under hot humid conditions the tall quickly became too tall for effective machine harvest, thus necessitating some form of pruning. Initial harvest of the semi dwarfs proved difficult as much of the crop was borne on branches too low for the harvester. Dwarfs are too small for effective mechanical harvesting.

Internode lengths are reduced and berries held in increasingly tighter clusters as plant type changes from tall to dwarf. Semi dwarf types have thus proved slightly harder to harvest, although improved yield with these types has helped override this problem. Watson (1980) reported the semi dwarf Catuai cultivar to be slightly more difficult to harvest than the taller Mundo Novo. Typical recoveries from first year harvest of tall selections are >80% versus <50% for semi dwarf types. Use of shakers with additional fingers has increased harvesting efficiency on the semi dwarf types (Norris, unpublished data). Harvester ground losses have been about 10% for both tall and semi dwarf types (Norris & Winston, in press).

3.4. NUTRITION, IRRIGATION, AND WEED CONTROL FOR MECHANICAL HARVESTING

Maintenance of a high yield is essential for machine harvesting to be economically successful because of the reduced recovery of prime coffee compared with hand harvesting. Trials have found that high rates and monthly applications of N (400 kg/ha/year on mature coffee) and K (400 kg/ha/year) are needed for maximum yield (Winston *et al.*, 1992a). Extra nitrogen in mid-season has help reduce leaf loss at time of machine harvest (Winston and Young, in press).

All major commercial plantations in North Queensland are irrigated, with lateral move gantry systems, fixed overhead sprinklers, and undertree drip line all being used. Generally 25-50 mm water are applied weekly except in the late winter/spring period when plants are water stressed for flower manipulation. All irrigation systems have proved effective in initiating flowering after a period of moisture stress. Fertiliser is generally applied via the irrigation system.

Weed control initially proved a major problem to growers. Oxyfluorfen/oryzalin mixtures applied as pre-emergents have since proved very effective. Paraquat and glyphosate have been used by most growers although instances of severe crop damage with paraquat have occurred. Most growers maintain a mowed grass or weed cover strip between coffee rows as the soil is highly erodable. The dwarf non-climbing pinto peanut (*Arachis pintoii*) which requires little mowing, is tolerant of normal rates of glyphosate, and suppresses most weeds, is showing promise as a cover crop.

All coffee is grown full sun as shade trees are considered impractical in a hedgerow plantation designed for machine harvesting. Mulching would offer significant benefits to growers but it is not used due to cost.

3.5. MATURITY MANIPULATION FOR MACHINE HARVESTING

Growers selected the dry area of north Queensland to obtain a once-over harvest from a single flowering following heavy irrigation after a winter/spring water stress period. Despite considerable success in synchronising flowering, particularly with young trees, this technique does not necessarily lead to synchronised maturity. Drinnan (1993) found that in North Queensland a variation of 8 weeks in maturity of cherries from one flowering is typical and that late and early flowering cultivars need to be stressed at different times to optimise flower synchronisation. In cooler humid climates which appear best for maximum yield, flowering synchronisation is more difficult due to a less pronounced dry season, but with appropriate irrigation scheduling a significant concentration of flowering can be achieved.

Compounding the problem of maturity variation is the "life" of a coffee cherry, which is highly dependent on environmental conditions. The progression of cherries from just mature to either over-mature or fruit drop may take as little as 10 days under humid hot conditions leading to poor recovery with machine harvesting. Under cool dry conditions cherry life can be in excess of 10 weeks, allowing immature fruit the opportunity to "catch up" with mature fruit (Drinnan, 1993), thus significantly enhancing machine harvested recoveries (Norris & Christensen, 1992). Because of this, early maturing cultivars such as Catimor have not proven acceptable in climates with a wet summer/autumn period. Late maturing lines such as Catuai and Mundo Novo which mature at a cooler, drier time of year are favoured. Drinnan's work has made a major advance in reducing the spread of maturity which occurs if no attempt is made to synchronise flowering. Most commercial plantations now water stress their trees in the late winter/spring period to help concentrate flowering.

Ethylene has been trialled in an attempt to concentrate berry maturity, however, variable results with leaf defoliation have so far precluded its use (Winston *et al.*, 1992b).

Advancements in harvesting technology and improved processing separation have reduced the need for a single pass harvest. Measurements have shown that fruit ripen from the top of the tree downwards (Norris & Christensen, 1992). This led to the development of a layer harvesting technique, i.e. harvesting different heights of the plant at different times to concentrate recovery of ripe fruit.

4. PERFORMANCE OF MACHINE HARVESTERS

4.1. EARLY DEVELOPMENTS

Although the first harvesters were developed during the 1970s very limited data is actually available on mechanical harvesting. In Brazil, most coffee is harvested in a one-pass harvesting regime. Ometto (1987a,b) stated that large straddle machines can replace 60-80

men and have 80-85% efficiency early in the season (cherry stage) and 95-100% late in the season (mbuni stage). Watson (1980) stated that the shaker mechanism at operating speeds of 1.2 to 3.0 km/hr, removed 95% of coffee at all stages of maturity.

For the production of wet processed coffee, as in Australia, high levels of fruit removal are desirable, as is a high degree of selectivity in removing only ripe and tree dried berries. Watson (1980), reporting Brazilian research stated "that the shaker mechanism was selective, and that by adjusting the cpm (frequency) of the oscillations green fruit could be left on the bushes while ripe fruit were shaken off." He further reported the Cataui cultivar to be slightly more difficult to harvest than Mundo Novo.

As part of our research program, data were collected on the harvesters operating in Australia, viz FMC-COCO, NQEA and Skyberry machines. A number of techniques were developed to accurately assess the performance of a harvester in any particular condition and to define selectivity, fruit removal efficiency, leaf removal, and to determine the major sources of fruit loss.

Initial field observations, supported by our research data, indicated that the degree of selectivity being achieved was disappointing, with removal of available prime cherry often being as low as 30%, and with samples typically containing high proportions of immature cherry. This was consistent with the earlier work of Wang & Shellenberg (1967); Cannell, *et al.* (1970) on limb shakers. Even when higher levels of shaker energy were applied in "one-pass" harvesting operation, unless the overall maturity of the fruit was well advanced (i.e. the cherry predominantly "overripe"), cherry removal was poor.

The harvesting speed was also disappointing. Field observations of the FMC machine operating in 1.5-1.8 m high Cataui coffee (carrying predominantly tree dried and "purple" cherry) at an operating speed of 0.4 km/hr was that ripe fruit (red & purple) removal was less than 70%. Under similar conditions and at an operating speed of 0.8 km/hr, the more aggressive shaker system of the NQEA harvester achieved higher levels of fruit removal but still well below the 90% ripe fruit removal reported by Ometto (1987b). No harvesting management regime monitored during the 1989 harvest consistently achieved harvested samples with over 50% prime cherry.

Initially we expected that significant improvements in machine performance could be achieved by the optimisation of frequency, amplitude and forward speed relationships of current shaker systems, as indicated by Watson (1980). Consequently a "skeleton harvester", incorporating shakers of Brazilian design was developed by QDPI. Results of initial trials with this machine were consistent with the observed performance of the commercial harvesters. Further trials indicated that manipulation of frequency, amplitude and forward speed of the standard shaker system (within practical limits) achieved no changes in shaker performance of a magnitude which indicated fundamental changes in the dynamics of fruit removal were occurring. A more radical approach than simply optimising the operating parameters of the current shakers was clearly necessary and the flexibility afforded by the design of the skeleton harvester allowed a number of radical approaches to be trialled.

Observations were also made of two harvesters operating at the McBryde plantation in Hawaii, a LITTAU berry harvester and the McBryde Quad-shaker unit. Whilst performance of the berry harvester was similar to that of the coffee harvesters in Australia, the Quad-shaker indicated that considerable advances in selectivity and cherry removal were possible (Norris and Peasley, 1989).

4.2. FRUIT REMOVAL FORCE

Fruit Removal Force (FRF) is defined as the force required to remove a cherry from the lateral by simple tension applied along the axis of the cherry and is an important characteristic for evaluating the suitability of a cultivar for mechanical harvesting (Bukovac, 1979). Wang (1965) observed that FRF for coffee is approximately 3.7 times greater than that for tart cherries, thus coffee is significantly harder to remove mechanically.

As coffee cherries progress from green (immature), to red (mature) to over-mature (soft brown to black) they are progressively easier to remove (Wang, 1965; Cannell, *et al.*, 1970; Watson, 1980; Norris & Christensen, 1992). A ten point scale for defining the maturity of cherries was developed by Norris & Christensen (1992). FRF measurements were conducted

on 60 varieties at Walkamin Research Station, and on selected varieties in a wide range of differing environmental conditions e.g. (Figure 1). Large differences in FRF of immature and mature cherries are evident both between varieties and between locations (Figure 1). Crisosto & Nagao (1991) also found large differences in FRF for different varieties in Hawaii.

Significant differences in FRF characteristics have also been measured between top and bottom sections of the bush (Norris, unpublished data). Wang (1965) found in Hawaii that fruit was easier to remove following rain, which is confirmed by local experience which has shown irrigation one to two days before harvest improves ease of fruit removal.

Cannell *et al.* (1970) used ethephon at 800 and 1600 ppm in a unsuccessful effort to loosen berries. Crisosto *et al.*, 1990 found 100 ppm ethephon reduced fruit removal force of red fruit by 25% and increased selectivity of mechanical harvesting by almost 20% under Hawaiian conditions. In a later report Crisosto, (1992) found 100 ppm ethephon reduced FRF by 30-50% and increased selectivity by 15%. Locally the use of ethephon has given variable results with leaf defoliation and this has so far precluded its use (Winston *et al.*, 1992b).

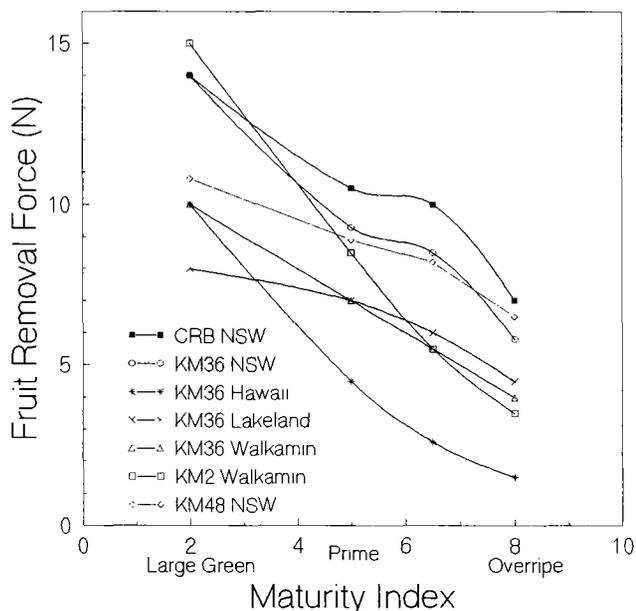


Figure 1: Effect of variety, location & stage of maturity on Fruit Removal Force of coffee cherry.

The effect of environmental conditions on FRF warrants further investigation. The choice of varieties with suitable FRF characteristics for machine harvesting and the manipulation of FRF by management, chemical means or plant breeding is obviously a major area for significant potential gain.

5. MACHINE DEVELOPMENT: A SUMMARY OF THE CURRENT STATUS

Poor fruit removal, poor selectivity, low work-rate and tree damage by available harvesters when harvesting cherry suitable for wet processing were obvious impediments to the development of a viable mechanised coffee industry in Australia. Research was undertaken to improve machine performance under local conditions.

High speed cine and accelerometers interrogated by a high speed data-logger were two techniques used to develop an enhanced appreciation of the dynamics of the shaker systems interacting in the bush structure. A new shaker system was designed incorporating larger diameter shakers with parallel inclined axes and operating in phase and incorporating a system to control the vibration transfer into the bush. A radically different chassis, based on the three-wheel berry harvester concept (for improved manoeuvrability, lighter weight and lower cost), was designed to carry the new shakers.

Comparative performance trials of this harvester (DPI-SP) were conducted against the skeleton harvester (representative of the commercially available machines) and a LITTAU berry harvester. These trials confirmed that significant improvements in performance had been achieved with the new shaker design in terms of operating speed, ripe fruit removal, selectivity and tree damage (leaf removal).

Performance comparisons between harvesters by direct comparative field trials are often not possible. However comparison of harvester performance in similar varieties, carrying similar fruit loads can give some indication of performance. Trial regimes incorporating "tagged laterals" in conjunction with Fruit Removal Force data were used to critically evaluate actual machine performance.

Figure 2 gives information on the performance of a number of harvesters, operating in "semi-dwarf" 1.5-1.8 m tall coffee carrying a total yield of 1,500-1,800 kg/ha of green bean. Cherry composition at all sites was approximately 50% immature fruit, 30% prime and 20% overripe. The variety in Hawaii was Cataui Rojo, for the Littau and McBryde Quad trials, and Catimor at Lakeland Downs (Littau and DPI-SP). Significant effects are:

- * An inverse relationship exists between fruit removal force and fruit removal. The selectivity of the harvesters can be equated to the slope of the lines on the graph. Greater slope implies greater selectivity.
- * More advanced harvesters, eg. McBryde Quad Shaker and the DPI-SP display greater selectivity at higher levels of fruit removal than other machines.
- * Whilst on some shaker systems, manipulating operating conditions changes the

selectivity (eg. DPI-SP), on other machines eg. the LITTAU, a variation in total fruit removal is the predominant result.

- * The difference between fruit removal force for immature and ripe fruit is a significant dictator of the degree of selectivity actually achieved. Harvesters with a high inherent selectivity will give a better result, under conditions where there is a large difference in FRF, than will less selective harvesters.

Major differences are evident in the selectivity and fruit removal efficiency of different harvesters. In general terms, the data indicates that the DPI-SP harvester approaches the performance of the McBryde Quad in terms of fruit removal and selectivity. From a practical viewpoint it achieves this within the constraints of a far simpler machine, with advantages of cost, manoeuvrability and ease of use.

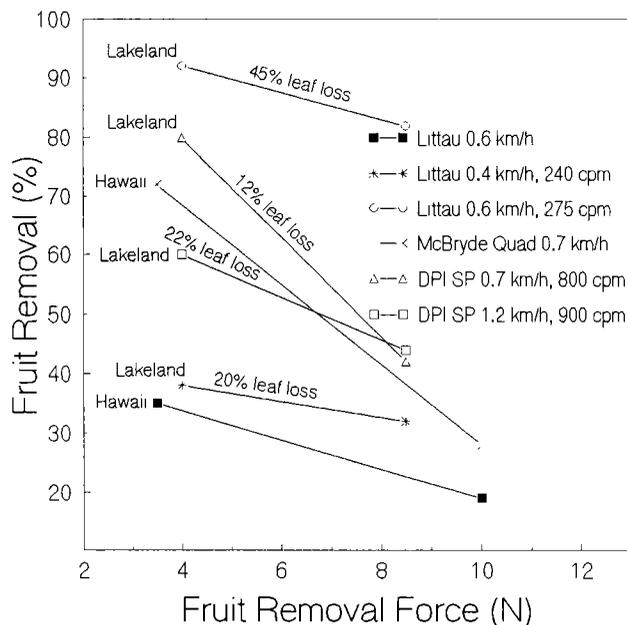


Figure 2: Coffee harvester selectivity, fruit removal versus Fruit Removal Force, semi-dwarf varieties.

The importance of finding ways to manipulate fruit removal force to enhance the selectivity of more advanced harvesters is well demonstrated by this data.

6. DEVELOPING OPTIMUM HARVEST MANAGEMENT TECHNIQUES

Two harvesting strategies have been used by Australian growers, either a "one-pass" harvest when the maturity of the crop is well advanced (to reduce the proportion immature cherry in the sample) or two or more harvester passes to maximise total yield. The approach selected is determined by availability and performance of harvesters, the processing facilities available and the commitment of the grower to the production of quality coffee. Experience with berry harvesters in both Australia and Hawaii has been that up to 5 passes have been necessary to remove the majority of the crop.

Measurements had indicated cherries in the top sections of the bush typically ripen before the lower sections (Norris & Christensen, 1992). This led to the development of a "layer harvesting" technique where the top, and the top & middle and finally the middle and bottom of the bush are harvested.

Figure 3 presents data on the yield recovered from layer harvesting using the DPI-SP harvester versus hand-picking from one variety, Mecca at Walkamin. Recovery of prime cherry for machine harvesting was in excess of 70% of the hand-picked recovery. For all five

varieties in the trial the total prime cherry recovery was in excess of 64% of that achieved from hand-picked plots, and the total recovery of all grades was 87% of that for hand-picking. Excellent flowering synchronisation indicated a maturity peak in late June.

7. LONG TERM EFFECTS OF MACHINE HARVESTING ON YIELD.

Correctly adjusted and driven by a semi-skilled operator, harvesters cause very little tree damage compared with hand harvest where tops are often pulled over and broken to access fruit. The major visual effect after machine harvesting is a degree of leaf removal, determined primarily by machine aggressiveness, plant health and variety. Older leaves are removed more readily than younger ones while semi-dwarf lines appear to have better leaf retention than tall selections and appear to recover more quickly from any leaf loss. The application of extra nitrogen mid season has improved leaf retention on machine harvested plants (Winston & Young *in press*).

Partial ringbarking of uprights can occur where finger contact occurs. No long term negative effect has been observed; however, in areas where fungal/bacterial diseases are prevalent this could present a point of entry. Flower buds in the candle stage are easily removed and harvesting should not occur at this stage.

Long term effects of mechanical harvesting on yields as affected by leaf/bud removal or other unknown factors will be investigated in a long term yield trial. Initial data indicates that some depression of yield is evident with machine harvesting. Layer harvesting reduces the number of passes per tree section and hence may reduce potential long term damage.

8. PROCESSING MACHINE HARVESTED COFFEE

Even with good maturity synchronisation and selective harvesting, immature, mature and over-mature coffee will be present in varying proportions in the feed-stock. One harvester now has the potential to harvest up to 7 tonnes of cherry per hour and hand separation is not feasible. Likewise the volume prevents the economic use of electronic colour sorters (Lemin & Norris, 1992). Conventional processing systems initially installed by growers did not adequately segregate immature cherry from prime cherry, often resulting in a poor quality product.

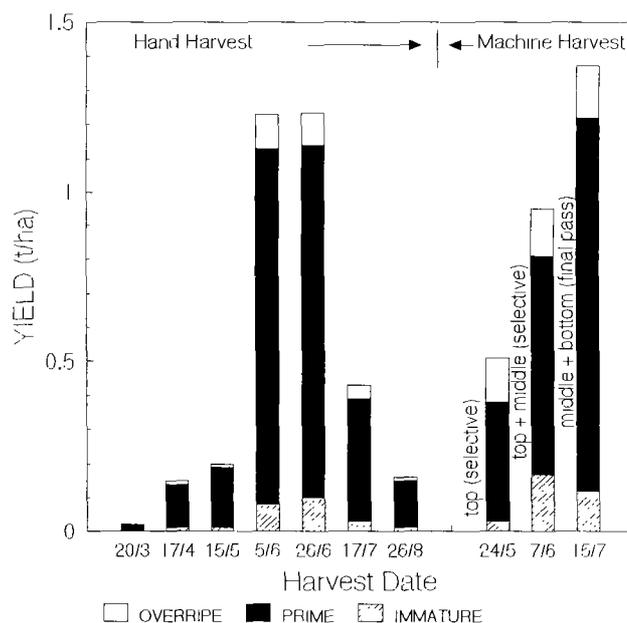


Figure 3 Hand harvesting and machine (layer) harvesting yield recovery, CV Mecca, Walkamin R.S.

Australian research has developed a system to effectively process mixed feed-stock and thus maximise the value of the final product. The system developed is a radical departure from previous systems and incorporates a selective pulping element with a different mode of action from existing pulpers. Success of the system is such that the taste of mechanically harvested coffee has been shown to be indistinguishable from hand-picked coffee (Lemin & Norris, 1992).

9. CONCLUSIONS

The Australian Coffee Research Program addressing a wide range of issues needed to develop a mechanised coffee industry has:

- . Shown Arabica coffee to be more suited than robusta for machine harvest.
- . Classified cultivars as early, mid or late season in maturity and as tall, semi-dwarf or dwarf. The most suitable cultivars and environments have been identified. Choice of cultivar choice must match the environment.
- . Determined plant spacings, nutrition, irrigation, weed control and training needed to obtain hedgerows of high yielding coffee.
- . Made major advances in compressing cherry maturity using water stress techniques to obtain flower synchronisation with minimal adverse impact on the plant. Despite uniform flowering an 8 week or more spread in maturity can result as coffee bushes ripen from the top downwards. This enables layer harvesting as a way of concentrating percentage ripe fruit harvested. Environment has a major impact on cherry life i.e. how long cherries remain in prime condition on the plant (1.5 - 10 week variation).
- . Found that a large differential Fruit Removal Force between green and red cherries is important for harvester selectivity. Fruit Removal Force varies with cherry maturity and irrigation prior to harvest improves harvestability.
- . Shown that for effective/economical machine harvesting it is important to manage for maximum yield as harvesting costs are similar for high and low yielding coffee.
- . Developed and commercialised a new, speedier and more manoeuvrable harvester with an improved shaking mechanism, greater selectivity and increased fruit removal, but with less leaf removal than previous machines.
- . Shown that >70% of prime red cherry and >90% of total coffee compared with hand picking can be recovered under ideal conditions/management, demonstrating that machine harvest is potentially cheaper than hand harvesting.
- . Suggested that the integration of hand-picking early in the season, followed by machine harvest at the peak of the season can offer advantages to more traditional coffee countries. This approach offers the ability to manage, but not displace labour whilst minimising costs.

- . Developed equipment including a new type of pulper to handle the mixed samples of immature, mature and over-mature cherry resulting from machine harvest, a mixture which conventional equipment has difficulty handling.
- . Shown Australia to be the leader in technology for mechanised coffee

Future

Further agronomic developments, such as manipulation of fruit removal force, coupled with inevitable developments in harvester design and breeding of cultivars specifically for machine harvest will further increase the competitiveness/attractiveness of machine harvesting systems, even in countries with low labour costs. It can confidently be predicted that coffee will be the next major crop to undergo widespread mechanisation.

10. ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank our coffee co-workers at Walkamin - James Drinnan, Craig Lemin, Pat O'Farrell, Kylie Young, Trevor Christensen, and Bob Thomson for their assistance in the coffee program. The Australian Rural Industries and Development Corporation and the Queensland Department of Primary Industries are gratefully acknowledged, for without their financial assistance the project would not have been possible. A special appreciation to Pierre Charmetant (IRRC/CIRAD) based in Papua New Guinea for encouraging us to write the paper and for kindly presenting this report at the Colloquium.

11. REFERENCES

- Bukovac, M.J. (1979). Machine-harvest of sweet cherries: Effect of ethephon on fruit removal and quality of processed fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 104:289-94.
- Cannell, M.G.R., Browning, G., and Turk, A. (1970). Towards more efficient and cheaper coffee harvesting. *Kenya Coffee* 35:25-7.
- Crisosto, C.H., Grantz, D.A., Osgood, R.V., and Luza, J. (1990). Effect of ethephon application on the fruit removal force and abscission zone formation of *Coffea arabica* L. varieties. *Proceeding Plant Growth Regulator Society of America*, 17th annual meeting, p 27-35.
- Crisosto, C.H., Nagao, M.A. (1991). Evaluation of fruit removal force of coffee cultivars. *HortScience* 26(2):210.
- Crisosto, C.H., Grantz, D.A., Osgood, R.V., and Cid, L.R. (1992). Synchronisation of fruit ripening in coffee with low concentrations of ethephon. *Postharvest Biology and Technology* 1(4):371-8.

- Drinnan, J. (1993). The control of floral development in coffee (*Coffea arabica* L.). PhD thesis. University of Queensland, St. Lucia, Queensland.
- Hosegood, G.J., Barnwell, P.J., Campbell, T., and Winston, E.C. (1988). Profitability of investment in arabica coffee production in far north Queensland. Queensland Department of Primary Industries Information Series Q188003.
- Lemin, C.D. and Norris, C.P. (1992). Coffee development of appropriate technology for processing of machine harvested arabica. Conference on Engineering in Agriculture. Albury, N.S.W. Australia. p333-7.
- Monroe, G.E. and Wang, J., (1968). Systems for mechanically harvesting coffee. Transactions of the American Society Agricultural Engineers 11(2):270-8.
- Norris, C.P. and Christensen, T.R. (1992). Mechanical harvesting of arabica coffee - an overview of recent developments. Conference on Engineering in Agriculture. Albury, N.S.W., Australia. p 305-9
- Norris, C.P., Peasley, D. (1989). Report on a short-term assignment: Mechanical harvesting and Processing in Hawaii. Queensland Department Primary Industries Report pp14.
- Norris, C.P., Winston, E.C. (in press). Pruning systems for machine harvesting of arabica coffee (*Coffea arabica* L.).
- Ometto, D.A., (1987a). Brazilian coffee harvester. Proceedings international symposium on agricultural mechanisation and international cooperation in high technology era. University of Tokyo. p 439-445.
- Ometto, D.A., (1987b). A new Brazilian coffee harvester. In Simposio internazionale sulla meccanizzazione agricola. Ricerche e divulgazione per l'innovazione nel sistema agroindustriale del 2000. Bologna, Italy. Alma Mater Studiorum Saecularia, Nona 55-8.
- Ometto, D.A., (1989). Development of new equipment for coffee harvesting. In Land and Water Use. Eds. Dodd & Grace. Balkema, Rotterdam. p1967-9.
- Wang, J.K. (1965). Mechanical coffee harvesting (Part A & B). Transactions of American Society Agricultural Engineers. 8(3):400-5.
- Wang, J.K. and Shellenberg, F.A. (1967), Effect of cumulative damage due to stress cycles on selective harvesting of coffee. Transactions of the American Society of Agricultural Engineers, 10, 252-5.
- Watson, A.G. (1980). The mechanisation of coffee production. 9th International Colloquium on the Chemistry of Coffee, Paris. p 681-6.
- Winston, E.C., Hoult, M., and Shepherd, R.K. (1992b). Ethylene-induced fruit ripening in arabica coffee (*Coffea arabica* L.). Australian Journal of Experimental Agriculture 32:401-8.

- Winston, E.C., Littlemore, J., Scudamore-Smith, P., O'Farrell, P.J., Wiffen, D., and Doogan, V.J. (1992a). Effect of nitrogen and potassium on growth and yield of coffee (*Coffea arabica* L.) in tropical Queensland. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 32:217-24.
- Winston, E.C. and O'Farrell, P.J. (1993a in press). Coffee in north Queensland. Adaptability, growth and problems. Queensland Department Primary Industries Monograph Series.
- Winston, E.C. and O'Farrell, P.J. (1993b). Coffee in north Queensland. Yield. Queensland Department of Primary Industries Monograph Series Q093013.
- Winston, E.C., Thomson, R. (in press). Coffee in north Queensland. Bean size. Queensland Department of Primary Industries Monograph Series.
- Winston, E.C., Young, K. (in press). Yield and leaf nutrient levels as effected by discrete dosages of nitrogen applied at various times in the growth cycle of arabica coffee (*Coffea arabica* L.). Queensland Department of Primary Industries Monograph Series.
- Winston, T. (1987). Arabica coffee: A newly revived industry in Queensland. *Australian Horticulture (Produce and Process Crop)* 1(1):10-16.

ABSTRACT

After a gap of 60 years, an Arabica coffee industry has been re-established in Australia. The industry is based on a high degree of mechanisation at all stages of production to compensate for high labour costs. Although the modern industry was pioneered by growers, a significant Government funded R&D effort has had a major impact in the development of efficient mechanised production systems for coffee.

Varieties and agronomic techniques to give high recoverable yield with machine harvesting, in a range of environments have been developed. Methods to concentrate berry maturity for machine harvesting have been refined.

Developments in machine harvesting have included the development of a second generation coffee harvester, and harvest management systems which maximise yields of prime cherry from machine harvesting.

Innovative wet processing technology has been developed to allow the production of a consistent, high quality line of coffee from machine harvested feed-stock, whilst maximising the value of "off grades" (immature and over-mature).

For successful development of a mechanical industry a combination of site selection and management to achieve high yields, flower and crop maturity synchronisation, improved harvester selectivity and equipment to handle machine harvested coffee are all important. No one component is the complete answer in itself.

Aspects of technology developed would have application to traditional producers coping with increasing labour costs.