

ASIC

**Association Scientifique
Internationale du Café**

9ème

**COLLOQUE SCIENTIFIQUE
INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ**

9th

**INTERNATIONAL SCIENTIFIC
COLLOQUIUM ON COFFEE**

9.

**INTERNATIONALES
WISSENSCHAFTLICHES
KOLLOQUIUM ÜBER KAFFEE**

9º

**COLÓQUIO CIENTÍFICO
INTERNACIONAL SOBRE
EL CAFÉ**

Volume II

Londres 16-20 juin 1980

NEUVIÈME COLLOQUE SCIENTIFIQUE INTERNATIONAL SUR LE CAFÉ

Londres 16-20 juin 1980

Volume II

- The effect of hot and cold drinks on skin surface temperature distribution, R. P. Clark 405
- Effects of caffeine on anterior pituitary and thyroid function in the rat, E. Spindel, M. Arnold, B. Cusack, R. J. Wurtman .. 413
- Is there an anti-thiamine effect of coffee ?, R. Stalder 427
- Coffee, gastro-intestinal hormones and oesophageal function, H. P. Wurzner 433
- Documentation-information**
- Recent developments in the science and technology of coffee, R. F. Smith 443
- International coffee standardisation and legislation, R. J. Clarke 467
- Agronomie**
- Les grandes lignées de caféiers, J.-F. Leroy 473
- Quelques données palynologiques sur le genre *Coffea* et autres genres du cercle des caféiers, D. Lobreau-Callen, J.-F. Leroy 479
- Conservation of the genetic resources of the genus *Coffea*, A. Charrier 507
- L'incompatibilité chez *Coffea canephora* : Méthode de test et déterminisme génétique, J. Berthaud 517
- Analyse en électrophorèse du polymorphisme biochimique des caféiers : Variation enzymatique dans dix-huit populations sauvages. Variation de l'ADN mitochondrial dans les espèces *C. canephora*, *C. eugenioides* et *C. arabica*, F. Berthou, P. Trouslot, S. Hamon, F. Vedel, F. Quetier 527
- The inheritance of CBD resistance in Arabica coffee, H. A. M. Van der Vossen, D. J. Walyaro 543
- Observations, avant mise en culture, des divisions anormales des noyaux de grains de pollen de caféier induits au froid. Influence du stade de développement lors de l'induction, C. Lanaud, J.-P. Parvais . 547
- Hybrides interspécifiques entre *Coffea canephora* Pierre et *C. liberica* Bull. ex Hiern. Résultats préliminaires sur les hybrides F₁, J. Louarn 555
- Les hybrides interspécifiques hexaploïdes *Coffea arabica* × *C. canephora* : influence du milieu et de la structure génétique sur les potentialités agronomiques, D. Le Pierres, F. Anthony 563
- Multiplication végétative *in vitro* de l'Arabusta, P. Dublin 571
- Clonal propagation of *Coffea arabica* L. by nodal culture, J. B. M. Custers 589
- The synchronised mass propagation of *Coffea canephora in vitro*, G. Staritsky, G. A. M. Van Hasselt 597
- Critères de sélection pour l'amélioration des hybrides Arabusta en Côte d'Ivoire, P. Duceau 603
- High production of caffeine by sterile tissue cultures on *Coffea arabica*, G. R. Waller, C. F. Cumberland 611
- Allelopathic constituents of *Coffea arabica* : caffeine, dimethylxanthines and plant phenolics, G. R. Waller, C. H. Chou 619
- Cell-free metabolism of caffeine in *Coffea arabica*, G. R. Waller, T. Suzuki, M. F. Roberts 627
- Influence des engrais sur l'architecture et la croissance du caféier Robusta, J. Snoeck, Ph. de Reffye 637
- Genetic improvement of coffee. Transfer of factors for resistance to *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. into high yielding cultivars of *Coffea arabica* L., A. J. Bettencourt, J. Lopes, I. L. Godinho 647
- Chemical induced mutation of race I of *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. into race XXIV, M. F. I. Neves Carneiro 659
- Resistance to *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. of some Mozambicoffea coffee species, C. J. Rodrigues Jr 663
- Tonic effect of fungicides on arabica coffee in Kenya, H. A. M. Van der Vossen 667

- Relationship between genetics and chemistry in the system *Coffea* spp./*Hemileia vastatrix*, S. Sievers, E. Ablanque, E. Bautista, F. Chaparro *et al.* 671
- The mechanization of coffee production, A. G. Watson 681

Exposés présentés, non reçus pour publication

- Retención de aroma durante el secado por convección de sistemas ternarios modelo, C. M. Bonilla Vidales, E. A. Plett, M. Loncin
- Behavioural effects of caffeine, R. Vertua
- Physiological aspects of constituents of coffee other than caffeine, Ch. Schlatter
- Coffee breeding in Brazil, M. Sondahl
- Immunity on the coffee-orange rust association. Histopathological aspects, L. Rijo, C. J. Rodrigues Jr, M. I. Vasconcelos

Exposés non présentés, reçus pour publication

- Estudio por ESR de la extracción de café a altas temperaturas, J. Diaz S., P. Ruiz O. 687
- Production de gaz méthane par digestion anaérobie de la pulpe de café, M. Jacquet, J.-C. Vincent, L. Cayla, S. Elmaleh, L. Gbahoue, J. Hahn 693

- Biotechnology in green coffee processing, C. Rolz 709
- Sur le comportement méiotique des dihaploïdes de *Coffea arabica* L., P. Kammacher 717
- Características de la variedad Erecta-Cenicafé, nueva variedad de *C. arabica*, F. J. Orozco-Castaño 725
- Selección de cruzamientos derivados del híbrido de Timor en la obtención de variedades mejoradas de café para Colombia, J. Castillo-Zapata, G. Moreno-Ruiz 731
- Expresión de resistencia horizontal a la roya (*Hemileia vastatrix* Berk. y Br.) en *Coffea canephora* variedad conilón, G. Cadena-Gómez, P. Buriticá-Céspedes 747
- Comparative survival of the coffee-berry borer, *Hypothenemus (Stephanoderes) hampei* (Ferr) under two macrohabitats of *Coffea canephora* in Southern Nigeria, O. L. Idowu 759
- Comparative efficiency of four spraying pumps in delivering copper fungicide on coffee leaf surface, G. A. Filani 767

Rapports de synthèse 775

Résumés/Summaries 779

THE EFFECT OF HOT AND COLD DRINKS ON SKIN SURFACE TEMPERATURE DISTRIBUTION



R. P. CLARK

Laboratory for aerobiology, clinical research centre, Harrow, England

Introduction

In a study of skin temperature distribution it was observed that skin temperature changes occurred after drinking hot tea. This was in contrast to the effect of cold drinks which produced only local cooling of the lips and neck (Clark, Goff, and Mullan 1977).

The skin temperatures were visualised by infra-red thermography. This is a non-invasive technique in which a special camera senses the infra-red radiation from the skin surface and produces a television image where shades of grey represent particular skin temperatures. A refinement of the technique is to have a coloured TV picture where particular temperatures are represented by specific colours. The infra-red thermograms can be formed at a rate which permits cine films of changing temperature patterns over the whole body surface to be made.

In the present study the original work was extended to investigate the effects on skin temperatures of hot and cold coffee, decaffeinated coffee and water.

Materials and Methods

Environment

Experiments were conducted in December 1977 and were carried out indoors in warm conditions. The earlier work had shown that skin temperature changes could be observed both in the presence of solar radiation and in the shade. In the present studies the environmental temperature was maintained by seven kilowatts of radiation provided by photographic floodlights distributed around the subject.

The dry bulb air temperature during the experiments was maintained at 26°C and the radiant temperature, measured with a black globe thermometer, was 32°C.

Subject

One male subject was used throughout the tests, he was 30 years old and was the same subject as in the original experiment with tea. The subject remained seated throughout the experimental period and thirty minutes would elapse with the floodlights turned on before a drink was taken. During this time the skin was observed with the thermograph to ensure that the subject was in a 'steady' thermal state with the skin temperature remaining stable.

Thermography

An AGA Model 680 Thermovision with a colour monitor was used and operated at a sensitivity of 0.5°C between adjacent colours. A cine camera attached to the TV monitor recorded the colour thermograms on Eastman Colour Negative at 8 fps. The infra-red camera was 'tilted' so as to record the temperatures over the whole of the front of the subject whilst he was seated. Thermograms were recorded before drinking, during and at three minute intervals after drinking for the time that temperature changes occurred.

'Still' pictures were abstracted from the cine film using an Illumitran copier to produce 2 $\frac{1}{4}$ inch square transparencies for subsequent analysis and presentation.

The preparation of drinks

The effects of coffee, decaffeinated coffee, and water were investigated both hot and cold. The cold drinks were made up to a volume of 300 ml. They were taken within 2 $\frac{1}{2}$ -3 minutes at a fluid temperature of around 4°C. The coffee drinks were prepared, without sugar, with 5 g of instant coffee in 300 ml of water. In the hot water test the volume of water was also 300 ml. The hot drinks were all taken within 2 $\frac{1}{2}$ -3 minutes with the fluid temperature between 60-63°C.

The ordinary and decaffeinated instant coffees contained 3.69% and 0.07% caffeine respectively.

The experiments were performed over a period of four days and two tests were made with each drink (twelve tests in all).

Results

Hot instant coffee

During drinking hot instant coffee the subject began to sweat visibly and skin temperatures started to fall. Within 3 minutes temperatures were 1-2°C lower than before drinking; they remained at this level until sweating diminished and temperatures began to rise some ten minutes after taking the drink. Twenty four minutes after drinking the skin temperatures had risen to their pre-drinking values.

The temperature distribution over the face remained substantially the same during the observation except that during drinking, the hot vapour from the cup was found to warm the upper part of the face and hair.

Hot decaffeinated instant coffee

Sweating again began during drinking and temperatures started to fall immediately. The temperature fall was similar to that found after drinking ordinary coffee. The warming of the hair during drinking was again observed. Approximately fifteen minutes after taking the drink the trunk temperatures began to rise to approach their pre-drinking levels by about twenty-eight minutes after drinking.

Hot water

Similar changes were associated with drinking hot water. Sweating began during drinking and temperatures fell during the next ten minutes. After this time they rose to reach the pre-drinking levels after about seventeen minutes.

Cold drinks

The temperature changes associated with drinking cold, ordinary and decaffeinated coffee and cold water were found to be similar. These drinks all produced local cooling around the mouth and neck of up to 2°C (this lasted about 6-8 minutes) but no change was observed in body skin temperature.

Conclusion

The finding in the original work that hot tea initiated sweating and that skin temperatures would subsequently fall was confirmed in the present study for hot instant coffee, hot decaffeinated instant coffee and hot water. A drink of hot coffee seemed to have a greater cooling effect than hot water although more work would be required to establish any statistical significance in the observed difference.

Gustatory sweating similar to that observed in the present studies has been reported before (Fox et al., 1961; Fox and Hilton, 1958), in response to chewing chillies. It is possible that the present findings result from a response to the temperature of the hot fluid and not to a biochemical stimulus because the sweating and cooling was not observed when either water, coffee or decaffeinated coffee were drunk cold but only when the three drinks were taken hot.

The support of the Physiological Effects of Coffee (PEC) Committee in this work is gratefully acknowledged.

Figure 1 illustrates the temperature changes recorded with hot decaffeinated coffee. White areas are the warmest (36°C and above) and black the coolest with adjacent colours differing by 0.5°C .

Figure 2 is typical of the thermograms obtained with a cold drink. The only changes were the appearance of cold areas (black) around the mouth and neck.

REFERENCES

- Clark, R.P., Goff, M.R. and Mullan, B.J. (1977). *Journal of Physiology*, 267, 8-9P.
- Fox, R.H., Goldsmith, R. and Kidd, D.J. (1960). *Journal of Physiology*, 150, 22-23P.
- Fox, R.H. and Hilton, S.M. (1958). *Journal of Physiology*, 142, 219.

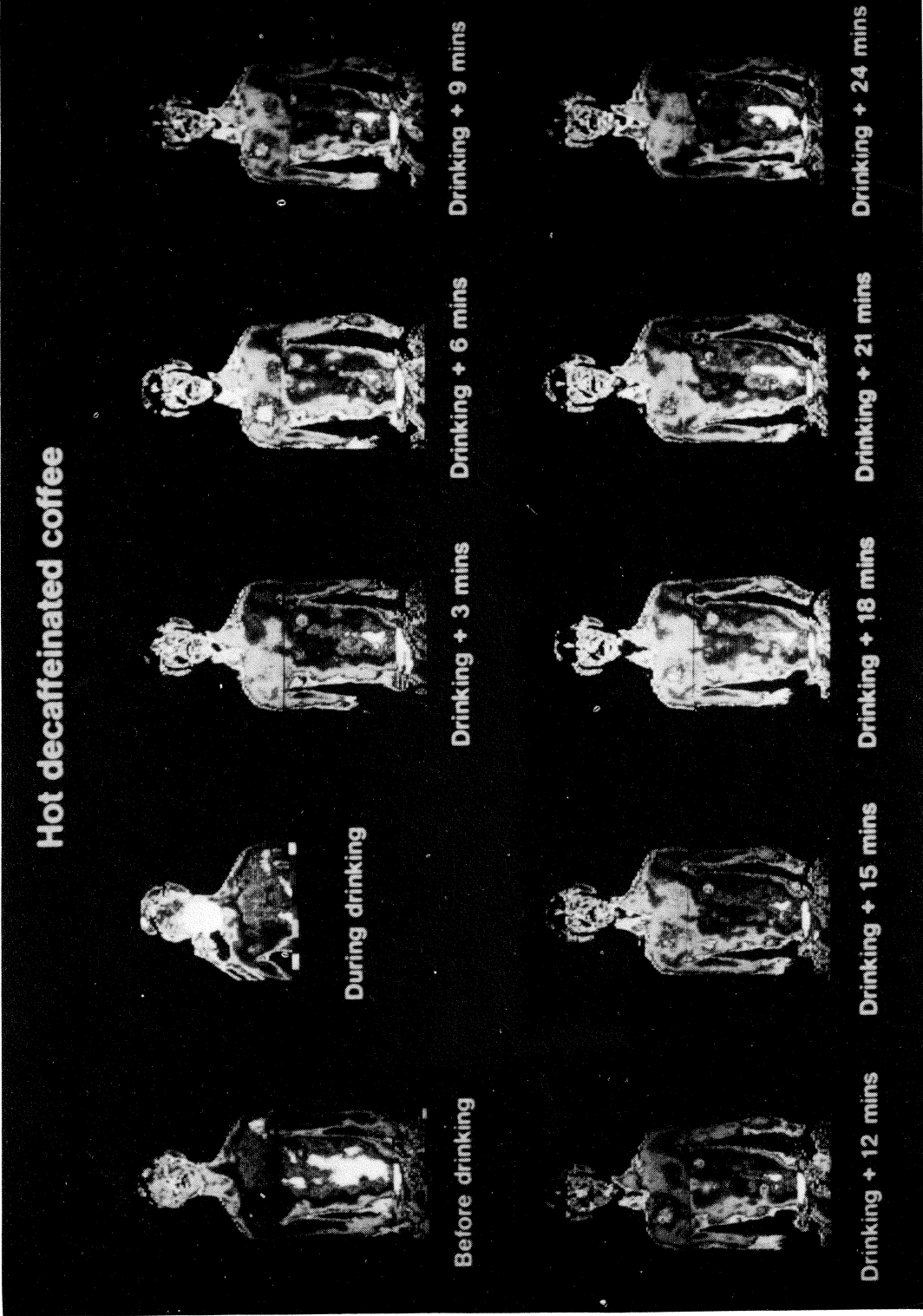


Figure 1



Figure 2

EFFECTS OF CAFFEINE ON ANTERIOR PITUITARY AND THYROID FUNCTION IN THE RAT*

E. SPINDEL, M. ARNOLD, B. CUSACK, R. J. WURTMAN

Laboratory of Neuroendocrine Regulation

Department of Nutrition and Food Science

Massachusetts Institute of Technology

Cambridge, Massachusetts 02139

Caffeine is probably the most commonly consumed neurally active compound, but its neuroendocrine effects have not, to our knowledge, been studied systematically. Caffeine is a phosphodiesterase inhibitor (Butcher and Sutherland, 1962) and a ligand for the adenosine receptor (Marangos *et al.*, 1979 ; Phillis and Kostopoulos, 1975 ; Sattin *et al.*, 1975). Thus, it could influence hormone secretion directly, by increasing glandular adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP), or indirectly, by affecting brain neurotransmitters and, subsequently, hypothalamic releasing factors. Two drugs that act as stimulants, amphetamine and cocaine, influence pituitary secretion of thyrotropin (TSH) (Spindel *et al.*, 1978) and prolactin (PRL) (Lu and Meites, 1971 ; Ravitz and Moore, 1977). Amphetamine's action is augmented by treatments that accelerate dopamine synthesis (Clemmens and Fuller, 1979), which suggests that the drug acts on pituitary hormones by releasing this brain catecholamine. Caffeine could also affect hormone release indirectly by altering blood pressure or heart rate (Robertson *et al.*, 1978) and thereby modifying sensory input to the brain. We describe here the effects of intraperitoneally administered caffeine on serum levels of growth hormone (GH), PRL, and TSH, three anterior pituitary hormones whose modulation by cAMP, brain neurotransmitters, hypothalamic releasing factors, and peripheral stress is well established.

METHODS

Animals. Blood samples were obtained from rats either by decapitation or chronic atrial cannulae. For decapitation studies, male Sprague-Dawley rats (150 - 200 g ; Charles River Breeding Laboratories, Wilmington, MA) were housed 6 per cage with light from 0700 hr to 1900 hr for 7 days before all experiments and were handled daily to minimize stress. Each cage contained rats from all experimental groups. Each group contained 6 - 8 rats. Drugs, dissolved or suspended in normal saline, were injected i.p. to all rats in a given cage within 3 min of injecting the first rat in the cage. The cage was left undisturbed until the time of sacrifice, at which

*First published in 1980 in Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.
Vol. 214, n° 1, p. 58-62.

time the cage was moved to another room and all rats were decapitated within 2.5 min. Blood was collected in 16 x 100 mm tubes and kept at 4°C for 12 to 20 hr before serum separation.

For other studies, rats' right atria were implanted chronically with silastic cannulae (Brown and Hedge, 1972; Tannenbaum and Martin, 1976). One week later, the rats were adapted for 2 days to individual isolation cages equipped with ventilation fans and internal lighting (0000 hr to 1200 hr). Each rat was its own control with at least 2 intervening days between experiments. In one experiment, either caffeine or saline was injected i.p. at 0945 hr. Blood samples were taken every 15 min for 4 hr beginning at 1030 hr. Samples were immediately centrifuged, plasma was frozen, and the red cells were resuspended in saline and returned to the rat. A second experiment was identical except that rats also received either 0.5 ml somatostatin anti-serum (SS AS) or normal rabbit serum (NRS) i.v. 60 min after caffeine or saline injection. Antibody titers in plasma samples taken 15 min, 2 hr, or 4 hr after SS AS were assessed by measuring their ability to bind ^{125}I -(tyrosine¹)-somatostatin under standard radioimmunoassay (RIA) conditions (Patel and Reichlin, 1978). Serum (100 μl , diluted 1:40) from rats treated with SS AS bound 70 % of the ^{125}I -somatostatin 15 min after injection, 60 % 2 hr after injection, and 40 % 4 hr after injection.

Xanthine assay. Caffeine, theophylline, and theobromine (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) in serum were measured by a modification of the high pressure liquid chromatography (HPLC) method of Adams *et al.* (1976). In brief, 50 μl rat serum and 50 μl internal standard solution (6-methylmercapto-purine riboside, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ water; Sigma Chemical Co) were added to 1 ml methylene chloride:isopropanol (9:1) in a 1.5-ml Eppendorf polypropylene vial (Scientific Products, McGaw Park, IL) and shaken for 10 min. The aqueous phase was aspirated and discarded, and the remaining contents in the vial were evaporated under vacuum with a Savant Instruments (Hicksville, NY) "Speed-Vac Concentrator". The residue was resuspended in 100 μl water and centrifuged for 15 min (Eppendorf centrifuge) to remove any particulate contamination and an appropriate volume injected into the HPLC. HPLC conditions were as follows: uBondapak C₁₈ column (3.9 mm x 30 cm; Waters Associates, Milford, MA), temperature = 40°C, mobile phase = 11 % acetonitrile (Burdick and Jackson, Muskegon, MI) in 0.01 N ammonium acetate (pH 4.5), flow rate = 2 ml/min. Theobromine eluted in 2.4 min, theophylline in 3.1 min, caffeine in 5.0 min, and the internal standard in 6.3 min. Overall recovery of caffeine was 70 - 80 %.

Radioimmunoassays. PRL, TSH, and GH were measured by double antibody RIA using materials and protocols furnished by the National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Disease Rat Pituitary Hormone Distribution Program. Reference standards used were PRL-RP-1, TSH-RP-1, and GH-RP-1. The TSH RIA was incubated for 2 days before ^{125}I -TSH was added and then 3 days more for maximal sensitivity. T₃ and T₄ were assayed by the method of Hollander and Shenkman (1974), except that a second antibody precipitation was used for the T₃ RIA and a polyethylene glycol precipitation (Desbuquois and Aurbach, 1976) used for the T₄ RIA. Cross-reaction of reverse-T₃ and T₃ in the T₄ RIA and of reverse-T₃ and T₄ in the T₃ RIA were all less than 0.1 %. Assays were calculated by the logistic method of Rodbard and Hutt (1974), using a program furnished by Wang Laboratories (Lowell, MA) for use on their PCS-II computer. All experiments were measured within a single assay to eliminate effects of interassay variation.

In vitro pituitary release of PRL and TSH. Rat hemi-pituitaries were incubated *in vitro* (Wilber and Seibel, 1973) to measure PRL and TSH release. Four hemi-pituitaries were incubated in each 10-ml glass beaker with 2 ml Medium 199 (Difco Laboratories, Detroit). The pituitaries were preincubated for 30 min, incubated with the test drug for 60 min, and then incubated with the drug and 500 pg thyrotropin-releasing hormone (TRH) for 60 min. This procedure allowed measurement of basal TSH and PRL release and TRH-stimulated TSH release. TSH was measured in 10 μl medium and PRL in 2 μl medium.

Data analysis. Data, except GH concentrations, are expressed as means \pm S.E. Results were analyzed by one- or two-way analysis of variance, as appropriate. Individual comparisons between group means were made by the *a posteriori*, multiple comparison test of Sheffe (Harnett, 1975). GH levels in serum from decapitated rats did not have a normal distribution and therefore were analyzed by the non-parametric Mann-Whitney U test (Harnett, 1975). GH data from cannulated rats were analyzed, if necessary, by analysis of variance of the area under the GH peaks.

RESULTS

Two hours after caffeine injection, serum TSH was markedly depressed, pulsatile GH release was inhibited, and serum PRL showed a slight, but not statistically significant, increase (fig. 1). The ED50 for caffeine to inhibit TSH release was 30 mg/kg; the ED50 to inhibit GH release was somewhat higher. There was a clear logarithmic-linear relation between the serum caffeine concentration and the caffeine dose injected (fig. 2). The ED50 of 30 mg/kg caffeine corresponds to serum caffeine concentrations (2 hr after injection) of about 20 µg/ml. Further, there was a linear, inverse correlation between serum TSH and serum caffeine in rats that received 0.1% caffeine in their drinking water for 12 days (fig. 3). As would be predicted from figure 2, only those rats with serum caffeine levels above 20 µg/ml had markedly lower serum TSH. Caffeine's effects last for several hours; 100 mg/kg caffeine still significantly suppressed serum TSH 6 hr after administration (fig. 4). This inhibition correlated with the still high serum caffeine concentration observed at that time (table 1).

TABLE 1

Time course of serum caffeine after i.p. administration of 100 or 12.5 mg/kg caffeine.

Hours after caffeine administration	Serum caffeine (µg/ml)	
	12.5 mg/kg	100 mg/kg
1	8 ± 2	115 ± 7
2	7 ± 2	115 ± 6
4	2 ± 1	103 ± 6
6	0.5 ± 1	90 ± 12

The prolonged TSH inhibition was in turn reflected by decreases in serum T₃ and T₄ at 4 and 6 hr after caffeine administration (fig. 4). Administration of a lower caffeine dose (12.5 mg/kg) had no significant effect on TSH, T₃, or T₄ at any time point (fig. 4). Serum PRL was not significantly affected by either 100 or 12.5 mg/kg caffeine at any time point. Serum GH pulses were significantly depressed up to 4 hr after administration of 80 mg/kg caffeine (fig. 5). Serum GH levels were not altered in rats decapitated 6 hr after caffeine administration. Theophylline and theobromine markedly inhibited TSH and GH, effects similar to those of caffeine (fig. 6).

Caffeine incubated directly with rat pituitaries in vitro did not affect TSH or PRL release and did not significantly modify in vitro TRH-stimulated TSH release (fig. 7).

Somatostatin antiserum injected i.v. completely blocked caffeine's inhibitory effect on GH secretion (fig. 8, table 2).

TABLE 2

Effect of somatostatin antiserum (SS AS) on caffeine-induced inhibition of growth hormone (GH) secretion.

Treatment		Mean plasma GH (ng/ml)	Change vs. controls
0945 hr	1045 hr		
Saline	NRS	97 ± 8	
Saline	SS AS	137 ± 10 ^a	+ 41 %
Caffeine	NRS	69 ± 7 ^b	- 29 %
Caffeine	SS AS	169 ± 19 ^a	+ 75 %

Caffeine (80 mg/kg) or saline was injected i.p. at 0945 hr ; normal rabbit serum (NRS) or somatostatin antiserum (SS AS) (0.5 ml) was given i.v. at 1045 hr. Mean plasma GH levels were determined between 1100 hr and 1425 hr. Data are expressed as means ± S.E. (n = 5).

^ap < 0.02

^bp < 0.05

DISCUSSION

High doses of caffeine markedly lower serum TSH and GH concentrations. The lowest effective dose to depress TSH is 20 mg/kg, a dose that corresponds to 15 to 18 µg/ml serum caffeine. Serum caffeine levels of 15 µg/ml or higher can be obtained in humans after consumption of 2 to 3 cups of coffee (250 mg or more caffeine) (Darragh *et al.*, 1979 ; Robertson *et al.*, 1978) or in human neonates treated with caffeine for neonatal apnea (Aranda and Turmen, 1979). Caffeine doses that do not elevate serum caffeine above 15 µg/ml have no significant effects on the hormones we examined. Whether caffeine inhibits TSH in humans remains to be seen. It seems unlikely that caffeine would lower GH in humans, since factors that lower GH in the rat (e.g., stress) usually stimulate GH secretion in humans (Martin *et al.*, 1977).

The depression of serum TSH after caffeine lasts for several hours and is proportional to caffeine's long serum half-life (Aldridge *et al.*, 1977). The depression is long enough to decrease serum T₃ and T₄, despite the thyroid hormones' long serum half-lives. Low doses of caffeine may stimulate the thyroid slightly, but this effect would have been masked by the inhibition of TSH at higher doses. Because hormonal stimulation of the thyroid is mediated in part by cAMP (Gilman and Rall, 1966), thyroid stimulation by caffeine would be possible.

Caffeine also affects body temperature (Berkowitz *et al.*, 1971) ; since TSH secretion varies inversely with body temperature (Martin *et al.*, 1977), caffeine's effect on TSH might reflect temperature changes. However, caffeine doses that lower TSH cause *hypothermia* and thus would be expected to elevate TSH levels rather than lower them.

Caffeine's complete suppression of GH serum pulses indicates that caffeine lowers serum levels of pituitary hormones by inhibiting their secretion ; it is highly unlikely that their catabolism could be accelerated sufficiently to abolish all serum GH pulses completely.

Caffeine's effects on TSH, GH, and PRL in the rat deviate from the classic pattern of stress responses only in that high doses of caffeine do not stimulate PRL. Exposure to stress (e.g., ether stress, swim stress, or restraint stress) stimulates PRL and inhibits TSH and GH in the rat (Mueller *et al.*, 1976 ; Rice and Critchlow, 1976). Because caffeine has peripheral effects on blood pressure, heart rate, respiration, and the adrenal medulla (Berkowitz and Spector, 1971a ; Ritchie, 1975 ; Robertson *et al.*, 1978), some of its effects may be stress-related. It is possible that inhibition of adrenal medullary secretion or β-adrenergic

blockade could block some of caffeine's neuroendocrine effects. However, since stress still inhibits TSH secretion in adrenalectomized rats (Kraicer *et al.*, 1963), it is unlikely that the adrenals mediate caffeine's neuroendocrine effects.

Caffeine may inhibit hormone secretion by directly affecting brain neurotransmitters. Caffeine does increase brain levels of serotonin and norepinephrine (Berkowitz and Spector, 1971b; Berkowitz *et al.*, 1970), and dopaminergic or serotonergic blockade can modulate caffeine's effects (Estler, 1979; White *et al.*, 1978).

Thus, caffeine may affect pituitary secretion via changes in the periphery, changes in the brain, or both. Whatever the direct mediation of caffeine's effects, the final pathways for inhibition of TSH and GH release may both involve somatostatin, a brain peptide that inhibits release of both pituitary hormones (Brazeau *et al.*, 1973; Vale *et al.*, 1974). Blocking somatostatin's effectiveness prevents caffeine's inhibitory action on GH (fig. 8). Caffeine may also lower serum TSH further by inhibiting TRH release. The mechanism by which caffeine affects somatostatin release remains to be determined.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by a grant from the International Life Sciences Institute.

REFERENCES

- ADAMS, R.F., VANDEMARK, F.L. and SCHMIDT, G.J.- More sensitive high-pressure liquid chromatographic determination of theophylline in serum. *Clin. Chem.* 22 : 1903-1906, 1976.
- ALDRIDGE, A., PARSONS, W.D. and NEIMS, A.H.- Stimulation of caffeine metabolism in the rat by 3-methyl cholanthrene. *Life Sci.* 21 : 967-974, 1977.
- ARANDA, J.V. and TURMEN, T.- Methylxanthines in apnea of prematurity. *Clin. Perinatol.* 6 : 87-106, 1979.
- BERKOWITZ, B.A. and SPECTOR, S.- Effect of caffeine and theophylline on peripheral catecholamines. *Eur. J. Pharmacol.* 13 : 193-196, 1971a.
- BERKOWITZ, B.A. and SPECTOR, S.- Effect of caffeine and theophylline on the disposition of brain serotonin in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 16 : 322-325, 1971b.
- BERKOWITZ, B.A., SPECTOR, S. and POOL, W.- The interaction of caffeine, theophylline and theobromine with monoamine oxidase inhibitors. *Eur. J. Pharmacol.* 16 : 315-321, 1971.
- BERKOWITZ, B.A., TARNER, J.H. and SPECTOR, S.- Release of norepinephrine in the central nervous system by theophylline and caffeine. *Eur. J. Pharmacol.* 10 : 64-71, 1970.
- BRAZEAU, P., VALE, W., BURGUS, B., LING, N., BUTCHER, M., RIVIER, J. and GUILLEMIN, R.- Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179 : 77-79, 1973.
- BROWN, M.R. and HEDGE, G.A.- Thyroid secretion in the unanaesthetized, stress-free rat and its suppression by pentobarbital. *Neuroendocrinology* 2 : 158-174, 1972.
- BUTCHER, R.W. and SUTHERLAND, E.W.- Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. *J. Biol. Chem.* 237 : 1244-1250, 1962.
- CLEMMENS, J.A. and FULLER, R.W.- Differences in the effects of amphetamine and methylphenidate on brain dopamine turnover and serum prolactin concentration in reserpine treated rats. *Life Sci.* 24 : 2077-2082, 1979.
- DARRACH, A., LAMBE, R.F., HALLINAN, D. and O'KELLY, D.A.- Caffeine in soft drinks. *Lancet* 1 : 1196, 1979.
- DESBUQUOIS, B. and AURBACH, G.D.- Use of polyethylene glycol. In : Antoniades, H.N. (ed.), *Hormones in Human Blood : Detection and Assay*. Harvard University Press, Cambridge, 1976, pp. 200-203.

- ESTLER, C.J.- Influence of pimozide on the locomotor activity produced by caffeine. *J. Pharm. Pharmacol.* 31 : 126-127, 1979.
- GILMAN, G.A. and RALL, T.W.- Studies on the relation of cyclic 3',5'-AMP to TSH action in beef thyroid slices. *Fed. Proc.* 25 : 617, 1966.
- HARNETT, D.L.- Introduction to Statistical Methods, 2nd ed. Addison-Wesley Publishing, Reading, MA, 1975, pp. 499, 521.
- HOLLANDER, C.S. and SHENKMAN, L.- Thyroxine and triiodothyronine. In : Jaffe, B.M. and Behrman (eds.), *Methods of Hormone Radioimmunoassay*. Academic Press, New York, 1974, pp. 215-230.
- KRAICER, J., DUCOMMUN, P., JOBIN, M., RERUP, C., VAN REES, G.P. and FORTIER, C.- Pituitary and plasma TSH response to stress in the intact and adrenalectomized rat. *Fed. Proc.* 22 : 507, 1963.
- LU, K.H. and MEITES, J.- Inhibition by L-dopa and monoamine oxidase inhibitors of pituitary prolactin release ; stimulation by methyl dopa and d-amphetamine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 137 : 480-483, 1971.
- MARANGOS, P.J., PAUL, S.M., PARMA, A.M., GOODWIN, F.K., SYAPIN, P. and SKOLNICK, P.- Purinergic inhibition of diazepam binding to rat brain (in vitro). *Life Sci.* 24 : 351-358, 1979.
- MARTIN, J.B., REICHLIN, S. and BROWN, G.M.- *Clinical Neuroendocrinology*. F.A. Davis Co, Philadelphia, 1977, pp. 152, 210.
- MUELLER, G.P., TWOHY, C.P., CHEN, H.T., ADVIS, J.P. and MEITES, J.- Effects of L-tryptophan and restraint stress on hypothalamic and brain serotonin turnover, and pituitary TSH and prolactin release in rats. *Life Sci.* 18 : 715-724, 1976.
- PATEL, Y.C. and REICHLIN, S.- Somatostatin in hypothalamus, extra-hypothalamic brain and peripheral tissues of the rat. *Endocrinology* 102 : 523-530, 1978.
- PHILLIS, J.W. and KOSTOPULOS, G.K.- Adenosine as a putative transmitter in cerebral cortex : studies with potentiators and antagonists. *Life Sci.* 17 : 1085-1094, 1975.
- RAVITZ, A.J. and MOORE, K.E.- Effects of amphetamine, methylphenidate, and cocaine on serum prolactin concentrations in the male rat. *Life Sci.* 21 : 267-272, 1977.
- RICE, R.W. and CRITCHLOW, V.- Extrahypothalamic control of stress induced inhibition of GH secretion in the rat. *Endocrinology* 99 : 970-976, 1976.
- RITCHIE, J.M.- The xanthines. In : Goodman, L.S. and Gilman, A. (eds.), *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 5th ed. Macmillan Publishing Co, New York, 1975, pp. 367-378.
- ROBERTSON, D., FROLICH, J.C., CARR, R.K., WATSON, J.T., HOLLIFIELD, J.W., SHAND, D.G. and OATES, J.A.- Effects of caffeine on plasma renin activity, catecholamines and blood pressure. *N. Engl. J. Med.* 298 : 181-186, 1978.
- RODBARD, D. and HUTT, D.M.- Statistical analysis of radioimmunoassay and immunoradiometric assays. In : *RIA and Related Procedures in Medicine*. International Atomic Energy Agency, Vienna, 1974, pp. 165-192.
- SATTIN, A., RALL, T.W. and ZANELLA, J.- Regulation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels in guinea-pig cerebral cortex by interaction of alphaadrenergic and adenosine receptor activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 192 : 22-32, 1975.
- SPINDEL, E.R., MUELLER, G.P. and WURTMAN, R.J.- D-Amphetamine : effects on TRH immunoreactivity in regions of rat brain and on plasma TSH. Program of the 60th Annual Meeting of the Endocrine Society, 1978 (abstract 398).
- TANNENBAUM, G.S. and MARTIN, J.B.- Evidence for an ultradian rhythm governing growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 98 : 562-570, 1976.

VALE, W., RIVIER, C., BRAZEAU, P. and GUILLEMIN, R.- Effects of somatostatin on the secretion of TSH and prolactin. *Endocrinology* 95 : 968-977, 1974.

WHITE, B.C., SIMPSON, C.C., ADAMS, J.E. and HAWKINS, D. Jr.- Monoamine synthesis and caffeine induced locomotor activity. *Neuropharmacology* 17 : 511-513, 1978.

WILBER, J.F. and SEIBEL, M.J.- Thyrotropin-releasing hormone interactions with an anterior pituitary membrane receptor. *Endocrinology* 92 : 888-893, 1973.

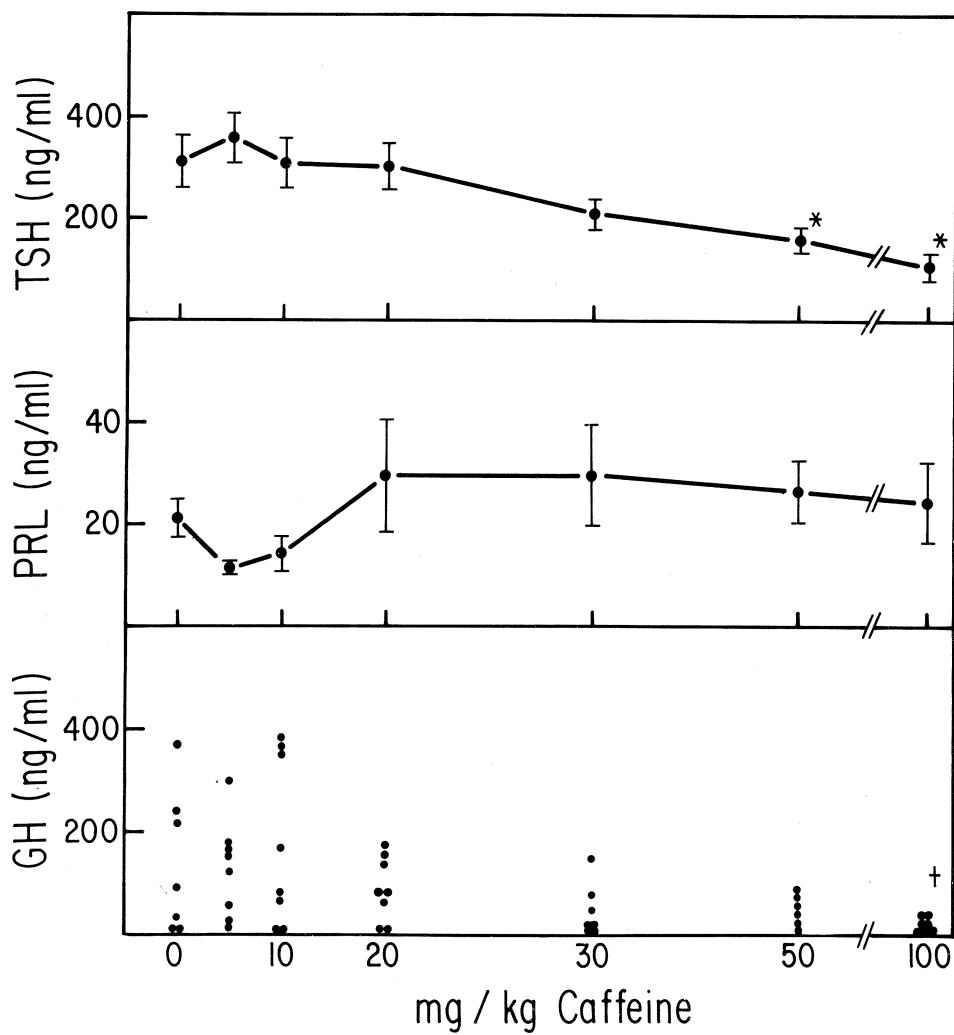


Fig. 1. Serum TSH, PRL, and GH 2 hr after varying doses of caffeine i.p. * $p < 0.05$, compared to control, by the method of Sheffe. † $p < 0.05$, compared to control, by Mann-Whitney U test.

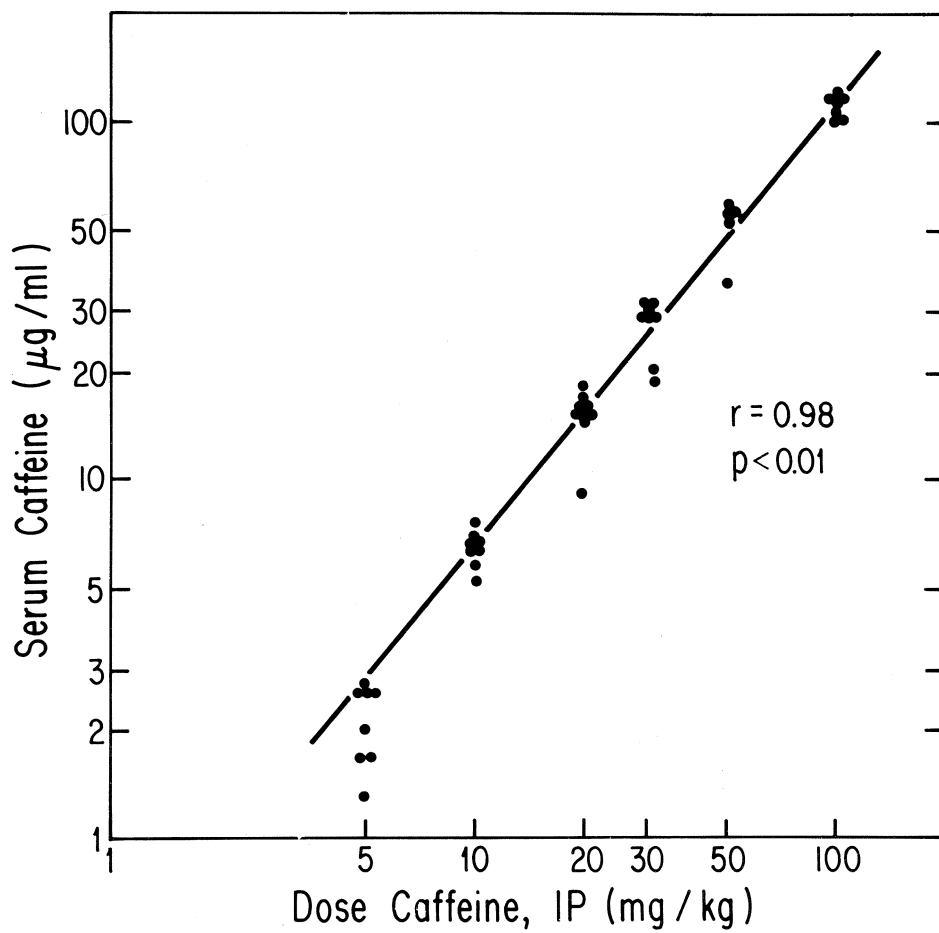


Fig. 2. Correlation between dose caffeine and serum caffeine 2 hr after i.p. injection. Data are plotted on a logarithmic scale.

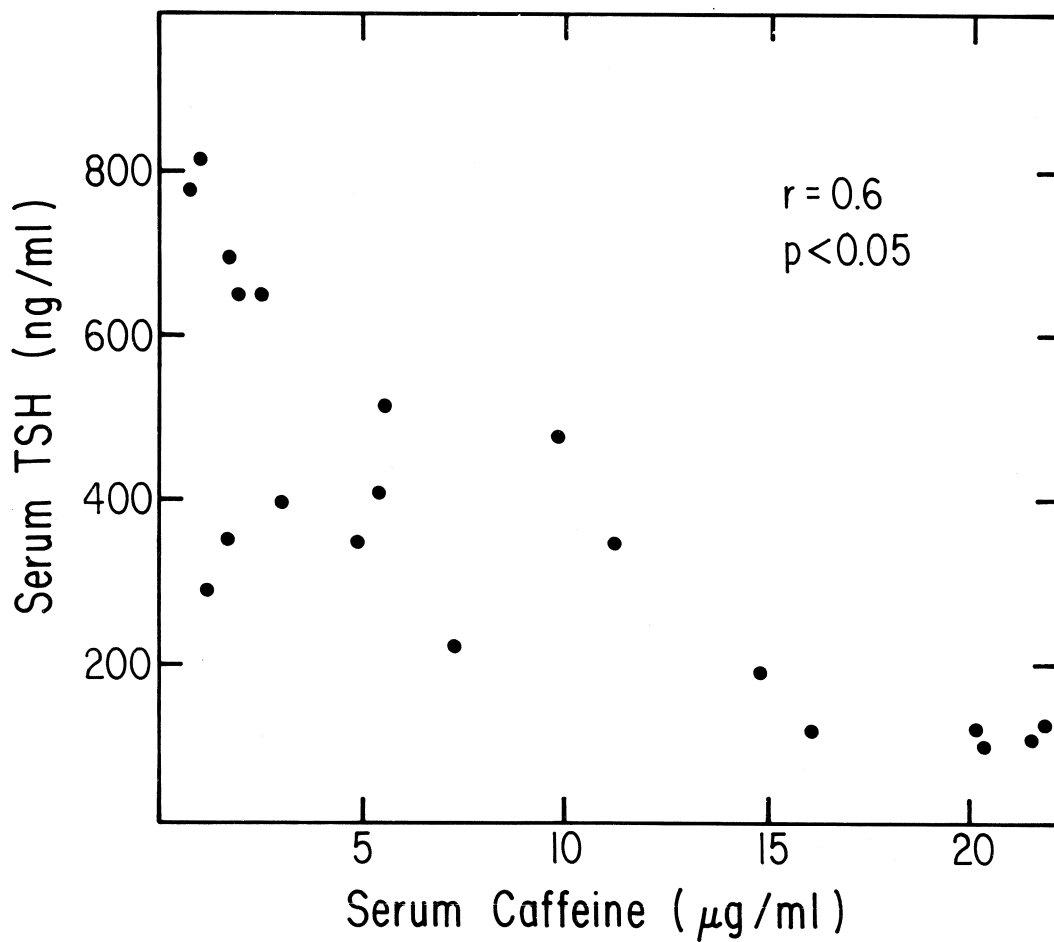


Fig. 3. Correlation between serum caffeine and serum TSH in rats that received 0.1 % caffeine in their drinking water for 12 days.

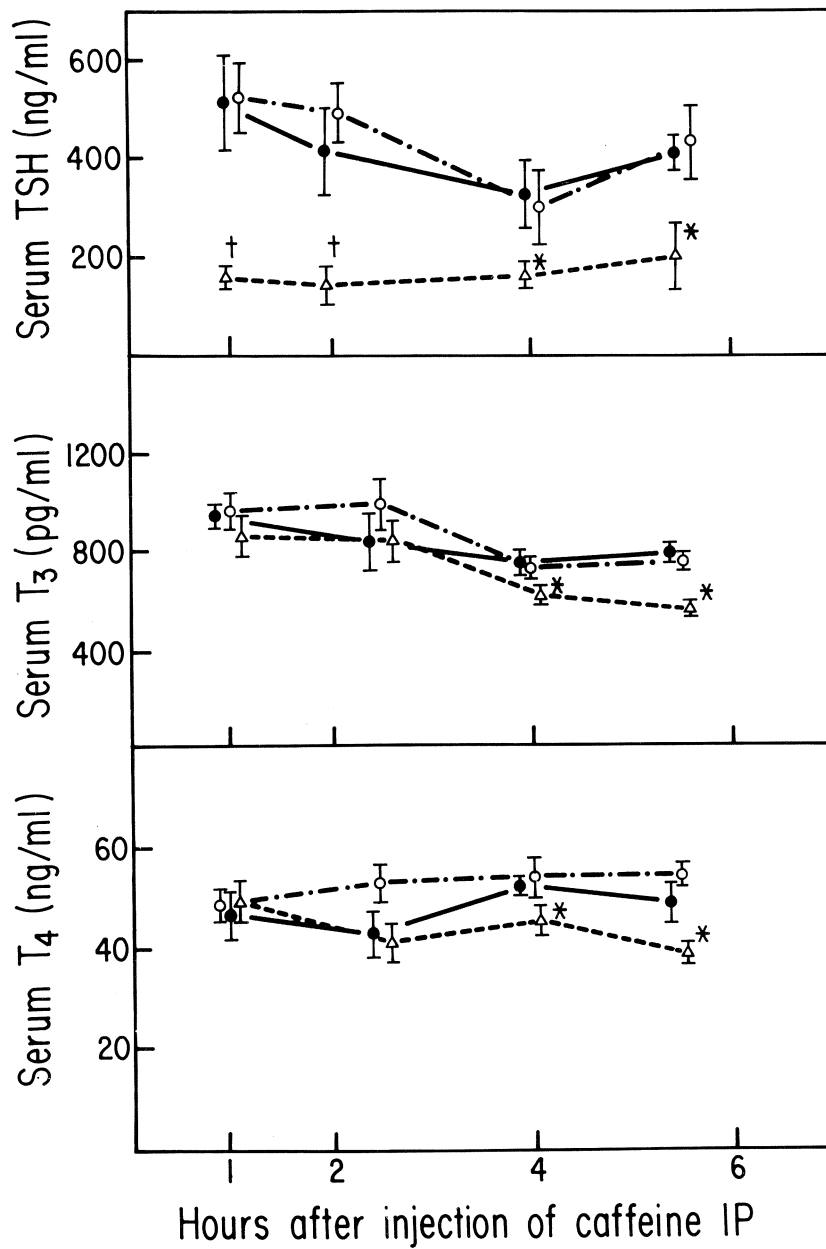


Fig. 4. Time course of effects of 100 mg/kg caffeine (Δ --- Δ), 12.5 mg/kg caffeine (\circ - \circ), and saline (\bullet — \bullet) injected i.p. on serum TSH, T₃, and T₄. * $p < 0.05$, † $p < 0.01$, compared to saline-treated animals at same time point, by the method of Sheffe.

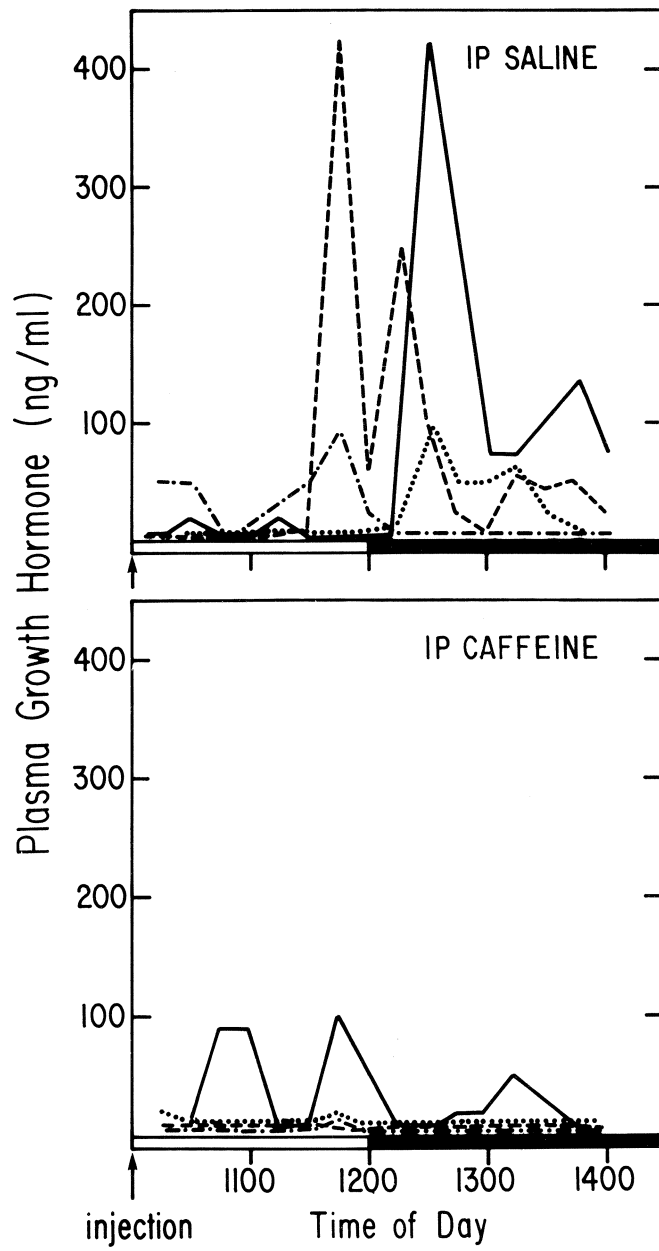


Fig. 5. Plasma GH profiles of 4 rats given saline or caffeine (30 mg/kg) i.p. 2 days apart.

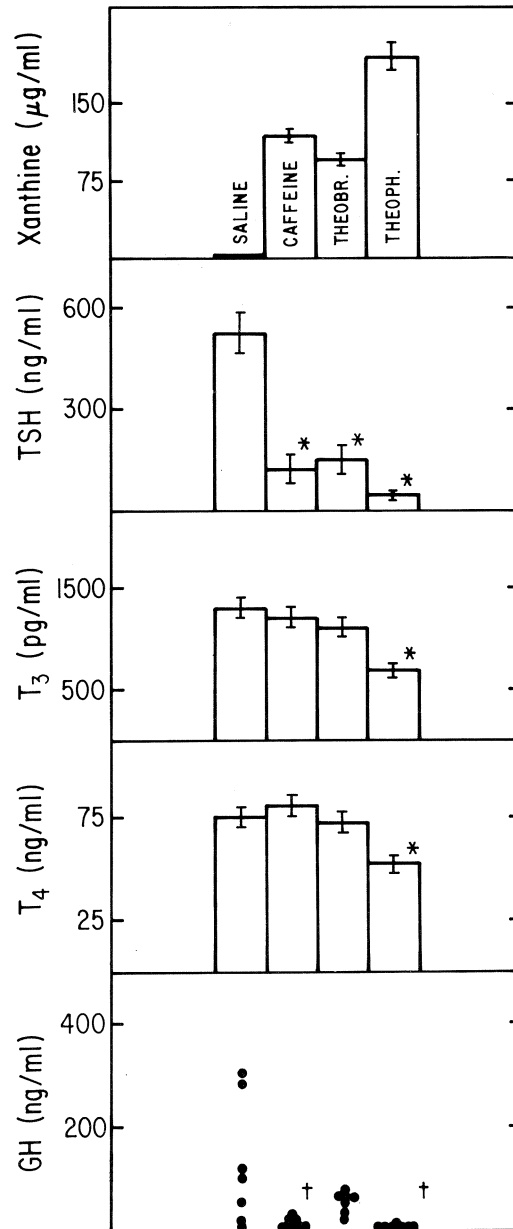


Fig. 6. Effect of i.p. saline, caffeine (100 mg/kg), theophylline (200 mg/kg), or theobromine (200 mg/kg) on serum TSH, T₃, T₄, GH, and the resulting serum xanthine levels. **p* < 0.05, compared to saline, by the method of Sheffe. †*p* < 0.05, compared to saline, by Mann-Whitney U test.

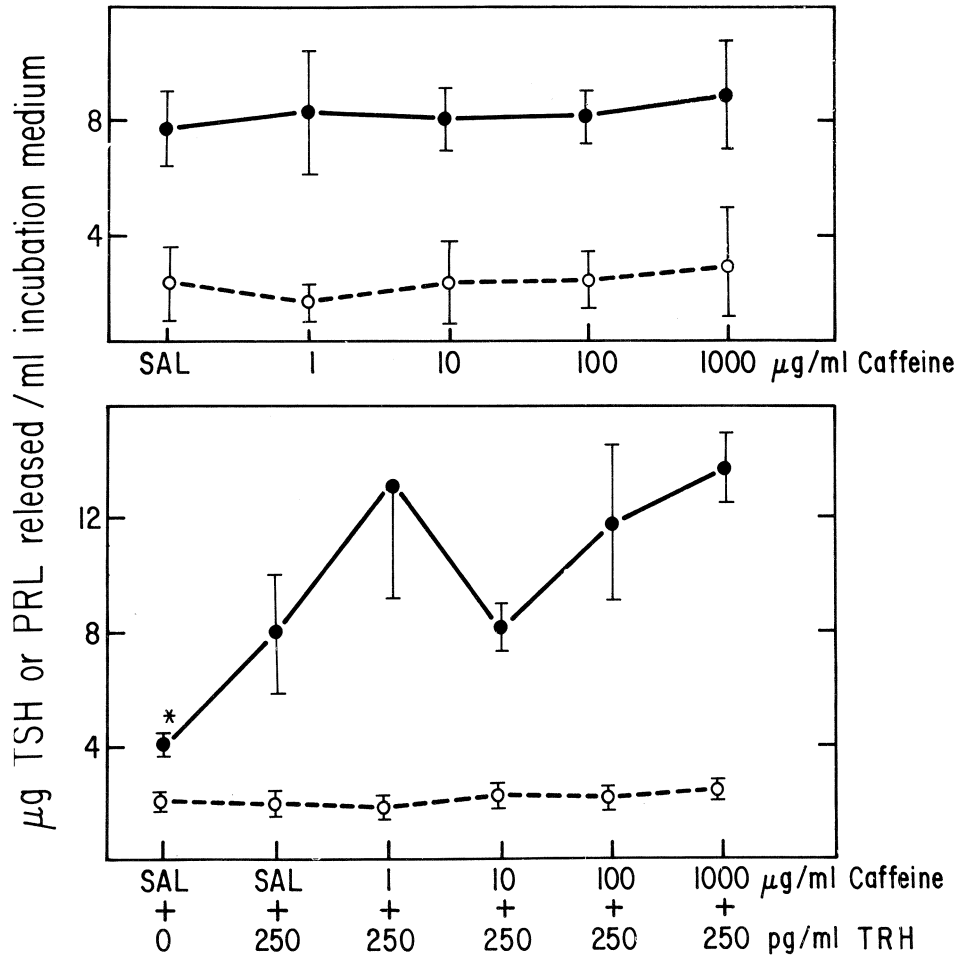


Fig. 7. TSH (●—●) and PRL (○—○) released into medium by pituitaries incubated with caffeine at the concentrations shown. Upper panel shows basal release. Lower panel shows TRH-stimulated release. * $p < 0.05$, compared to all groups with TRH added.

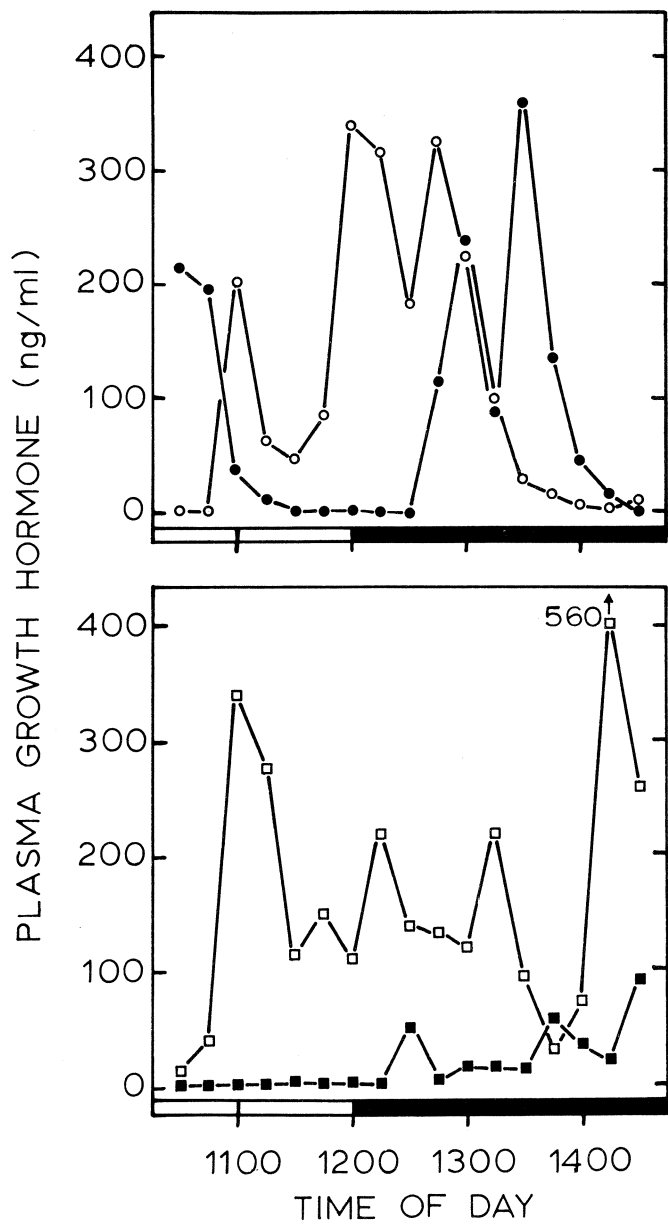


Fig. 8. Plasma GH profile of an individual rat given each of these treatments on separate days : (●—●) saline + normal rabbit serum, (○—○) saline + somatostatin antiserum, (■—■) caffeine + normal rabbit serum, (□—□) caffeine + somatostatin antiserum. Caffeine (80 mg/kg) or saline was injected i.p. at 0945 hr. Antiserum or normal serum was administered i.v. at 1045 hr.

IS THERE AN ANTI-THIAMINE EFFECT OF COFFEE ?

R. STALDER

Société d'Assistance Technique

pour Produits Nestlé S.A.

Laboratoire Biologique Orbe

CH-1350 Orbe, Suisse

INTRODUCTION

Thiamine or as it is commonly called vitamin B₁ is a vitamin of the B complex and is necessary for carbohydrate metabolism, the maintenance of normal neural activity and the prevention of beriberi. Several articles in scientific and nonscientific journals have described a so-called anti-thiamine effect of coffee. The authors claimed that coffee destroys or at least reduces the activity of thiamine ingested with the food. In fact Somogyi and coworkers found that after coffee consumption the urinary thiamine excretion in human volunteers decreased (1,2,3). In addition it has been found that chlorogenic acid present in the coffee, destroys the thiamine and so in turn reduces its urinary excretion.

The fact that chlorogenic acid and other ortho-diphenols interfere in vitro with thiamine is not in itself new and many plant extracts exhibit an anti-thiamine activity due to their content of o-diphenols. Results found in such in vitro studies are however, difficult to extrapolate to the situation in vivo which is considerably more complex. An inhibitor detected in an in vitro test system is not necessarily active in vivo. It may be inactivated, the kinetics of absorption may be different and the physico-chemical environment is certainly different. The aim of the present study was therefore to investigate the effects of coffee drinking on the urinary thiamine excretion and activity in human and experimental animals.

METHODS

Experiment 1 : Human volunteers consumed during a period of 5 days a standardized diet. It consisted of normal meals as served in the personnel restaurant or else commercial frozen food. The test group consumed daily 12g of instant coffee (Nescafé Standard) corresponding to about 6 cups and their water consumption was not limited. The volunteers serving as controls were only allowed to drink water except when fruit juice was part of the menus and hence taken by both groups. Prior to the experimental period all the volunteers received a multivitamin preparation (Supradyn, Roche) for 3 days in order to equilibrate the vitamin pools. Urine sampling started at the first day of the experimental period at 4 p.m. and was continued during the 4 following days. The 24h. urine was preserved by the addition of 50 ml acetic acid. On the last morning a blood sample was taken from the fingertips of the volunteers before breakfast.

Experiment 2 : Human volunteers consumed a standardized diet during 1 day and the next morning a standardized breakfast. The test group drank 1 liter of coffee (12g Nescafé-Standard) within the 2 hours after the breakfast while the control group drank 1 liter of water. The experiment was designed as a paired experiment with each volunteer serving as its own control or test 1 week later.

Experiment 3 : Female mice (Swiss mice, IFFA CREDO, Lyon) were fed a commercial standard diet (Nafag 850, Nafag A.G., Gossau, Switzerland) for 4 months. Coffee (Nescafé Gold) was mixed with the diet of the test group at a level of 5 %. The animals were weighed weekly and at the end, the blood thiamine concentration, the activity of the erythrocyte transketolase (4) and the liver α -ketoglutarate-dehydrogenase (5) were measured.

Experiment 4 : Male Sprague Dawley rats received an oral dose of 3g of Nescafé Gold in 20ml of water per kg body weight. The coffee was given to fasted (overnight) and non-fasted animals with or without additional thiamine as shown in table 4. The urine was collected for 6 hours after gavage of the coffee.

Determination of thiamine : To determine the thiamine concentrations in blood and urine the thiochrome method was used (6). The values measured in urine were confirmed by a microbiological test using *Lactobacillus viridescens* as indicator organism (Difco thiamine assay).

RESULTS

Human volunteers drinking coffee during period of 5 days did not show a decreased urinary thiamine excretion as shown in table 1.

Table 1 : Urine volumes and urinary thiamine excretion of human volunteers drinking 12g of instant coffee per day.

sex	sampling period (24h)	mean urine volume (ml/24h)		mean urinary thiamine excretion (µg/24h)	
		H ₂ O n = 3	coffee n = 4	H ₂ O n = 3	coffee n = 4
m	1	1345	1245	778	790
	2	1357	1408	908	1002
	3	973	1385	547	1094
	4	927	1638	449	882
	mean	1151	1419*	671	942**
		n = 2	n = 6	n = 2	n = 6
f	1	985	1754	431	1026
	2	1113	1983	588	1229
	3	1853	2007	686	1067
	4	1175	1808	513	1062
	mean	1282	1888*	555	1096**

* $P \leq 0.05$ } U-test Wilcoxon, Mann and Whitney
 ** $P \leq 0.01$ }

The values are not normally distributed hence the U-test of Wilcoxon, Mann and Whitney was used for statistical evaluation. In table 1 only the mean values are shown. When comparing all the urine volumes of the test group with the control values we found a significant increase of the urine volume of coffee drinkers. Also the daily thiamine excretion was significantly increased in the test group. When analyzing the results of each day individually we found no statistically significant differences in the thiamine excretion at days 1 and 2 and a significant increase at days 3 and 4. The reduced number of volunteers in this experiment does not permit a too far-reaching interpretation. However, no reduction of urinary thiamine excretion due to coffee drinking could be observed. The blood thiamine concentrations of the test group were between 40 and 50 µg per liter and did not differ significantly from the controls.

In the second experiment 1 liter of coffee made from 12g of instant powder was drunk within 2 hrs after breakfast. This experimental design resembles very much that used by Somogy and coworkers. The results are summarized in table 2.

Table 2 : Urinary excretion of thiamine after drinking 1 liter of coffee (12g Nescafé Standard). In brackets : range

sex	n	urine volume ml		thiamine excretion µg/7h	
		H ₂ O	coffee	H ₂ O	coffee
m	9	941 (540-1300)	970 (300-1340)	255 (179-408)	366** (251-451)
f	9	1073 (600-1360)	984 (600-1360)	210 (164-254)	360** (282-453)

** $P \leq 0.01$ one sided Wilcoxon matched pairs signed rank test.

In this experiment each individual served as its own control. Statistical evaluation by the Wilcoxon test was used since the values were not distributed normally. No significant differences were observed for the urine volumes. As in the previous experiment the thiamine excretion of the test group was increased when compared to the controls.

Animals receiving high doses of coffee should have a modified thiamine status if coffee exerts a significant anti-thiamine activity. The female mice fed a commercial standard diet containing 5 % of instant coffee showed normal growth. In addition at the end of the experiment the urinary thiamine concentration was not changed as shown in table 3.

Table 3 : Urinary thiamine excretion of female mice after 4 months of coffee consumption.

diet	thiamine in urine µg/24hrs (SEM)	blood thiamine µg/100ml (SEM)
control 1)	7.2. (0.71)	38.9 (2.00)
50mg thiamine / kg diet 2)	18.2 (2.18)	43.1 (2.07)
50g coffee/kg diet	8.8 (0.66)	41.3 (1.93)
50g coffee + 50mg thiamine/kg diet	21.8 (2.40)	46.0 (2.40)

- 1) the control diet contained about 10mg thiamine/kg
- 2) added to the control diet.

No changes of the urinary thiamine excretion were observed in the test groups, on the contrary there appeared to be an increase.

The animals receiving diets supplemented with thiamine obviously had a much higher excretion, but the added thiamine does not appear to have been influenced by the coffee.

The activities of two thiamine dependent enzymes namely the erythrocyte transketolase and the liver α -keto-glutarate-dehydrogenase were measured and no differences in the enzymatic activities were observed.

In a last experiment we administered a single dose of 3g of instant coffee per kg. body weight to male rats. The treatment schedule is shown in table 4. All animals received 20ml of water per kg body weight by gavage.

Table 4 : Urinary thiamine excretion in male rats after a single dose of coffee (3g/kg b.w.) (n=12)

treatment	dose g/kg b.w.	urinary thiamine excretion μ g/6hrs (SEM)	
A control	-	9.2	(0.90)
B coffee	3 p.o.	6.1	(0.70) A \rightarrow B**
C thiamine	0.001 p.o.	32.7	(3.36)
D thiamine + coffee	0.001 p.o.+ 3 p.o.	11.7	(1.28) C \rightarrow D***
E control fasted 1)	-	4.5	(0.79)
F coffee, fasted animals	3 p.o.	4.7	(0.72)
G thiamine	0.001 i.p.	65.3	(9.51)
H thiamine + coffee	0.001 i.p.+3 p.o.	59.5	(7.23)

1) over night

Interestingly the acute dose of coffee did reduce the urinary thiamine excretion in the rats that were not fasted. A highly significant reduction of the thiamine excretion was also found when thiamine and coffee are mixed together and then administered. However, if coffee is given to fasted animals we do not observe a reduction of the thiamine excretion.

Thiamine given intra-peritoneally was quickly excreted and its excretion was not significantly influenced by coffee.

The results of this last experiment are in contradiction to those of the previous experiments. However, the dose of coffee was exceedingly high, 3g per kg. body weight corresponds to a dose of about 200g for an adult man. Large amounts of water given perorally cause a flushing of stomach content into the duodenum, as we have seen in another context with x-ray studies. We also know that instant coffee when given by a stomach tube to rats slows down the intestinal motility in the upper small intestine. It may be that these effects also contribute to the differences in thiamine excretion we observed.

Our results indicate that coffee consumption did not influence the thiamine excretion in adult human subjects. No decrease was observed following either an acute dose of 1 liter of coffee nor after drinking the same amount of coffee daily during five days.

Chronic administration of coffee in the diets of mice at levels of 5 % did not influence the thiamine excretion or the activity of thiamine-dependent enzymes.

The administration of a large amount of coffee to rats, a dose corresponding to 200g of instant coffee for an adult, provoked a reduction of the urinary thiamine excretion.

In conclusion, an anti-thiamine effect of coffee could only be provoked when using an extreme unphysiological experimental design. It seems that coffee consumption does not influence the thiamine status of man.

Acknowledgments

The author would like to thank Mr. M. Marchesini for his technical assistance, Mr. A. Poot for animal husbandry and Ms R. Acheson for editorial help.

Bibliography

1. J.C. Somogyi, U. Nägeli Internat. J. Vit. Res. 46 149-153 (1976)
2. J.C. Somogyi, U. Nägeli Probleme Ernährungs-u. Lebensm.-wiss. 4 75-80 (1977)
3. J.C. Somogyi Wld Rev. Nutr. Diet 29 42-59 (1978)
4. M. Brin in H.U. Bergmeyer, Methods of Enzymatic Analysis Vol 2 pp 703-709 (1974)
5. D.R. Sanadi, J.W. Littelfield, R.M. Bock J. Biol. Chem. 197 851 (1952)
6. H.B. Burch, U.A. Bessey, R.H. Love, O.H. Lowry J. Biol. Chem. 198 477 (1952).

COFFEE, GASTRO-INTESTINAL HORMONES AND OESOPHAGEAL FUNCTION

H. P. WURZNER

Nestlé Products

Technical Assistance Company

Biological Laboratory Orbe,

Switzerland

Coffee intolerance, for years under much discussion in Germany and the United States, has to be considered as a complex problem involving several possible syndromes, anatomical sites and organ systems. Following the line of prevailing complaints we focussed our attention on the oesophagus and the stomach. Reflux oesophagitis is a common clinical problem.

SLIDE 1

The critical area of the oesophagus appears to be the anatomical site 5 cm above the cardia. This lower part of the oesophagus under normal conditions represents a zone of 15-30 mm mercury pressure higher than intragastric and upper oesophageal pressures.

If this pressure, logically called the lower oesophageal sphincter pressure (LOSP), falls frequently or permanently under a critical value of 10 mm. mercury against intragastric pressure, a pathological situation is created, which leads consequently to reflux oesophagitis.

The clinical consequence of acid reflux in the oesophagus can be evaluated by endoscopy with fiberoptic instruments and subsequent evaluation of biopsy samples. Reflux may cause inflammation, ulceration and sclerosis of the lower oesophagus. Morphologically this is characterized by a thickening of the basal cell layer and a considerable extension of the papillae to the luminal surface in such a way that chemoreceptors are easily exposed to refluxing acid contents of the stomach. This may result in the well-known symptom of heartburn defined as retrosternal burning coming in waves and radiating to the neck.

SLIDE 2 : Beigi

BEIGI and coworkers (1970) in their Venn diagram show, however, that there is only a partial overlapping of symptoms such as heartburn, clinical

parameters such as reflux and the morphological picture.

Thanks to some pioneering work it is now possible to monitor the pressure developed in this zone with reproducible precision. Single or triple lumen PVC catheters (140 cm long, 1.4 mm. internal diameter) with lateral openings just proximal to the sealed end tip are introduced via the mouth until the openings lie within the stomach. After stabilization of the pressure transduced to a multi-channel recorder, the catheter is manually withdrawn at an approximate speed of 0.5-cm/second.

The rapid pull-through method described by Dodds (1975) in contrast to the station pull-through technique avoids recording artefacts caused by respiration and provides precise end-points for scoring. We used exclusively the rapid pull-through technique in our clinical trials.

SLIDES 3 + 4 : Dodds

GREGORY and TRACY (1964) discovered Gastrin a gastrointestinal hormone. Some years later JORPES and MUTT (1966) purified and identified Secretin and Cholecystokinin, but it was not immediately realized, that these hormones regulate besides their multiple other functions the competence of the lower oesophageal sphincter.

Since Gastrin and Cholecystokinin carry at their C-terminal a striking similarity of their amino acid sequence, it was suggested that both hormones compete for the same-receptor sites and on this basis antagonise each other.

SLIDE 5 : Gastrin/Cholecyst.

Cholecystokinin is indeed a potent inhibitor of Gastrin. In many experiments it was shown that gastrin infusion or gastrin stimulating test meals lead to contraction of the lower oesophageal sphincter. Cholecystokinin on the other hand inhibits gastrin release and in addition develops a relaxing effect on the lower oesophagus sphincter.

SLIDE 6 : Cholecyst. Dos.Dep.

It was of course of outmost importance to study the triggering effects of food items such as protein, fat and carbohydrate on the release of these hormones and consequently on the function of the lower oesophageal sphincter. An impressive reduction of pentagastrin induced pressure was achieved by a corn oil test meal. It was assumed, that Cholecystokinin was the effective humoral mediator for this effect.

SLIDE 7 : Fasting conditions / FAT

Indeed when CASTELL and NEBEL studied the effect of protein and fat test meals in human subjects, it appeared clearly that protein raises the lower oesophageal pressure and fat lowers it. Carbohydrates have no specific effect.

SLIDES 8 + 9 : CH/PROT/FAT

If corn oil and meat are given together an intermediate effect results.

SLIDE 10 : PROT/FAT

When we tested caffeine at equivalent doses of one cup of coffee to our surprise there was no effect on gastrin release and sphincter pressure in the fasting subject. This was confirmed by various other groups meantime.

Both regular and decaffeinated coffee, however, provoke a distinct transient gastrin release followed by a pressure rise in the lower oesophageal sphincter provided that equivalents of at least two cups of coffee are administered at once. A single cup of coffee developed however no significant effect in our studies. We have already reported on this September 1977 to the British Gastroenterologic Society.

It is possible that in regular coffee cyclic AMP accumulated by phosphodiesterase inhibition by caffeine cancels out the effect at the one cup dose level. Cyclic AMP was shown to reduce LOSP.

If coffee consumed in larger doses develops a tendency to strengthen the lower oesophagus sphincter, it should be concluded, that coffee prevents reflux under similar conditions. Therefore in this case the wide-spread association of heartburn symptoms and reflux oesophagitis with coffee drinking must be wrong.

There is however the possibility, that traditional food habits or other specific habits interfere and are responsible for the particular regional and national distribution of such a syndrome.

For the evaluation of possible interferences of common food and to prove this hypothesis, we designed a study in which the effect of coffee in combination with a standard meal was assessed. This study was performed together with Drs. Fedail, Salmon, Harvey and Read at University Department of Medicine Bristol Royal Infirmary, (1977).

SLIDE 11 : Design

The standard test meal was composed of 18g corn oil, 15 g protein and 40 g glucose in 300 ml water.

Coffee alone or with evaporated milk at this dose of one cup had no significant effect on the lower oesophageal sphincter pressure. For this reason they do not figure in the following diagram.

SLIDE 12 : Histogram

The Lundh meal alone provoked a significant relaxation of the oesophagus sphincter at 45 minutes. When followed by coffee with milk the effect was delayed to 60 minutes. With coffee alone following the test meal there was no significant effect at 45 and 60 minutes.

Reflux continuously measured under these conditions, by a microelectrode positioned in the oesophagus, was observed in two subjects out of 10. These two subjects had already a low basal oesophageal sphincter pressure. This test was considered positive, if the pH indicated a fall lower than pH 4. All subjects in this study had in addition to perform several specific manoeuvres, which increase abdominal pressure similar to natural conditions. An Acid Clearance Test performed by swallowing ten times adjusted immediately the pH to normal values in these two subjects.

Closing the circle of this problem around the lower oesophagus function, we realize the complexity of possible interferences. We should mention that such wide spread social habits as cigarette smoking and alcohol drinking in addition are responsible for significant relaxation of the oesophagus sphincter and therefore interfere in a decisive manner in its regulatory mechanisms (S. Cohen 1976).

Consequently variances in the occurrence of this syndrom in a given population have to be attributed primarily to patho-physiological predisposition to some wide-spread social habits and finally to the existing foods habits. Coffee in this context doesnot interfere directly and is therefore not a determinant factor for the reflux mechanism.

References

- F.I. Beigi, P.F. Horton, C.E. Pope
Histological Consequences of gastroesophageal reflux in man.
Gastroenterology, 58 : 163-174 (1970)
- W.J. Dodds, W.J. Hogan, J.J. Stef, W.N. Miller, S.B. Lydon, R.C. Arndorfer
A rapid pull-through technique for measuring lower oesophageal sphincter pressure.
Gastroenterology, 68 : 437-443 (1975)
- A.R. Gregory, H.J. Tracy
The constitution and properties of two gastrins extracted from hog central mucosa.
Gut, 5 : 103-117 (1964)
- V. Mutt, J.E. Jorpes
Secretin isolation and determination of structure.
Symposium on the Chemistry of natural products, Stockholm (1966)
- J.E. Jorpes, V. Mutt
Cholecystokinin and pancreozymin one single hormone.
Acta Physic. Scand. 66 : 196-202 (1966)
- H. Resin, D.H. Stern, R.A.L. Sturdevant, J.I. Isenberg
Effect of the C-terminal octapeptide of cholecystokinin on lower oesophageal sphincter pressure in man.
Gastroenterology 64 : 946-949 (1973)
- O.I. Nebel, D.O. Castell
Inhibition of the lower oesophageal sphincter by fat, a mechanism for fatty food intolerance.
Gut, 14 : 270-274 (1973)
- S.S. Fedail, P.R. Salmon, H.P. Würzner, R.F. Harvey, A.E. Read
Effect of coffee on human lower oesophageal function.
The British Society of Gastroenterology, September 1977
- S. Cohen
Oesophageal reflux: new concepts in medical management.
Hospital Practice 11 : 131-137 (1976).

Reflux Oesophagitis

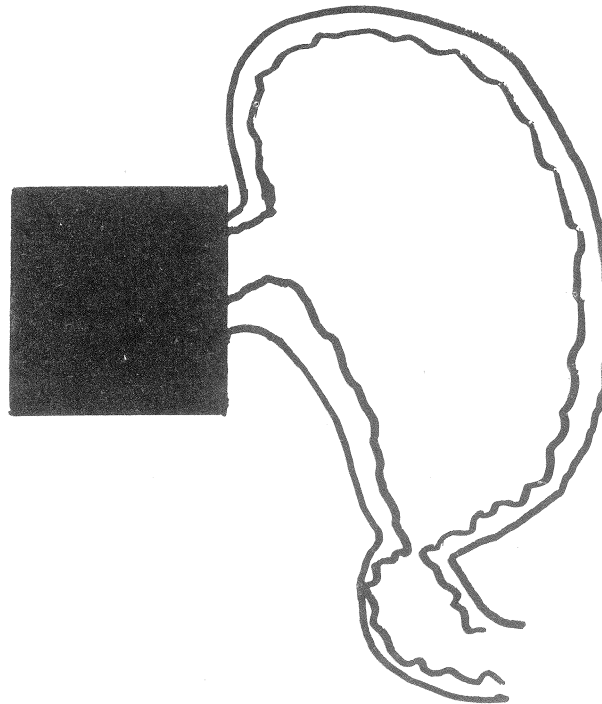
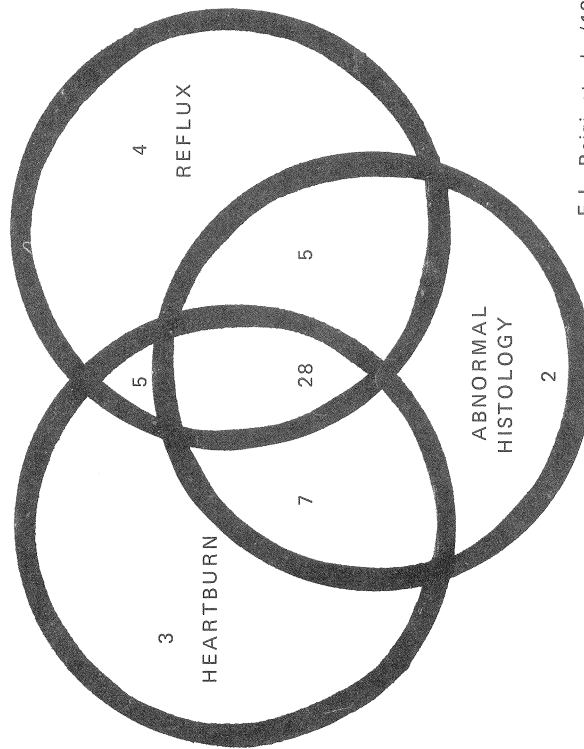


Figure 1

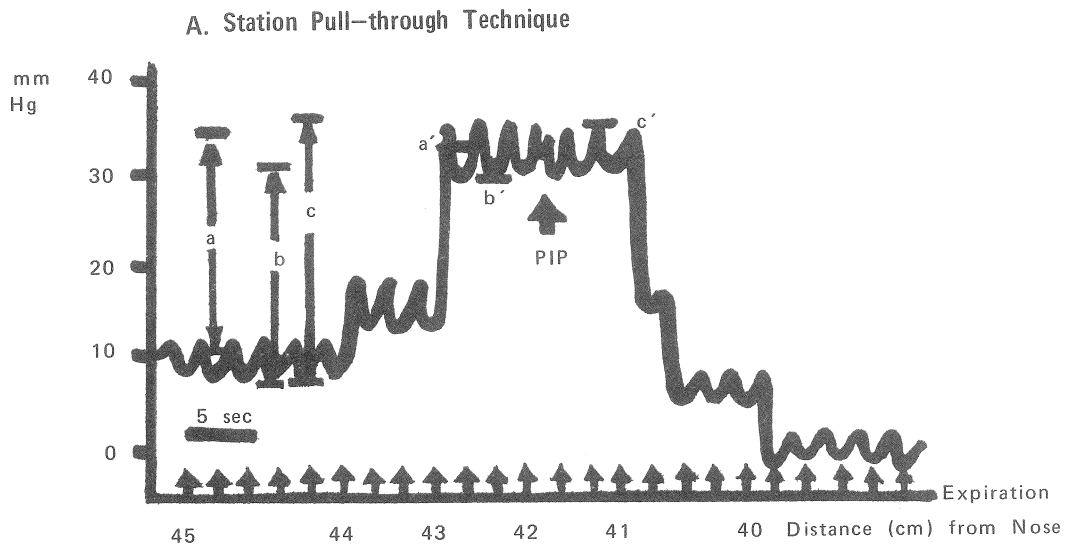
Relationship of heartburn, gastroesophageal reflux, and abnormal histology

Control: 19 (Asymptomatic)
Symptomatic: 54 Subjects



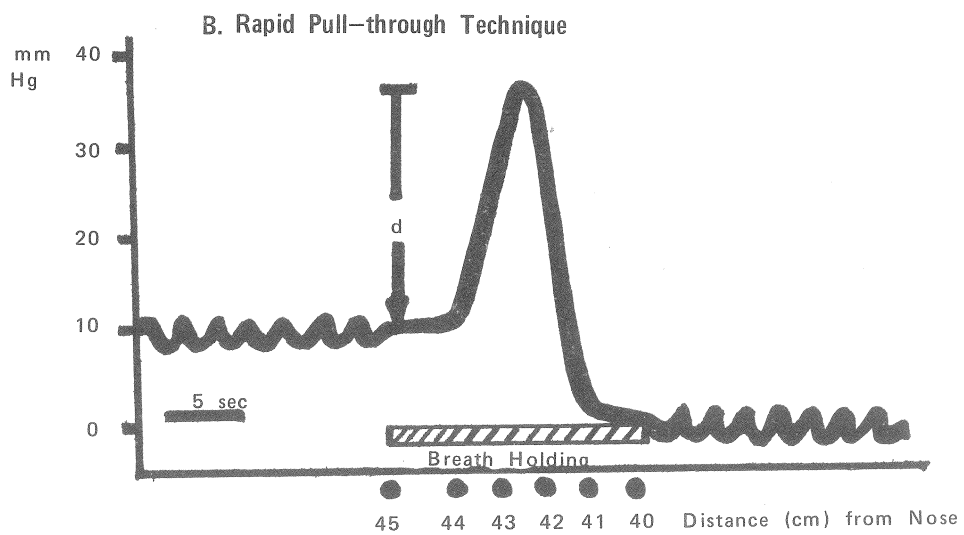
F.I. Beigi et al. (1970)

Figure 2



Dodds et al. (1975)

Figure 3



Dodds et al. (1975)

Figure 4

Figure 5

C-TERMINAL PEPTIDE STRUCTURE

GASTRIN



CHOLECYSTOKININ

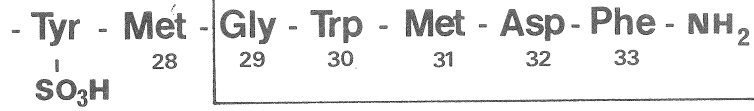


Figure 6

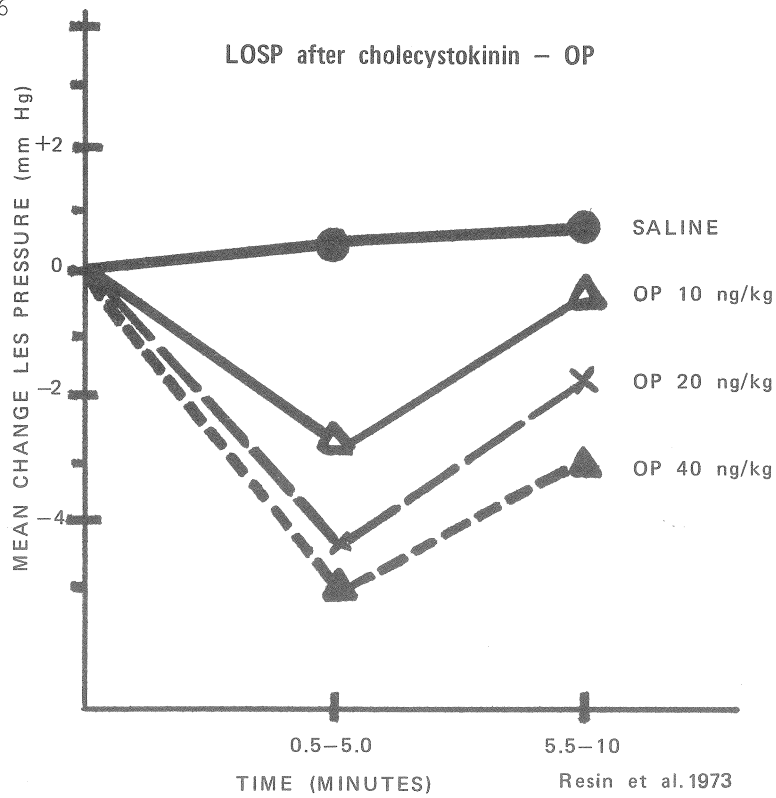


Figure 7

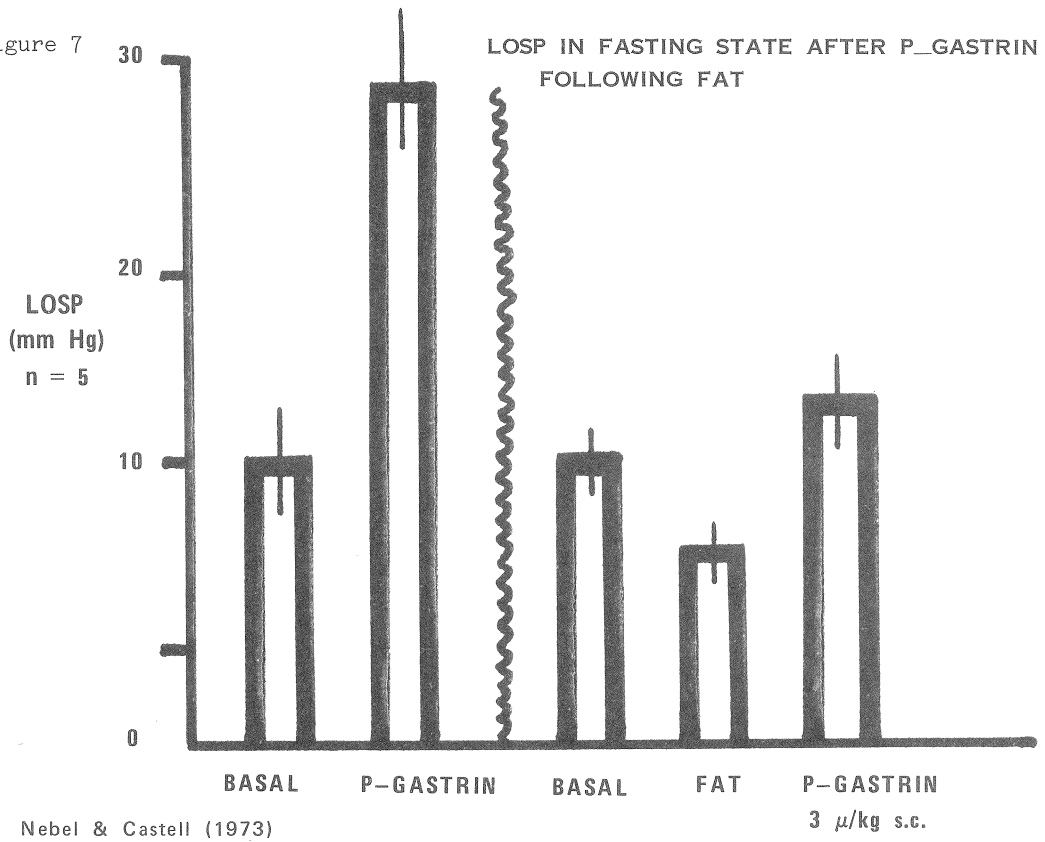
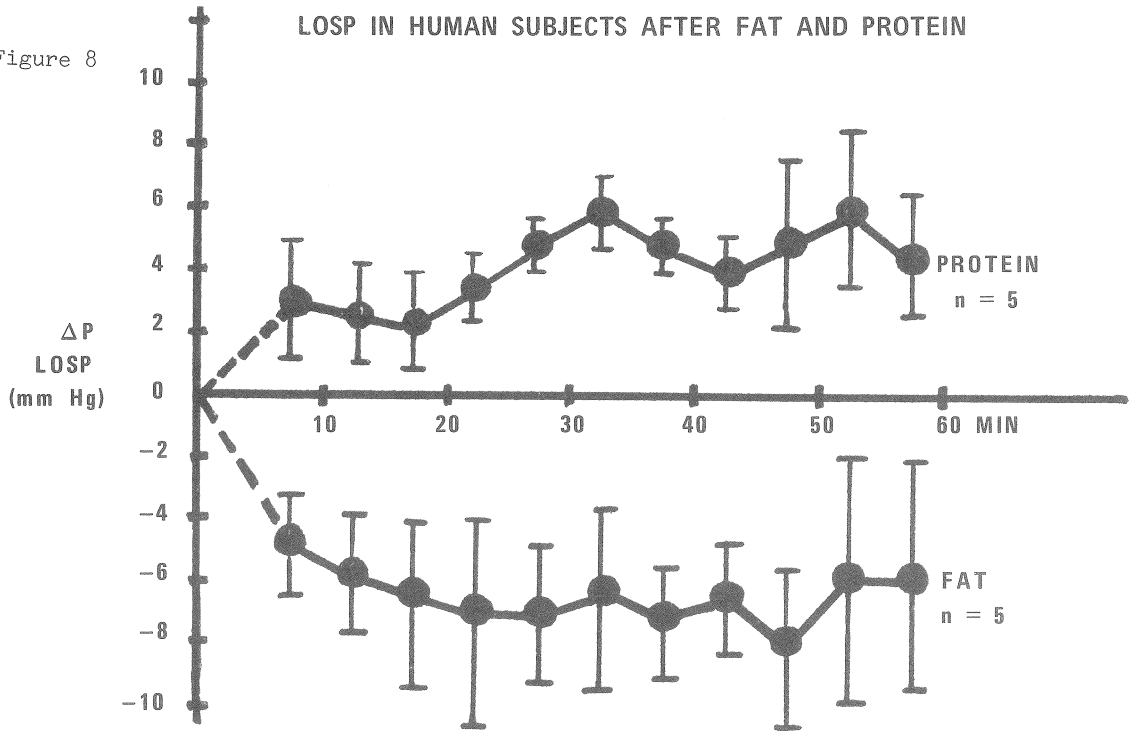


Figure 8



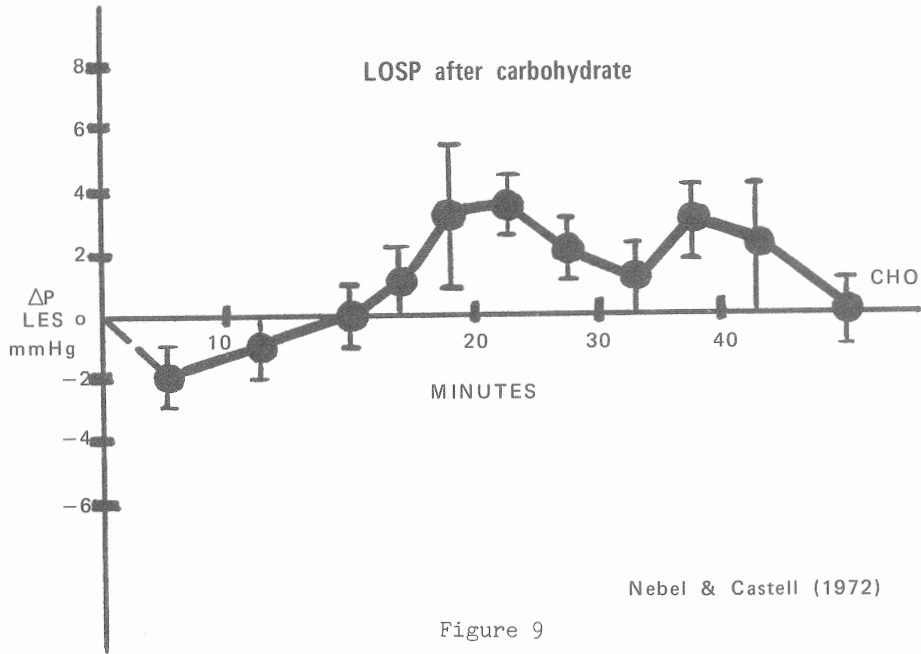


Figure 9

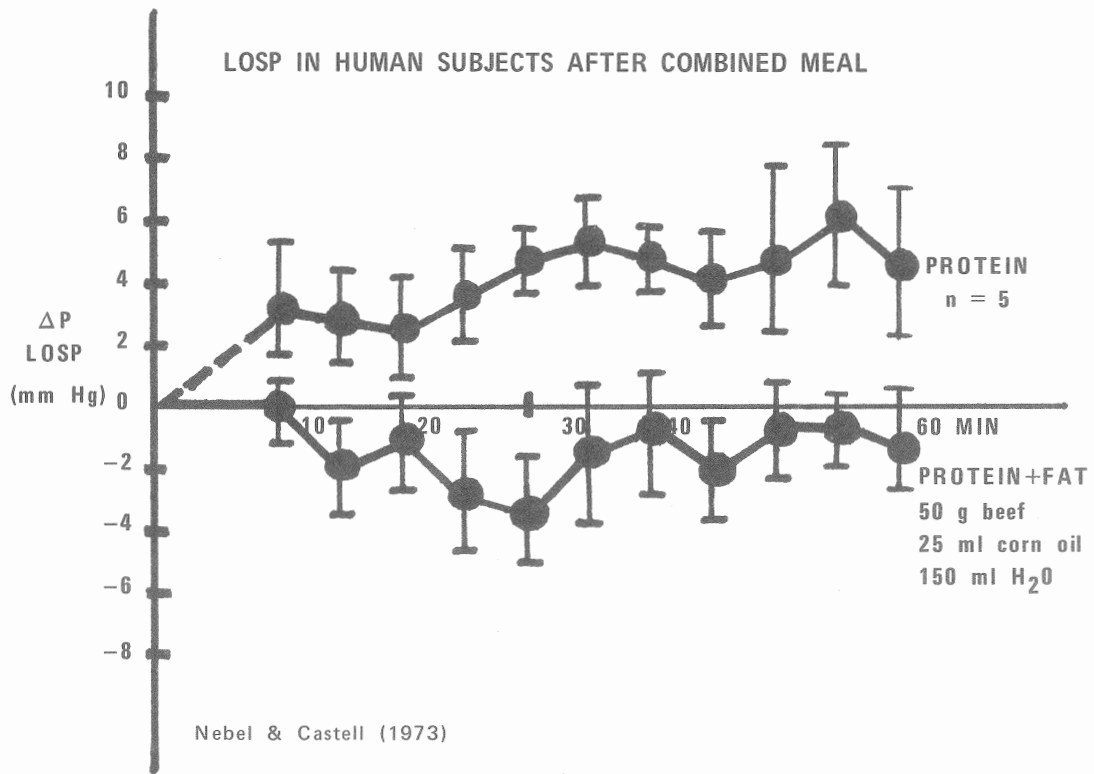


Figure 10

DESIGN

1. Fasting and after coffee with milk
2. Fasting and after coffee alone
3. Following a standard meal alone
4. Following a standard meal and after coffee and milk
5. Following a standard meal and after coffee alone.

Figure11

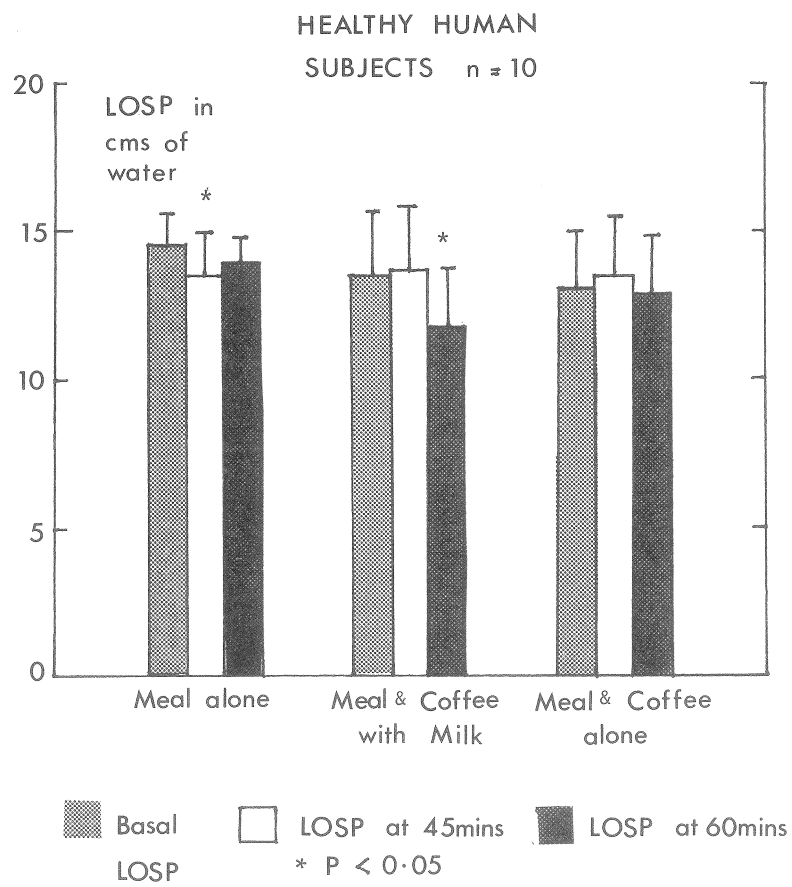


Figure12

RECENT DEVELOPMENTS IN THE SCIENCE AND TECHNOLOGY OF COFFEE



R. F. SMITH

350 Dereham road

Norwich, Norfolk NR2 4DL

Great-Britain

INTRODUCTION

I must first thank the organizers of this Colloquium for inviting me to present yet another review on the latest publications on the chemistry and technology of coffee. This is the sixth occasion on which I have presented such a report, in this case covering the 2 1/2 years since the eighth Colloquium in Abidjan in 1977. As usual my sources of information are either the original Journals, Chemical Abstracts or other Abstract Journals. In the cases where the originals were not readily available I have included the abstract references in the bibliography. The language of the original paper is included if it is not English.

It is always difficult to give a connected account of papers reviewed on such a variety of topics, but I have endeavoured to link them together under the headings upon which the programme of this Colloquium is based namely : raw coffee, effects of roasting, roasted coffee, aroma, the beverage (including the physiological effects of its constituents), instant coffee and methods of analysis. The patent references may not be complete, but it is hoped that they will give an indication of recent trends in technological development.

RAW COFFEE

To start with, there have been general accounts on the cultivation of coffee and manufacture of ground and instant coffee (1) and on the effects of cultivation conditions on quality (2), and an account by René Coste on the development of the Arabusta hybrid in the Ivory Coast (3) as reported at the Abidjan Colloquium. There have also been reports on the effects on growth and composition by the application of ethylene (4-6) or ethrel (7,8) as ripening agent, an account on the control of pests (9) and reports on residues of various pesticides (10-13).

As regards raw bean treatment, new drying processes have been described (14,15) and changes in water content during storage studied (16,17). Changes in acid value of extracted lipids in relation to changes in taste during storage have also been studied (18,19). Irradiation of coffee beans as a pest control is reported to have no significant effect on aroma and taste (20). The effect of steam treatment (Lendrich process) on the acceptability of the

beverage and on phenolic components have been studied (21). Notes on coffee workers' respiratory disease (22,228) and the extraction and analysis of the allergens from green beans (70) should be mentioned here. Treatment of raw or roasted coffee beans with polyphenol oxidase is claimed to improve the colour (P87).

With regard to raw bean composition, there have been reports on the contents of carbohydrates (23) and chlorogenic acids (24), also on the formation of depsides of quinic acid in the leaves (25) and flowers (26). The sterol contents of coffee oil have been investigated (27). A procedure for the removal of chlorogenic acid with an anion-exchanger has been proposed (28). Polyamines, as probable precursors of coffee flavour (29), sialic acid (N-acetylneuraminic acid) (30) and a new tetramethyluric acid (31,32) (an efficient solubiliser for polycyclic hydrocarbons) have been identified in coffee. The vitamin B₆ (pyridoxine) content of Brazilian coffee fruit (33) and the effects of various enzyme activities on beverage quality (34) have been studied. The mercury, arsenic, cadmium and lead contents of raw coffee have been investigated (35).

There has been a literature review on mycotoxins in food products (including coffee) (36) and reports on the possibility of formation of aflatoxins in green beans (37-39). There has been continued interest in the presence in coffee of atractylosides (diterpene glycosides) (40-43) first reported at the time of the Hamburg Colloquium, and on their determination (44). There have been further reports on the presence of carboxy-5-hydroxytryptamides (C-5-HT) in the waxy layer of raw coffee beans (45) and treatments for their elimination (46,47,P1,P2).

There have been reports on the biosynthesis of caffeine in the coffee plant (48,49) and on the use of tissue culture in research on caffeine formation (50,51). Diffusion phenomena (52) and liquid - liquid extraction (53) in the decaffeination process have been studied, and there have been still more processes patented for the decaffeination of green coffee. These include extraction with a water solution of coffee solubles (P3,P4), with organic solvents (P5-P8), with solvents at high pressure (P9), with super-critical gases (P10-P14) or with plant or animal oil (P15), by adsorption onto a polymeric resin (P16-P19), onto active carbon (P20) or onto woody material, e.g. carob pods (P21) or by diffusion from an extract through a membrane (P22). Improved flavour is claimed by drying decaffeinated beans by radio-frequency heating (P23) or by blending high-grade coffee with decaffeinated Robusta coffee (P24).

Considerable attention has been applied to the composition (54,55), treatment (56-59), and utilisation of coffee pulp wastes (60,61), in particular for the feeding of ruminants (62-66) and swine (67-69) and for conversion of husks into an organic fertiliser (P25) or into charcoal (226). An antioxidant action of green coffee bean oil is claimed (P26).

ROASTING

There have been general accounts on coffee processing (71,72) and reports on changes in quality during processing (73-75) and on the control of roasting by measurement of the humidity index (76) or the absorbance of decoctions (77).

Accounts have been given of the roasting of coffee on a fluidised bed (78,79) and an interesting report that the major organic constituent of the particulate matter of the air of New-York is caffeine from coffee roasting plants in the city (80). Claims have been made for improvements to coffee in the roasting and grinding process (81,P27-P29), for the removal of absorbed gases, e.g. carbon dioxide (P30) and for the inhibition of oxidation by coating beans with sodium sorbate (P31).

Studies have been reported on changes in the chemical composition of Arabica and Robusta coffees during roasting (82,83) and on changes in sucrose (84) and monosaccharide (85) contents, also on the formation of carboxylic acids (86,87), on the pyrolysis products of chlorogenic acid (88) and on the formation of brown pigments (89), also on changes in carbohydrates during the roasting of coffee substitutes (90). The effects of roasting on residues of the pesticides lindane (γ -HCH) and endosulfan are reported (91).

ROASTED COFFEE

Studies on composition, in addition to those recorded above under the heading "roasting", cover caffeine (204), organic acids (92), brown pigments (93) and copper contents of the roasted coffee and the beverage (94). Roast coffee designated "non-irritant" has \approx 70 % of the C-5-HTs removed then it is steam-treated to reduce the oil content (47) ; the C-5-HT and chlorogenic acid contents are used as an indication of irritant level.

Packaging is covered by reports on the maintenance of quality during handling prior to packing (95) and the use of "valve packaging" to prevent the entry of oxygen (96). Claims have been made for a vacuum-packaging process (P32), the use of containers internally coated with an aroma solvent (P33) and of laminated materials as containers (for beverages) (P34), and means of preventing oxidation by eliminating carbon dioxide and packing in an oxygen-free atmosphere (P35).

There have been reports on changes in coffee quality during storage (97-99) and a note on the formation of caffeine "whiskers" on coffee granules (100). Changes in aroma components during staling (101,102) have been studied, and the use of the 2-methylfuran/2-butanone ratio as a measure of staling was proposed (96,103,104). There have been reports on coffee substitutes, including roasted guarana (105,106) and chicory root (107), and patents covering the use of roasted chicory (P36-P38), cereals and chicory (P39) and caramelised sugars (P40) as coffee substitutes. The mineral compositions of substitutes made from cereal grains as a dietary source of trace elements have been studied (108).

AROMA

Further general accounts have been given by Vitzthum and co-workers on coffee aroma analysis (109,110), in addition to those on methods of analysis including head-space GLC (gas - liquid chromatography) techniques (111,112), combined head-space - adsorption - extraction (113) and extraction (114) techniques. Specialised studies have been made on sulphur-containing compounds (115), volatile phenols (116) and dihydroxyphenols (117) and pyrazines (118), and on the formation of aldehydes from the corresponding amino-acids (119). Reviews on the flavour chemistry of coffee, cacao and tea have been presented by Reymond (120,121). The development of aroma substitutes for natural coffee has been reported (122), and there are Japanese patents for various processes for the development of coffee-flavouring agents (P41-P43). New flavour components of roasted chicory (123) and roasted barley, used in brewing (124), have been identified.

COFFEE BEVERAGE

There have been reports on the brewing of coffee in restaurants (125), on the production of high-quality coffee (126), on the influence of storage conditions of the coffee on the quality of the beverage (127) and on the caffeine content of the beverage in comparison with that of tea and other beverages (128).

Thresholds for the identification of the odour (129) and the bitter taste (130) of coffee have been studied. The use of fructose - saccharin mixtures in place of sucrose for sweetening (131) and the synergism of fructose or xylitol and saccharin mixtures (132) have also been studied. The influence of the application of fungicides to coffee on the quality of the beverage has been discussed (133).

The *o*-diphenols (e.g. chlorogenic acids) in coffee are reported to have an anti-thiamine effect (134,135), and some phenolic constituents identified in an ether extract of the beverage are reported to have emetic properties (114). The fluoride intake from coffee has been compared with that of tea (136), and coffee is recommended as a low-calorie vehicle for fortification of the diet with iron (137).

PHYSIOLOGICAL EFFECTS

There has been continued interest, since the 1975 Colloquium in Hamburg, in the beneficial and possible harmful effects to health of coffee consumption, including reviews by Czok (138) and others in relation to its most important constituent, caffeine (139-143). The avoidance of an excessive consumption of coffee has been stressed (204,231). There have been studies on the effects of caffeine on sleep disturbance (144), on exercise performance (145,146) and on the treatment of hyperactive children (147), and on foods as carriers of biologically active substances, including caffeine (148). The stimulating effect of caffeine is claimed in patents to be antagonised by substituted pyridines, including nicotinic acid alone (P44,P45) or in conjunction with a dipeptide L-aspartyl-L-phenylalanine (P48-P50). Caffeine intake (mainly from tea) and potential effects on the health of a segment of North Carolina population have been studied (149) and a case of a fatal ingestion of a large dose of caffeine has been reported (150).

Other reports deal with the mutagenic (151,152) and teratogenic (153) effects of coffee, a cause of allergy and migraine (154), effects on schizophrenic subjects (161) and on oesophageal pressure and serum gastrin (155). Steam treatment of raw coffee (Lendrich process) is reported to reduce the emetic effect, as a result of the reduction in the contents of certain phenolic constituents (21). The metabolism of chlorogenic acid in the gastrointestinal tract has been studied (156).

Other physiological actions come under the headings of cardiovascular effects (157-162,227) and cancer (163), in particular bladder cancer (164,165,229). It is observed that among the Mormon population, who have a low intake of coffee, tea and alcohol (166), there is a lower incidence of cancer and a lower total mortality than in other groups of adults (167). A further report on a two-year feeding study on rats shows that variables in the manufacture of instant coffee had no significant influence on the incidence and type of neoplasm (168). Incidentally certain chloroethanes are now treated in the U.S.A. as carcinogenic (169) which precludes their use for decaffeination of coffee. The combined effects of coffee drinking, alcohol consumption and smoking have been studied (170-175,230) in relation to health; any adverse effects do not appear to be caused by coffee alone.

INSTANT COFFEE

By far the greatest technological improvements have been in this field. First there are general accounts on the production of instant coffee (176-180). Reports have been published on the extractable polysaccharides in coffee for instant coffee manufacture (181,182) and on free fatty acids (183) and niacin (184) in instant coffee.

Numerous patents have been granted for instant coffee manufacturing processes; those that follow may not be complete, but are representative of recent developments. They comprise: percolation processes (P51-P56), extraction of flavour components (P57) and incorporation of the powder in molten sorbitol to improve solubility and prevent feathering of cream (P58). Freeze-drying is covered by two reports (185,186) and claims for improved flavour and aroma of freeze-dried products (187,P59).

Effects of processing on aroma losses have been studied (188) and numerous claims have been made for processes of flavour improvement, e.g. by isolation and incorporation of aroma concentrates (P60-P62), by fixation of the aroma on a water-soluble carbohydrate (P63) or on a glyceride, e.g. coffee oil (P64-P71), and by extraction with a solvent (P73), addition of a concentrate obtained from spent coffee grounds (P74) and for enclosing a cellulose film impregnated with aromatised coffee oil in jars of instant coffee (P75). Further flavouring agents, based upon pyridine compounds, have been patented by Firmenich (P76-P78), and according to a claim by General Foods a new alcohol, 8-methylnon-2-ynol, is useful for enhancing the coffee flavour of foodstuffs (P79).

Claims have been made for processes for decaffeination of instant coffee, by means of extraction with an organic solvent (189,P80) or with a vegetable oil (P81), also for partial decaffeination by combining fully and partially decaffeinated extracts (P82,P83).

Studies have been made of the effects of the freeze-drying process (190) and packing materials and storage conditions on the quality of instant coffee (191,192), on moisture absorption isotherms (192) and changes in chemical composition during storage (194). There are claims for preventing agglomeration of powdered foods, e.g. instant coffee (P84) and for the addition of a chelating agent to prevent discoloration of iron-fortified soluble coffee (P85, P86).

Possible uses for spent coffee grounds (195), such as those from instant coffee manufacture, and their use for the feeding of ruminants (196,197) have been studied. A report from Japan claims that fermenting coffee grounds can be used as a repellent for field mice and rabbits, or as a mud bath for the cure of various ailments (198). The extraction of brown pigments from coffee grounds (199) and a process for the removal of colour from waste water with active carbon (200) have been reported.

ANALYSIS

A British Standard (ISO) has been issued for a method for the determination of water in green coffee (201). A simple method for the routine determination of chlorogenic acid with a periodate reagent has been published (24). The largest number of papers in this section, however, are on the determination of caffeine and other methylxanthines. These include a simple gravimetric teaching method (202), spectrophotometric methods (203-205), including an automated technique (206), and the use of TLC (thin-layer chromatography) (207), GLC for the analysis of crude caffeine (208) and HPLC (high-performance liquid chromatography) for the determination of caffeine in foods (209), HPLC for the determination of caffeine and trigonelline (210) and for caffeine and other methylxanthines (211). Methods have also been published for the determination of caffeine and quinine in non-alcoholic beverages (212,213), for the GLC determination of caffeine in cola beverages (214), for the voltammetric determination of caffeine in beverages (215) and liquid chromatographic determination of caffeine in black tea infusions.

The C-5-HTs have been determined by HPLC (217,218) and by spectrophotometry with use of Gibbs reagent (219), and a method for the extraction and determination of diterpene glycosides has been described (44). Coffee has been found to interfere with the Duquenois test for marijuana with vanillin and metaldehyde (220).

Methods have also been published for the determination of coffee in mixtures with substitutes (221, 222), also for the determination of nicotine in contaminated coffee (223,224) and for the determination of the defoaming agent dimethylpolysiloxane in instant coffee (225). Methods used for the determination of mercury, arsenic, copper and lead in raw coffee have been reported (35).

CONCLUSIONS

I will finish with a brief summary of the progress that has been made in the 14 or so years covered by my six reviews. In this time the number of references (including patents) has risen from 122 in 1969 to 327 in the present year. A considerable amount of work has been published on the major constituents of the raw beans, including the chlorogenic acids, the lipids (including steroids) and the cell-wall polysaccharides. Some minor undesirable constituents of raw beans have been discovered, such as the carboxylic acid 5-hydroxytryptamides; their elimination is reported to improve the acceptability of the beverage. In addition bitter diterpene glycosides (atractylosides) have been discovered. The possible presence of the mycotoxins ochratoxin and aflatoxin has been investigated, but they have been found only in mouldy beans, which can be avoided by care in the processing, and the toxins are apparently largely destroyed by roasting. A considerable amount of work has been done on possible uses for coffee pulp waste, including use in fertilisers and (in limited amounts) for the feeding of swine and ruminants.

The effects of roasting on the constituents of raw beans, the polysaccharides in particular, have been fully investigated. The composition of roasted coffee is not so well known as that of raw coffee, the products of roasting including products of the Maillard reaction and ill-defined "brown pigments". Factors that affect the beverage quality have been examined, and in recent years there has been a considerable amount of interest in the possible adverse effects of coffee drinking. Possible carcinogenic effects of polynuclear hydrocarbons, and cardiovascular mutagenic and teratogenic effects have been examined, but it is generally considered that, in moderation, coffee can cause no serious harm, apart from possible over-stimulation by caffeine in large doses.

The major advances in coffee technology have been made in the field of instant coffee, where considerable improvements in acceptability have been achieved as a result of the introduction of the freeze-drying process, associated with aroma improvement by the incorporation of aroma concentrates obtained by trapping roaster and grinder gases. Agglomeration processes have been developed as a means of disposal of the fines produced by spray-drying and of production of a granular product. The problem of the disposal of the large amount of spent grounds from instant coffee manufacture is still with us and, apart from incineration or using them to fill in large holes in the ground, they can be used (only in limited amounts) for the feeding of swine and ruminants. A partial solution, for us, is the development of instant coffee plants in the producing countries, so avoiding the importation of the large amounts of waste material. In recent years with the increase in world prices of coffee there has been a renewed interest in the use of substitutes in ground coffee mixtures and for incorporation in instant beverages. This has necessitated the development of new methods of analysis of admixtures.

The advances in coffee research in recent years are to a large extent a result of the application of newer techniques, such as spectrophotometry, TLC, GLC and more recently HPLC, and their use in the development of automated techniques. It is the use of the modern techniques in aroma analysis that the number of volatile compounds that have identified now totals more than 500. However, the intrinsic flavour of coffee has yet to be established, although it appears that nitrogen and sulphur compounds have pronounced effects on aroma. The results of this aroma research have been applied to the objective evaluation of coffee by the GLC determination of flavour profiles, used in conjunction with, but not yet replacing subjective flavour evaluation.

BIBLIOGRAPHY

Raw Coffee

1. Stefanucci, A., Clinton, W.P. and Hamell, M.- Coffee. Kirk-Othmer Encycl. Chem. Technol., 3rd Ed., 1979, 6, 511-522.
2. Gopal, N.H. and D'Souza, G.I.- Some aspects of quality of Indian Coffee. Indian Coffee, 1977, 41 (1), 14-16.
3. Coste, R.- Improving the coffee shrub in West Africa. Food Chem., 1979, 4 (1), 7-11.
4. Rao, S.S., Venkataramanan, D. and Ro, K.N.- Changes in fruit growth and pectic content in Coffea canephora (Robusta) in relation to the exogenous application of ethylene. Z. Pflanzenphysiol., 1977, 83 (5), 459-461.
5. Sudhakara Rao, G., Venkataramanan, D., Partha, T.S. and Rao, K.N.- Ethylene-induced changes in the chemical composition of coffee mucilage. Turrialba, 1978, 28 (2), 153-155 ; Chem. Abstr., 1979, 90, 49051q.
6. Sudhakara, Rao G.- Stimulation of bean growth in coffee by exogenous application of ethylene. Turrialba, 1978, 28 (2), 157-158 ; Chem. Abstr., 1979, 90, 49052r.
7. Clowes, M. St. J.- Effects of ethrel on ripening Coffea arabica L. fruits at different stages of maturity. Rhod. J. Agric. Res., 1977, 15 (1), 79-88 ; Chem. Abstr., 1977, 87, 128688u.

8. Gopal, N.H. and Ventkataramanan, D.- Effect of ethrel on carbohydrate fraction of Coffea arabica L. fruits. Turrialba, 1977, 27 (1), 101-103 ; Chem. Abstr., 1977, 87, 97235n.
9. Bardner, R.- Pest control in coffee. Pestic.Sci., 1978, 9 (5), 458-464.
10. Ribas, C., Pigati, P., Guindani, C.M.A. and Dias Netto, N.- Effect of the period of application on lindane residues in coffee beans. Arg. Inst. Biol., São Paulo, 1976, 43 (3-4), 121-123 (Portuguese) ; Chem. Abstr., 1978, 88, 49111t.
11. Anon. (EPA, Washington, D.C.).- Fed. Regist., 25 Jan. 1979, 44 (18), 5136 ; Chem. Abstr., 1979, 90, 136358p. Glyphosate (N-(phosphonomethyl)glycine) tolerances for residues.
12. Anon. (EPA, Washington, D.C.).- Fed. Regist., 25 Dec. 1978, 43 (250), 60465-6 ; Chem. Abstr., 1979, 90, 202319e. Aldicarb tolerance for residues.
13. Mithyantha, M.S. and Agnibothrudu, V.- Carbofuran residues in coffee beans. Comments. J. Coffee Res., 1978, 7 (3), 84-85 ; Chem. Abstr., 1978, 89, 174694g.
14. Anon.- Coffee dryer. Coffee Int., 1978, 5 (6), 7.
15. Bal'e Matos, M., Sul'g, E.O., Rashkovskaya, N.B., Romakov, P.G. and Prokhorovskii, E.S.- Use of kinetic process for drying coffee beans with an oscillating regime with an agitated layer. Zh. Prikl. Khim., 1978, 51 (11), 2496-2500 (Russian) ; Ref. Zh. Khim., 1979, 4R315.
16. Muriithi, G.K.- Comparative study of temperature and relative humidities in the coffee storage units for parchment and clean coffees, i.e. modified stores at Dandora and Kahawa House. Kenya Coffee, 1978, 43 (507-508), 193-200 ; Trop. Storage Abstr., 1978, (3), 36.
17. Jordao, B.A., Faber, de F. L.M.- Production of tables for the determination of the gain in weight of green coffee and other grains caused by absorption of water. Bol. Inst. Tecnol. Alim., 1977, (51), 45-71 (Portuguese) ; Ref. Zh. Khim., 1978, 8R68.
18. Wajda, P. and Walczyk, D.- Relationship between acid value of extracted fatty matter and age of green coffee beans (Arabica). J. Sci. Food Agric., 1978, 29 (4), 377-380.
19. Hara, S., Okamoto, S. and Totani, Y.- Lipid constituents of coffee beans and their denaturation. Seikei Daigaku Kogakubu Kogaku Hokoku, 1979, 27, 1895-1903 (Japanese) ; Chem. Abstr., 1979, 91, 18551u.
20. Dias, M., Loaharamu, S. and Vokac, L.- Changes in flavour and taste of irradiated coffee beans. Food Preserve Irrad., Vol. 1, Vienna, 1978, 539-543 ; Ref. Zh. Khim., 1978, 22R355.
21. Rahn, W., Meyer, H.-W. and Koenig, W.A.- Effect of steam treatment on the composition of the phenolic components of green and roasted coffee. Z. Lebensm.-Unters. Forsch., 1979, 169 (5), 346-349.
22. Karr, R.M., Lehrer, S.B., Butcher, B.T. and Savvaggio, J.E.- Coffee worker's asthma. Clinical appraisal using the radioallergosorbent test. J. Allergy Clin. Immunol., 1978, 62 (3), 143-148 ; Biol. Abstr., 1979, 67, 13098.
23. Rotenberg, B. and Iachan, A.- Chemical study of coffee. I. Carbohydrates. Inf. INT, 1976, 9 (13), 20-23 (Portuguese) ; Chem. Abstr., 1978, 88, 103493j.
24. Clifford, M.N.- Chlorogenic acids ; their complex nature and routine determination in coffee beans. Food Chem., 1979, 4 (1), 63-71.
25. Colonna, J.P.- Formation of a "depside - caffeine" complex during the cold preservation of coffee leaf samples in a hydro-ethanolic medium. Methodological implications in depside extraction procedures. C.R. Hebd. Séances Acad. Sci., Sér. D, 1977, 285 (3), 253-256, (French).
26. Colonna, J.P.- Distribution of the depsides of quinic acid in the various parts of the flowers of certain kinds of coffee trees : suggested role of reserve substances. C.R. Hebd. Séances Acad. Sci., Sér. D., 1978, 286 (17), 1265-1267 (French).

27. Tiscornia, E., Conti-Grossi, M., Tassi-Micco, C. and Evangelisti, F.- Sterol fraction of the oil extracted from coffee (*Coffea arabica*) seeds. Riv. Ital. Sostanze Grasse, 1979, 56 (8), 283-292 (Italian).
28. Anon.- Chlorogenic acid extraction. Res. Disc., 1978, 170, 51 ; Chem. Abstr., 1978, 89, 88927d.
29. Amorim, H.V., Basso, L.C., Crocomo, O.J. and Teixeira, A.A.- Polyamines in green and roasted coffee. J. Agric. Food Chem., 1977, 25 (4), 957-958.
30. Jennings, A.C.- Sialic acid in plant tissues. J. Sci. Food Agric., 1978, 29, 930-934.
31. Petermann, A.C., Baumann, T.W. and Wanner, H.- New tetramethyluric acid from *Coffea liberica* and *C. Dewevrei*. Phytochemistry, 1977, 16 (5), 620-621.
32. Kihlman, B.A.- 1,3,7,9-Tetramethyluric acid : a chromosome-damaging agent occurring as a natural metabolite in certain caffeine-producing plants. Mutat. Res., 1977, 39 (314), 297-316 ; Biol. Abstr., 1978, 65, 58691.
33. De Oliveira, E.N.S., De Oliveira, E.B. and Marita, M.M.- Vitamin B₆ (pyridoxine) content of Brazilian coffee. Acta Biol. Parana, 1977, 5 (3-4), 121-128 (Portuguese) ; Chem. Abstr., 1978, 88, 188424k.
34. De Oliveira, L.C., Silva, D.M., Teixeira, A.A. and Amorim, H.V.- Enzymic activity of polyphenoloxidase, peroxidase and catalase in beans of *Coffea arabica* L. related to the beverage quality.
35. Lautenschlaeger, W. and Maasen, J.- Determination of mercury, arsenic, copper and lead in the µg/kg region in an organic matrix. GIT Fachz. Lab., 1979, 23 (3), 176, 178-179 (German) ; Chem. Abstr., 1979, 90, 185023.
36. Kravchenko, L.V.- Mycotoxins in food products : literature review. Vopr. Pitan., 1978, (2), 3-12 (Russian) ; Biol. Abstr., 1979, 67, 12706.
37. Buchanan, R.L. and Fletcher, A.M.- Methylxanthine inhibition of aflatoxin production. J. Food Sci., 1978, 43 (2), 654-655.
38. Haberle, V., Balenovic, J. and Briski, B.- Aflatoxin content of imported peanuts, coffee, barley, wheat and walnuts. Hrana Ishrana, 1978, 19 (9-10), 451-460 (Serbo-Croat) ; Chem. Abstr., 1979, 90, 185047v.
39. Nartowicz, V.B., Buchanan, R.L. and Segall, S.- Aflatoxin production in regular and decaffeinated coffee beans. J. Food Sci., 1979, 44 (2), 446-448.
40. Dbetto, P.- Plants recently found to contain atractylosides. Atractylosides Chem. Biochem. Toxicol., 1978, 125-129 ; Chem. Abstr., 1979, 91, 154246a.
41. Richter, H. and Spitteller, G.- New atractyligenin glycoside from green coffee beans. Chem. Ber., 1978, 111 (10), 3506-3509 (German) ; Chem. Abstr., 1979, 90, 19037x.
42. Richter, H. and Spitteller, G.- A new furokaurane from green coffee beans. Chem. Ber., 1979, 112 (4), 1088-1092 (German) ; Chem. Abstr., 1979, 91, 74837d.
43. Wurziger, J.- Diterpenes in coffee oils for the evaluation of raw coffee according to type and processing. Fette, Seifen, Anstrichm., 1977, 79 (8), 334-339 (German).
44. Maier, H.G. and Wewetzer, H.- Determination of diterpene glycosides in coffee. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 1978, 167 (2), 105-107 (German).
45. Van der Stegen, G. and Noomen, P.J.- Mass balance of carboxy-5-hydroxytryptamides (C-5-HT) in regular and treated coffees. Lebensm.- Wiss. Technol., 1977, 10 (6), 321-323.
46. Van der Stegen, G.H.D.- Effect of dewaxing of green coffee on the coffee brew. Food Chem., 1979, 4 (1), 23-29.
47. Wurziger, J.- Study and evaluation of processed green and roasted coffee. Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem., 1979, 33 (4), 83-84 (German).

48. Roberts, M.F. and Waller, G.R.- N-methyltransferase and 7-methyl-N⁹-nucleosidase activity in Coffea arabica and the biosynthesis of caffeine. Phytochemistry, 1979, 18 (3), 451-455.
49. Baumann, T.W., Dupont-Looser, E. and Wanner, H.- 7-methylxanthosine : an intermediate in caffeine biosynthesis. Phytochemistry, 1978, 17, 2075-2076.
50. Frischknecht, P.M., Baumann, T.W. and Wanner, H.- Tissue culture of Coffea arabica growth and caffeine formation. Planta Med., 1977, 31 (4), 344-350 ; Chem. Abstr., 1979, 90, 69169n.
51. Sondahl, M.R.- I. - Cell culture of Coffea spp. and its applications in research. Diss. Abstr. Int. B., 1978, 39 (2), 465-466 ; Chem. Abstr., 1978, 89, 176471f.
52. Bichsel, B.- Diffusion phenomena during the decaffeination of coffee beans. Food Chem., 1979, 4 (1), 53-62.
53. Escardino, A., Monzo, M. and Costa, J.M.- Liquid-liquid equilibrium in the system water - caffeine - trichloroethylene. Rev. Agroquim. Technol. Aliment., 1977, (3), 372-382 (Spanish) ; Chem. Abstr., 1978, 168655h.
54. Elias, L.G.- Chemical composition of coffee-berry by-products. Int. Dev. Res. Cent. (Tech. Rep.) IDRC, 1979, IDRC-108e, Coffee Pulp, 11-16, 89-95 ; Chem. Abstr., 1980, 92, 18721v.
55. Book. Coffee pulp : composition, technology and utilization. Braham, J.E. and Bressani, R., Editors ; Chem. Abstr., 1980, 92, 4955u.
56. Murillo, B., Tulio Cabezas, M., Jarquin, R. and Bressani, R.- Effect of bisulphite addition on the chemical composition and cellular content fractions of hydrated coffee pulp. J. Agric. Food Chem., 1977, 25 (5), 1090-1092.
57. Gomes Brenes, R.A.- Processing of coffee pulp : chemical treatments. Int. Dev. Res. Cent. (Tech. Rep.) IDRC, 1979, IDRC-108e, Coffee Pulp, 71-81, 89-95 ; Chem. Abstr., 1980, 92, 3132e.
58. Rolz, C.- Production of renewable product biomasses. I. Isolation of juice from coffee pulp. Inf. Tec. ICATI, 1978, 78-118, 58 pp. (Spanish) ; Chem. Abstr., 1980, 92, 40066g.
59. Murillo, B.- Coffee-pulp silage. Int. Dev. Res. Cent. (Tech. Rep.) IDRC, 1979, IDRC-108e, Coffee Pulp, 55-61, 89-95 ; Chem. Abstr., 1980, 92, 4754w.
60. Bressani, R.- Potential uses of coffee-berry by-products. Int. Dev. Res. Cent. (Tech. Rep.) IDRC, 1979, IDRC-108e, Coffee Pulp, 17-24, 89-95 ; Chem. Abstr., 1980, 92, 3132e.
61. Rolz, C.- Utilization of solid wastes : specific problems in developing countries. Inter-ciencia, 1978, 3 (3), 160-171 (Spanish) ; Biol. Abstr., 1978, 66, 64574.
62. Cabezas, M.T., Vargas, V.E., Murillo, B. and Bressani, R.- Utilization of coffee fruit without seeds (coffee pulp) in ruminant feeding. Int. Symp. Feed Compos., Anim. Nutr. Requir., Comput. Diets, (Proc.), Ist., 1976 (Publ. 1977), 112-117 ; Chem. Abstr., 1979, 91, 90071c.
63. Vargas, E., Cabezas, M.T. and Bressani, R.- Coffee pulp in the feeding of ruminants. I. In vivo digestibility of pulp. Agron. Costaric., 1977, 1 (1), 51-56 (Spanish) ; Chem. Abstr., 1977, 87, 101013h.
64. Vargas, E., Cabezas, M.T. and Bressani, R.- Coffee pulp in the feeding of ruminants. II. Absorption and retention of nitrogen in steers fed dehydrated coffee-pulp-containing concentrates. Agron. Costaric., 1977, 1 (2), 101-106 (Spanish) ; Chem. Abstr., 1978, 88, 49437d.
65. Cabezas, M.T., Estrada, E., Murillo, B., Gonzales, J.M. and Bressani, R.- Response of calves to coffee pulp, caffeine and tannic acid in rations. Mem. Asoc. Latinoam. Prod. Anim., 1977, 12, 15-21 (Spanish) ; Chem. Abstr., 1978, 89, 18110h.
66. Cabezas, M.T., Flores, A. and Egana, J.I.- Use of coffee pulp in ruminant feeding. Int. Dev. Res. Cent. (Tech. Rep.) IDRC, 1979, IDRC-108e, Coffee Pulp, 25-38, 89-95 ; Chem. Abstr., 1980, 92, 5005g.

67. Jarquin, R. and Bressani, R.- Chemical characteristics of coffee fruit without seeds (coffee pulp) and its use in swine feeding. Int. Symp. Feed Compos., Anim. Nutr. Requir., Comput. Diets, (Proc.), Ist., 1976 (Publ. 1977), 105-111 ; Chem. Abstr., 1979, 91, 90070d.
68. Jarquin, R. and Bressani, R.- Nutritional evaluation, inswine, of coffee pulp under different storage conditions. Turrialba, 1977, 27 (4), 385-391 (Spanish) ; Chem. Abstr., 1979, 91, 37937r.
69. Jarquin, R.- Coffee pulp in swine feeding. Int. Dev. Res. Cent., Tech. Rep. IDRC, 1979, IDRC-108e, Coffee Pulp, 39-49, 89-95 ; Chem. Abstr., 1980, 92, 5006r.
70. Karr, R.M., Lehrer, S.B., Butcher, B.T. and Savvaggio, J.E.- Extraction and analysis of coffee bean allergens. Clin. Allergy, 1978, 8 (3), 217-226 ; Biol. Abstr., 1979, 67, 13082.

Roasting

71. Anon.- Processing of coffee. Indian Coffee, 1976, 40 (9), 266-270.
72. Sivetz, M., Desrosier, N.W.- Coffee technology with reference to the physical and chemical aspects of coffee. Book - Avi Publishing Co., Inc., Westport, Conn., 1979, 716 pp.
73. Szczepanik, Z.R.- Quality analysis of the roasting process, automatic packing and storage of coffee. Lebensm.-Ind., 1978, 35 (7), 315 (German).
74. Anon.- Americans still value coffee habit event at historically unprecedented prices. Canner/Packer, 1977, 146 (5), 37-41.
75. Miller, P.- Determination of the quality of the roasting of coffee with help of the method of approximation. Lebensm.-Ind., 1978, 25 (7), 318 (German).
76. Doreszewicz, S.- Evaluation of the absorption of water vapour by coffee. Lebens.-Ind., 1978, 25 (7), 316 (German).
77. Barbetti, P., Fardella, G. and Chiappini, I.- Chemical and physical estimation of the degree of roasting in some coffees. Ann. Chim. (Rome), 1976, 66 (7-8), 361-369.
78. Arjona, J.L., Roche, G., Rios, G., Gibert, H. and Vincent, J.C.- Roasting of coffee in a fluidised bed. Rev. Conserve Aliment. Mod., 1977, (54), 45-51 (French).
79. Arjona, J.L., Rios, G.M., Gilbert, H. and Vincent, J.C.- Roasting of coffee in a fluidised gas bed. Rev. Conserve Aliment. Mod., 1978, (67), 75-81 (French).
80. Dong, M., Hoffmann, D., Locke, D.C. and Ferrand, E.- Occurrence of caffeine in the air of New-York City. Atmos. Environ., 1978, 11 (7), 651-653.
81. Anon.- Improved Robusta coffee. Res. Discl., 1978, 167, 6-7.
82. Choi, Min Kang, Lee, Yound Ock and Ko, Young Su.- Studies on the composition of green and roasted coffee beans. Hanguk Yongyang Hakhoe Chi, 1978, 11 (1), 9-16 (Korean) ; Chem. Abstr., 1979, 90, 53354h.
83. Solov'eva, T.Ya.- Chemical composition of African coffees. Sb. Nauch. Tr. Leningr. In-t Sov. Torg., 1976, (61), 128-130 (Russian) ; Ref. Zh., Khim., 1977, 20R334.
84. Nakabayashi, T.- Changes in the sucrose content in the coffee roasting process. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkai-shi, 1977, 24 (9), 479-483 (Japanese) ; Ref. Zh., Khim., 1978, 5R290.
85. Sabbagh, N.K., Yokomizo, Y. and Faria, J.B.- Influence of roasting on the monosaccharide contents of Arabica, Robusta and Icatu hybrid coffees. Colet. Inst. Tecnol. Aliment. (Campinas, Braz.), 1977, 8 (1), 111-130 (Portuguese) ; Chem. Abstr., 1978, 89, 89061d.
86. Nakabayashi, T.- Chemical studies on the quality of coffee. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkai-shi, 1978, 25 (3), 142-146 (Japanese) ; Chem. Abstr., 1979, 91, 106795.
87. Nakabayashi, T.- Formation of organic acids from sucrose in the coffee roasting process. Nippon Shokuhin Kyogo Gakkaishi, 1978, 25 (5), 257-261 (Japanese) ; Ref.Zh.Khim, 1979, 1R350.

88. Meissner, W. and Stopa, W.- Chromatographic study of the products of pyrolysis of chlorogenic acids. Zesz. Nauk AE Poznaniu, 1976 (1977), Ser. 1 (69), 109-112 (Polish) ; Ref. Zh. Khim., 1978, 2R309.
89. Nakabayashi, T. and Watanabe, C.- Study of the quality by chemical methods. IV. Formation of brown pigments in the process of roasting of coffee. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 1977, 24 (3), 124-129 (Japanese) ; Ref. Zh. Khim., 1977, 1R225.
90. Pazola, Z. and Cieslak, J.- Changes in carbohydrates during the production of coffee substitute extracts, especially in the roasting process. Food Chem., 1979, 4 (1), 41-52.
91. Ribas, C., Pigati, P., Ferreira, M.S. and Netto, N.D.- Effect of roasting on residues of lindane and endosulfan in coffee beans. Biologico, 1977, 43 (9-10), 208-212 (Portuguese); Chem. Abstr., 1978, 89, 74390m.

Roasted coffee

92. Solov'eva, T.Ya.- Organic acids in raw and roasted coffee. Sb. Tr. Leningr. Nauchno-Issled. Inst., 1977, (63), 65-75 (Russian) ; Ref. Zh. Khim., 1978, 15R46.
93. Barbetti, P. and Chiappini, I.- Gel-chromatography fractionation of brown pigments isolated from decoctions of several types of coffee. Ind. Bev., 1977, 6 (6), 97-99 (Italian).
94. Lara, W.H., De Toledo, M. and Takahashi, M.Y.- Copper contents of roasted and ground coffee and in coffee drink. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 1976, 35-36, 17-22 (Portuguese) ; Chem. Abstr., 1978, 88, 73226e.
95. Sobolewska, M.- Influence of passive stages on the loss of packed material in the packing of coffee. Lebensm.-Ind., 1978, 25 (7), 317-318 (German).
96. Arackal, T. and Lehmann, G.- Measurement of the quotient 2-methylfuran/2-butanone for the unground coffee during storage out of contact with air. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm., 1979, 6 (2), 43-47 (German).
97. Artem'ev, B.V. and Soldunova, V.M.- Storage life of ground coffee in various packings. Konserv. Ovoshch. Prom-sti, 1977, (3), 26-28 (Russian) ; Ref. Zh. Khim., 1977, 16R297.
98. Beer, J.- Changes in the oxidation number of natural coffee during its storage. Pr.Inst. Lab. Badaw. Przem. Spozyw., 1976, 26 (3), 329-336 (Polish) ; Chem. Abstr., 1977, 87, 166266n.
99. Ernst, U.- Organoleptic evaluation of coffee quality in various packings in relation to the time of storage. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm., 1979, 6 (1), 18-24 (German).
100. Yamada, M., Nishimura, Y. and Matsuzaki, T.- Growth behaviour and mechanism of caffeine whiskers on granules of coffee. Yakugaku Zasshi, 1976, 96 (10), 1223-1228 (Japanese); Biol. Abstr., 1978, 65, 72576.
101. Tressl, R., Grunewald, K.G., Kamperschroer, H. and Silwar, R.- Behaviour of some minor volatile aroma components during coffee staling. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm., 1979, 6 (2), 52-57 (German).
102. Noomen, P.J.- Monitoring keeping quality status of roast coffee by volatile sulphur compounds. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm., 1979, 6 (2), 48-51 (German).
103. Vitzthum, O.G. and Werkhoff, P.- Measurable changes of roasted coffee aroma in oxygen-permeable bag packs. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm., 1979, 6 (1), 25-30 (German).
104. Kwasny, H. and Werkhoff, P.- Dependences of the aroma index M/B (2-methylfuran/2-butanone) on various parameters. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm., 1979, 6 (1), 31-32 (German).
105. Tocchini, R.P., Okada, M. and Angelucci, E.- Guarana extract and its use in soft drinks. Colet. Inst. Tecnol. Aliment. (Campinas, Braz.), 1977, 8 (2), 391-407 (Portuguese) ; Chem. Abstr., 1978, 89, 89063f.

106. Okada, M., Tocchini, R.P. and Mori, E.E.M.- Study of the drying and roasting of guarana. Colet. Inst. Tecnol. Aliment. (Campinas, Braz.), 1977, 8 (2), 519-529 (Portuguese) ; Chem. Abstr., 1978, 89, 89066j.
107. Blanc, M.- The chicory root. Fructose changes during technological treatments. Lebensm.-Wiss. Technol., 1978, 11 (1), 19-22 (French).
108. Nakhmedov, F.G., Lomachinskii, V.A. and Tserevitinov, O.B.- Study of the mineral composition of rapidly dissolving beverages used as substitutes for natural coffee. Vopr. Pitan., 1978, (3), 80-82 ; Chem. Abstr., 1978, 89, 89053c.

Aroma

109. Vitzthum, O.G.- Volatile ingredients of roasted coffee. Geruchs-Geschmackstoffe, Int. Symp., 1974 (Pub. 1975), 49-64 (German) ; Chem. Abstr., 1978, 88, 73074d.
110. Vitzthum, O.G. and Werkhoff, P.- Aroma analysis of coffee, tea and cocoa by headspace techniques. Anal. Foods Beverages (Proc. Symp.), 1977 (Pub. 1978), 115-133 ; Chem. Abstr., 1978, 89, 40930x.
111. Roedel, W., Schroedter, R., Zoell, D. and Steiniger, L.- Isolation and concentration of volatile compounds in roasted coffee : comparison of methods. Nahrung, 1977, 21 (8), 719-724 (German).
112. Osijuma, Y., Shimoda, M., Iriki, E., Ito, H. and Sakane, Y.- Aroma of coffee. I. Headspace gas-chromatographic method using internal standard for determination of aroma from roast and ground coffee. Nippon Shokuhin Kagyo Gakkaishi, 1979, 26 (3), 105-110 (Japanese) ; Chem. Abstr., 1979, 91, 89667x.
113. Lee, Kwan Young, Nurok, D. and Zlatkis, A.- Combined headspace profile analysis by capillary gas chromatography. J. Chromatogr., 1978, 158, 377-386.
114. Rahn, W. and Koenig, W.A.- GC/MS investigations of the constituents in a diethyl ether extract of an acidified roast coffee infusion. HRC CC, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun., 1978, 1 (1), 69-71.
115. Nurok, D., Anderson, J.W. and Zlatkis, A.- Profiles of sulphur-containing compounds obtained from Arabica and Robusta coffees by capillary-column gas chromatography. Chromatographia, 1978, 11 (4), 188-192.
116. Tressl, R., Gruenewald, K.G., Koeppler, H. and Silwar, R.- Volatile phenols in roasted coffee of different varieties. Z. Lebensm.-Unters. Forsch., 1978, 167 (2), 108-110 (German).
117. Tressl, R., Bahri, D., Koeppler, H. and Jensen, A.- Dihydroxyphenols and caramel components in roasted coffees of different varieties. Z. Lebensm.-Unters. Forsch., 1978, 167 (2), 111-114 (German).
118. Vasundhara, T.S. and Parihar, D.B.- Studies on pyrazines in some roasted cereal flours. Z. Lebensm.-Unters. Forsch., 1979, 169 (6), 468-471 (German).
119. Motoda, S.- Formation of aldehydes from amico-acids by polyphenol oxidase. J. Ferment. Technol., 1979, 57 (5), 395-399.
120. Reymond, D.- Flavour chemistry of tea, cocoa and coffee. Agric. Food Chem. : Past, Present, Future (Pap. Am. Chem. Soc. Centen. Meet.), 1976 (Pub. 1978), 315-332.
121. Reymond, D.- Flavour chemistry - coffee, cocoa and tea. CHEMTECH, 1977, 7 (11), 664-670.
122. Andres, C.- New coffee flavours under development. Food Process, 1977, 38 (5), 56-57.
123. Kawabat, S. and Deki, M.- Flavour components of roasted coffee. Kanzei Chuo Bunsekishoho, 1977, 17, 63-71 (Japanese) ; Chem. Abstr., 1977, 87, 66760a.
124. Harding, R.J., Wren, J.J. and Nursten, H.E.- Volatile basic compounds derived from roasted barley. J. Inst. Brew., 1978, 84 (1), 41-42.

Coffee beverage

125. Anon.- How to brew coffee in restaurants and coffee houses. Indian Coffee, 1977, 41 (1), 5-13.
126. Basu, R.J., Sumalini.- Key to coffee quality. Indian Coffee, 1977, 41 (6), 213-217.
127. Teikheira, A.A., Fazuoli, L.C. and Carvalho, A.- Influence of the conditioning and time of storage on the quality of coffee beverage. Bragantia, 1977, 36 (7), 103-108 (Portuguese).
128. Bunker, M.L. and McWilliams, S.M.- Caffeine content of common beverages. J. Am. Diet. Assoc., 1978, 71 (1), 28-32.
129. Wojcik, K.- Studies on olfactory excitability in man. Ann. Univ. Mariae Curie-Sklodowska, Sect. D Med. J., 1976, 31, 207-216 (Polish) ; Biol. Abstr., 1978, 66, 30492.
130. Wojcik, K.- Threshold of taste identification in people. Ann. Univ. Mariae Curie-Sklodowska, Sect. C Biol., 1976, 31, 271-280 (Polish) ; Biol. Abstr., 1978, 66, 61113.
131. Hyvonem, L., Kurkela, R., Koivistoinen, P. and Ratilainen, A.- Sweetening of coffee and tea with fructose - saccharin mixtures. J. Food Sci., 1978, 43 (5), 1577-1579.
132. Nen, L.H., Kurkela, R., Koivistoinen, P. and Ratilainen, A.- Fructose - saccharin and xylitol - saccharin synergism. J. Food Sci., 1978, 43 (1), 251-254.
133. Alves, T.A., De Souza, D.C., Oliveira, J.C. and Pimentel, G.F.- Influence of the application of fungicides on the quality of coffee beverage. Rev. Agric. (Piracicaba, Braz.), 1977, 52 (4), 167-177 (Portuguese) ; Ref. Zh. Khim., 1978, 22R359.
134. Somogyi, J.C. and Nageli, U.- Anti-thiamine effect of coffee. Preliminary communication. Int. J. Vitam. Res., 1976, 46 (2), 149-153.
135. Somogyi, J.C. and Nageli, U.- Anti-thiamine action of coffee. Probl. Ernaer.-Lebensmittelwiss., 1977, 4, 75-80 (German) ; Chem. Abstr., 1978, 89, 145580m.
136. Vergote, G., Van Zele, W., De Clerck, F. and Heyndrikx, A.- Fluoride intake of men from beverages. Farm. Tijdschr. Belg., 1979, 56 (2), 130-134.
137. Johnson, P.E. and Evans, G.W.- Coffee as a low-calorie vehicle for iron-fortification. Nutr. Rep. Int., 1977, 16 (1), 89-92 ; Chem. Abstr., 1977, 87, 132624n.

Physiological effects

138. Czok, G.- Coffee and health. Z. Ernahrungswiss., 1977, 16 (4), 248-255 (German).
139. Anon.- Caffeine in coffee. Voeding, 1978, 39 (3), 84-88 (Dutch).
140. Graham, D.M.- Caffeine - its identity, dietary sources, intake and biological effects. Nutr. Rev., 1978, 36 (4), 97-102.
141. Timson, J.- How harmful is your daily caffeine ? New Sci., 1978, 78 (1107), 736-737.
142. Bedo, M.- Metabolism of caffeine and the effects of coffee. Orv. Hetil., 1978, 119 (1), 23-26 (Hungarian) ; Chem. Abstr., 1978, 88, 150682e.
143. Stephenson, P.E.- Physiologic and psychotropic effects of caffeine on man. A review. J. Am. Diet. Assoc., 1977, 71 (3), 240-247.
144. Karacan, I., Thornby, J.I., Anch, A.M., Booth, G.H., Williams, R.L. and Salis, P.J.- Dose related sleep disturbances induced by coffee. Clin. Pharmacol. Ther., 1976, 20 (6), 682-689.
145. Costill, D.L., Dalsky, G.P. and Fink, W.J.- Effects of caffeine ingestion on metabolism and exercise performance. Med. Sci. Sports, 1978, 10 (3), 155-158.
146. Koley, J., Dey, C.D., Koley, B.N. and Maitra, S.R.- Alpha rhythm and physical fatigue : effects of drinking tea, coffee and caffeine. Indian J. Physiol. Allied Sci., 1977, 31 (1), 36-44.

147. Harvey, D.H.P. and Marsh, R.W.- Effects of decaffeinated coffee vs. whole coffee on hyperactive children. Dev. Med. Child. Neurol., 1978, 20 (1), 81-86.
148. Pokrovskii, A.A.- Food as a carrier and precursor of biologically active substances. Za. Vses. Khim. O-va. Im. D.I. Mendeleeva, 1978, 23 (4), 366-371 (Russian) ; Biol. Abstr., 1979, 68, 75520.
149. Farkas, C.S.- Caffeine intake and potential effect on health of a segment of North Carolina indigenous people. Int. J. Addict., 1979, 14 (1), 27-44.
150. Turner, J.E. and Cravey, R.H.- A fatal ingestion of caffeine. Clin. Toxicol., 1977, 10 (3), 341-344.
151. Timson, J.- Caffeine. Mutat. Res., 1977, 47 (1), 1-52.
152. Nagao, M., Takahashi, Y., Yamanaka, E. and Sugimura, T.- Mutagens in coffee and tea. Mutat. Res., 1979, 68 (2), 101-106.
153. Palm, P.E., Arnold, E.P., Rachwall, P.C., Leyczek, J.C., Teague, K.W. and Kensler. Toxicol. Appl. Pharmacol., 1978, 44 (1), 1-16.
154. Grant, E.C.G.- Food allergies and migraine. Lancet, 1979, i (8123), 966-968.
155. Westermann, H., Mueller-Wieland, K. and Spielmann, H.- Oesophageal pressure and serum gastrin after coffee consumption. Med. Klin. (Munich), 1977, 72 (51-52), 3301-3303 (German).
156. Latza, R. and Ammon, R.- Gas-chromatographic detection of metabolic products of chlorogenic acid. Ernaehr.-Umsch., 1977, 24 (6), 169-171 (German).
157. Wilhelmsen, L., Tibblin, L., Elmfeldt, D., Wedel, H. and Werko, L.- Coffee consumption and coronary heart disease in middle-aged Swedish area. Acta Med. Scand., 1977, 201 (6), 547-552.
158. Heyden, S., Tyroler, H.A., Heiss, G., Hames, C.G. and Bartel, A.- Coffee consumption and total, stroke and coronary heart disease mortality. Arch. Intern. Med., 1978, 138 (10), 1472-1474.
159. Kalsner, S.- Coronary vasoconstrictor substance is present in regular and decaffeinated forms of both percolated and instant coffee. Life Sci., 1977, 20 (10), 1689-1696.
160. Atkinson, J.- Cardiovascular effects of caffeine in various forms. Arzneim.-Forsch., 1977, 27 (11), 2070-2072.
161. Mikelson, E.J.- Caffeine and schizophrenia. J. Clin. Psychiatry, 1978, 39 (9), 732-736.
162. McCornack, F.A.- Effects of coffee drinking on the cardiovascular system : experimental and epidemiological research. Prev. Med., 1977, 6 (1), 104-119.
163. Anon.- Caffeine, coffee and cancer. Br. Med. J., 1976, 1, 1031-1032.
164. Morrison, A.S.- Geographic and time trends of coffee imports and bladder cancer. Eur. J. Cancer, 1978, 14 (1), 51-54.
165. Wynder, E.L. and Goldsmith, R.- Epidemiology of bladder cancer. A second look. Cancer (Phila.), 1977, 40 (3), 1246-1268.
166. Wethersby, P.S., Olsen, L.K. and Lodge, J.R.- Selected beverage consumption patterns among Mormon and non-Mormon population from the same geographical region. Am. J. Clin. Nutr., 1977, 30 (7), 1162-65.
167. Enstrom, J.E.- Cancer and total mortality among active Mormons. Cancer (Phila.), 1978, 42 (4), 1943-1951.
168. Wuerzner, H.P., Lindstrom, E., Vuataz, L. and Luginbuel, H.- A 2-year feeding study of instant coffee in rats. II. Incidence and type of neoplasm. Food Cosmet. Toxicol., 1977, 15 (4), 289-296.
169. Anon.- Chloroethanes treated as carcinogenic in U.S.- Chem. Age, 1978, Sept. 22, 10.

170. Haga, M. and Kiyono, T.- Alcohol in relation to tobacco and caffeine beverages. Rinsho Yakuri, 1977, 8 (3), 365-370 (Japanese); Chem. Abstr., 1977, 87, 194872a.
171. Paffenbarger, R.J., Jun., Wing, A.L. and Hyde, R.T.- Characteristics in youth prediction of adult-onset of malignant lymphomas, melanomas and leukaemias. J. Natl. Cancer Inst., 1978, 60 (1), 89-92.
172. Heyden, S., Heiss, G., Manegold, C., Tyroler, H.A., Hames, C.G., Bartel, A.G. and Cooper, G.- Combined effects of coffee drinking on low-density and high-density lipoprotein cholesterol. Circulation, 1979, 60 (1), 22-25.
173. Ahlers, I., Ahlersova, E., Sedlakova, A. and Praslicka, M.- Effect of single simultaneous ingestion of ethyl alcohol and coffee on blood levels of free fatty acids and glucose in young people. Zb. Lek. Fak. Kosice, 1975 (Pub. 1976), 18 (33), 105-111 (Slovenian); Chem. Abstr., 1978, 89, 85611k.
174. Markiewicz, K. and Cholewa, M.- Influence of ethyl alcohol, coffee and tobacco on free fatty acids, triglycerides and glucose levels in serum during physical exercise and restitution. Acta Med. Pol., 1978, 19 (3), 373-385.
175. Iso, M.- Alcohol, coffee and smoking in relation to diabetes. Tonyubyo No Shimpo, 1976, 10, 161-171; Chem. Abstr., 1977, 87, 51035u.

Instant Coffee

176. Stoltze, A. and Masters, K.- Recent developments in the manufacture of instant coffee and coffee substitutes. Food Chem., 1979, 4 (1), 31-39.
177. Gyorgyne, H.- Manufacture of soluble coffee. Edispar, 1977, 28 (1), 11-15 (Hungarian); Ref. Zh. Khim., 1977, 15R274.
178. Simonova, V.N. and Solov'eva, T.Ya.- Characteristics of instant coffee samples in relation to the raw material plant variety. Sb. Nauch. Tr. Leningr. In-t Sov. Torg., 1976, (61), 116-120 (Russian); Ref. Zh. Khim., 1977, 20R342.
179. Lomachinskii, V.A., Nakhmedov, F.G. and Khudominskaya, R.N.- Soluble coffee beverages. Konserv. Ovoshchush. Prom-sti, 1977, (3), 23-26 (Russian); Ref. Zh. Khim., 1977, 15R276.
180. Lomachinskii, V.A., Nakhmedov, F.G. and Koval'chuk, Z.A.- Trial on the industrial production of soluble coffee beverage. Konserv. Ovoshchush. Prom-sti, 1978, (5), 18-21 (Russian).
181. Thaler, H.- The chemistry of coffee extraction in relation to polysaccharides. Food Chem., 1979, 4 (1), 13-22.
182. Sabbagh, N.K., Bosco Faria, J. and Yokomizo, Y.- Determination of monosaccharides in soluble Brazilian instant coffee. Colet. Inst. Technol. Aliment. (Campinas, Braz.), 1977, 8 (1), 55-73 (Portuguese); Chem. Abstr., 1978, 89, 89059j.
183. Simonova, V.N.- Free fatty acids in instant coffee. Sb. Nauch. Tr. Leningr. In-t Sov. Torg., 1976, (61), 121-123 (Russian); Ref. Zh. Khim., 1977, 19R247.
184. Okungbowa, P., Ma, M.C.F. and Truswell, A.S.- Niacin in instant coffee. Proc. Nutr. Soc., 1977, 36 (1), 26A.
185. Beke, G. and Degen, G.- Combination of cryoconcentration and freeze-drying of soluble coffee. Hotoipar, 1977, 24 (2), 58-60 (Hungarian); Ref. Zh. Khim., 1978, 8R269.
186. Flink, J.- Influence of freezing conditions on the properties of freeze-dried coffee. Freeze Drying Adv. Food Technol. (Int. Course), 1973 (Pub. 1975), 177-202.
187. Anon.- Improved stable aroma and flavour products. Res. Discl., 1978, 167, 75-76; Chem. Abstr., 1978, 88, 168659n.
188. Kerkhof, F.J.A.M. and Thijssen, H.A.C.- Quantitative study of the effects of process variables on aroma retention during the drying process of liquid foods. AIChE Symp. Ser.,

188. 1977, 73 (163), 33-46 ; Chem. Abstr., 1977, 87, 116488r.
189. Anon.- Coffee base decaffeination process. Res. Discl., 1978, 167, 73-74 ; Chem. Abstr., 1978, 88, 168658m.
190. Rykova, E.I., Seregin, V.P. and Kovnatskii, V.I.- Influence of intensification of the processes of freezing and sublimation on the storage properties of beverage products. Mekh. Kriopovezhden. Strukt., 1977, 102-103 (Russian) ; Ref. Zh. Khim., 1978, 11R339.
191. Simonova, V.N. and Solov'eva, T.Ya.- Effect of packing method on the quality of soluble coffee after storage. Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved., Pishch. Tekhnol., 1978, (4), 76-79 (Russian) ; Chem. Abstr., 1978, 89, 178322g.
192. Lomachinskii, V.A. and Dol'shakova, T.I.- Effect of packaging and storage conditions on the quality of instant coffee drinks. Konsum. Ovoshchesuch. Prom-st., 1979, (11), 19-21 (Russian) ; Chem. Abstr., 1980, 92, 57023p.
193. Hayakawa, Kan-ichi, Matas, J. and Hwang, M.P.- Moisture sorption isotherms of coffee products. J. Food Sci., 1978, 43 (3), 1026-1027.
194. Solob'eva, T.Ya. and Simonova, V.N.- Alteration of the chemical composition of soluble coffee in the process of storage. Sb. Leningr. Nauchno-Issled. Inst., 1977, (63), 76-82 (Russian) ; Ref. Zh. Khim., 1978, 15R347.
195. Sarra, C.- Possible use of food industry residues in animal feeding : first report on the chemical and bromatological composition of coffee grounds and suggestions for their use. Ann. Fac. Med. Vet. Torino, 1976, 23, 232-240 (Italian) ; Chem. Abstr., 1977, 87, 166306a.
196. McNiven, M.P.F., Summers, J.D. and Leeson, S.- Feeding value of spent coffee grounds for ruminants. Nutr. Rep. Int., 1977, 15 (1), 99-103.
197. Bartley, E.E., Ibbetson, R.W., Chyba, L.J. and Dayton, A.D.- Coffee grounds. II. Effect of coffee grounds on performance of milking dairy cows and feedlot cattle and on rumen fermentation and dry matter removal rate. J. Anim. Sci., 1978, 47 (4), 791-799.
198. Matsui, H., Tanaka, H. and Fujita, A.- Fermenting coffee grounds serve as therapeutic bath. Chem. Eng. News, 1979, April 30, 92.
199. Barbeti, P. and Chiappini, I.- Extraction of brown pigments from coffee grounds. Ind. Bev., 1977, 6 (6), 80-86 (Italian).
200. Hang, Y.D. and Woodams, E.E.- Process for the removal of coffee colour from waste-water. J. Food Sci., 1979, 44 (1), 246-247.

Analysis

201. British Standards Institution - Green coffee : determination of moisture content. BS 5752: Part 1 : 1979 ; ISO 1446-1978.
202. Dowling, R.- Coffee or tea ? Which is richer in caffeine ? Chem 13 (Thirteen) News, 1979, 109, 8-9.
203. Newton, J.M.- Spectrophotometric determination of caffeine in coffee products : collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1979, 62 (4), 705-708.
204. Wolper, I.N. and Solowjewa, T.- Caffeine content of coffee. Edispar, 1977, 28 (1), 19-20, (Hungarian) ; Ref. Zh. Khim., 1977, 15R273.
205. Mattoo, B.B., Pai, P.P. and Krishnamurthy, R.- Caffeine, its basicity, hydrolysis and spectrophotometric assay. Indian J. Chem. Soc., Sect. A, 1977, 15 (2), 141-143.
206. Fabre, J.C.L., Spitalier, F. and Estienne, J.- Automation in coffee analysis. Ann. Falsif. Expert. Chim., 1979, 72 (773), 133-138 (French).
207. Thielmann, H.- Determination of caffeine by thin-layer chromatography on ready-prepared UV 254 and FND sheets with use of chloramine T as detection agent.

207. Sci. Pharm., 1978, 46 (2), 134-135 (German).
208. Sato, S. and Ono, Y.- Determination of caffeine in crude caffeine by gas-liquid chromatography. Kanzei Chuo Bunsekishoho, 1976, 16, 43-47 (Japanese) ; Chem. Abstr., 1977, 87, 122830n.
209. Juergens, U. and Riessner, R.- Determination of caffeine in foods by means of high-performance high-pressure liquid chromatography. Dtsch. Lebensm.-Rundsch., 1980, 76 (2), 39-42 (German).
210. Van Duijin, J. and Van der Stegen, G.H.D.- Analysis for caffeine and trigonelline using high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr., 1979, 179 (1), 199-204.
211. Adams, R.F., Schmidt, G. and Slavin, W.- Determination of xanthines, including caffeine, in food products by high-pressure liquid chromatography. Chromatogr. Newsl., 1976, 4 (1), 10-13.
212. Carballido, A. and Del Carmen Barro, M.- Caffeine and quinine in non-alcoholic beverages. An. Bromatol., 1978 (Publ. 1979), 30 (3-4), 321-2 (Spanish) ; Chem. Abstr., 1979, 91, 37558t.
213. Pribela, A., Tomasek, K. and Medovarska, B.- Determination of quinine and caffeine in non-alcoholic beverages. Kvasny Prum., 1978, 24 (6), 135-137 (Slovak) ; Chem. Abstr., 1978, 89, 161631j.
214. Erndt, A., Gosik, K., Krajewska, A. and Scibor, T.- Gas-liquid chromatographic determination of caffeine in cola beverages. Chem. Anal. (Warsaw), 1978, 23 (5), 811-814.
215. Sontag, G. and Kral, K.- Voltammetric determination of caffeine in coffee, tea and soft drinks. Mikrochim. Acta, 1979, 1 (3-4), 229-240 (German).
216. Hsu, Tong-Jung, Liao, Chi-Chow and Chen, Mei-Yun.- Liquid chromatography of adenine, caffeine, theobromine, theophylline, tannic acid and xanthine, and its application to tea infusions. J. Chin. Chem. Soc., Ser. II, 1978, 25 (3), 153-160.
217. Folster, P., Van der Plas, H.C., Pilnik, W., Schols, H.A. and Melger, P.- Liquid chromatographic analysis on $N \beta$ -alkanyl-5-hydroxytryptamides (C-5-HT) in green coffee beans. J. Agric. Food Chem., 1979, 27 (1), 12-15.
218. Hunziker, H.R. and Miserez, A.- Determination of 5-hydroxytryptamides in coffee by high-pressure liquid chromatography. Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg., 1979, 70 (1), 142-153 (German).
219. Hubert, P., Kwasny, H., Werkhoff, P. and Turner, U.- Analysis of carboxylic acid hydroxytryptamides in coffee. Fresenius' Z. Anal. Chem., 1977, 285 (3), 242-250 (German).
220. Lau-Cam, Cesar A.- Coffee as an interference in the Duquenois test : a differential test. Clin. Toxicol., 1978, 12 (5), 535-541.
221. Kazi, T.- Coffee mixtures : spectrophotometric method for the determination of coffee content. Food Chem., 1979, 4 (1), 73-80.
222. Resmini, P., Volonterio, G. and Prati, F.- Determination of coffee in mixtures with surrogates. Riv. Soc. Ital. Sci. Aliment., 1978, 7 (2), 123-126 (Italian).
223. Choi, Young Aa.- Determination of nicotine in contaminated coffee. Kongjung Poken Chapchi, 1976, 13 (2), 375-379 (Korean) ; Chem. Abstr., 1979, 90, 20890b.
224. Lee, Duk Heng, Lee, Y.J.- Microdetermination of nicotine in contaminated (coffee) beverage by thin-layer chromatography. Saengyak Hakhoe Chi (Hanguk Saengyak Hakhoe), 1979, 10 (1), 23-25 (Korean) ; Chem. Abstr., 1980, 92, 92812s.
225. Kacprazak, J.L.- Determination of dimethylpolysiloxane in instant coffee. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1977, 60 (5), 1142-1144.

Patents

- P1. Eliminating irritating substances from coffee.-
Roselius, L., Kurzhals, H.A. and Sylla, K.F. Fr. Demande 2, 362, 592 (24.04.1978).
- P2. Eliminating irritating substances from coffee.-
Kurzhals, H.A. and Sylla, K.F. Fr. Demande 2, 389, 332 (01.12.1978).
- P3. Decaffeination process.-
Erb, W.W., Einstman, W.J., Jones, G.V. and McGregor, G.A. U.S. 3, 989, 850 (02.11.1976).
- P4. Decaffeinated coffee of improved flavour.-
Lando, F. and Teitelbaum, C.L. U.S., 4, 044, 162 (23.08.1977).
- P5. Decaffeination of green coffee.-
Hudak, S.F. and Mahlmann, J.P. Brit., 1, 522, 277 (23.08.1978).
- P6. Caffeine-free coffee.-
Strobel, R.G.K. Ger. Offen. 2, 740, 628 (23.03.1978).
- P7. Decaffeination of green coffee.-
Jones, G.V. and Coogan, J.F. U.S. 4, 087, 562 (02.05.1978).
- P8. Decaffeinating green coffee beans.-
Kurzhals, H.A. and Sylla, K.F. Fr. Demande 2, 387, 333 (05.05.1977).
- P9. Decaffeinating coffee with solvents at high pressure.-
Peter, S. and Brunner, G. Ger. Offen. 2, 737, 794 (08.03.1979).
- P10. Extraction of caffeine from solution in carbon dioxide under high pressure.-
Van der Stegn, G.H.D. and De Wilt, H.G.J. Ger. Offen. 2, 848, 582 (17.05.1979).
- P11. Decaffeination of raw coffee.-
Kaffee-Veredelungs-Werke - Koffeinfrei Kaffee G.m.b.H. Ger. Offen. 2, 634, 535 (16.03.1978).
- P12. Decaffeination of green coffee beans.-
Peter, S. and Brunner, G. Ger. Offen. 2, 737, 793 (08.03.1979).
- P13. Separation of caffeine from supercritical solutions.-
Hubert, P. and Vitzthum, O. Ger. Offen. 2, 637, 197 (23.02.1978).
- P14. Selective extraction of caffeine from plant material.-
Roselius, L., Kurzhals, H.A. and Hubert, P. Ger. Offen. 2, 727, 191 (21.12.1978).
- P15. Decaffeination of plant material.-
Fout, G.W., Mishkin, A.R. and Roychoudhury, R.N. Ger. Offen. 2, 651, 128 (23.06.1977).
- P16. Decaffeination of vegetable material.-
Margolis, G., Rushmore, D.F. and Liu, R.T.-S. U.S. 4,031, 251 (21.06.1977).
- P17. Decaffeination of green coffee.-
General Foods Corp. Brit. 1, 488, 340 (12.10.1977).
- P18. Adsorption process.-
Kramer, F., Henig, Y.S., Garin, T.A. and Vogel, G.J. U.S. 4, 113, 887 (12.09.1978).
- P19. Removing caffeine from green coffee beans.-
Van der Stegn, G.H.D. Ger. Offen. 2, 832, 267 (15.02.1979).
- P20. Decaffeinating coffee.-
Studiengesellschaft Kohle m.b.H. Belg. 856, 955 (19.01.1978).
- P21. Treatment of an aqueous extract of plant material for reducing the content of caffeine and/or chlorogenic acid.-
Ger. Offen. 2, 826, 466 (15.02.1979).

- P22. Membrane decaffeination.-
Katz, S.N. U.S. 4, 113, 886 (12.09.1978).
- P23. Process for improving the flavour and aroma of decaffeinated coffee by radio-frequency heating to rapidly dry coffee beans.-
Fogel, H.P. and Holzberg, I. U.S. 3, 989, 849 (02.11.1976).
- P24. Decaffeinated coffee of improved quality.-
Fazzina, T.L., Jones, G.V. and Scella, R.P. Brit. 1, 468, 273 (23.03.1977).
- P25. Organic fertiliser made from coffee hulls and/or peanut shells.-
Finken, H. Ger. Offen. 2, 739, 618 (08.03.1979).
- P26. Antioxidants made from green coffee beans and their use for protecting autoxidisable foods.-
Lehmann, G., Neunhoeffer, O., Roselius, W. and Vitzthum, O. Ger. 1, 668, 236 (01.03.1979).

- P27. Process for grinding roasted coffee beans.-
Strobel, R.G.K. Brit. 1, 424, 264 (11.02.1976).
- P28. High-sheen roast and ground coffee flakes of improved extractability.-
Grubbs, D.R., Lubson, T.A. and Roseberry, G.L. U.S. 4, 110, 485 (29.08.1978).
- P29. Roasted and ground coffee products and method.-
Mahlmann, J.P. U.S. 4, 053, 652 (11.10.1977).
- P30. Removal from coffee of gases which are adsorbed, in particular by roasted or ground coffee.-
Finn. 53, 259 (30.12.1977).
- P31. Coffee bean oxidation inhibition with sodium sorbate.-
Takamori, K. Japan. Kokai 77 72, 861 (17.06.1977).
- P32. Process for vacuum packing of coffee.-
Shaw, F.B. U.S. 4, 069, 349 (17.01.1978).
- P33. Packaging roasted coffee products.-
Hamell, M., Stefanucci, A. and Ward, W.W. U.S. 4, 034, 116 (05.07.1977).
- P34. Laminated structures and methods for producing same.-
Fumei, G.J. and Karabedian, J.A. Brit. 1, 441, 666 (07.07.1976).
- P35. Coffee preservation.-
Ishida, T. Japan. Kokai 78 50, 369 (08.05.1978).
- P36. Coffee quality improvement with Cichorium.-
Eto, R. Japan. Kokai 77 156, 969 (27.12.1977).
- P37. New procedure of manufacture of coffee chicory from endive after forcing the chicory root.-
Christian, L. Fr. 2, 302, 043 (25.02.1975).
- P38. Extracts of vegetable materials and processes of manufacture of such extracts.-
Risler, P., Gireau, J., Rose, P. and Bisson, J.P. Fr. 2, 294, 652 (16.07.1976).
- P39. Process for obtaining coffee substitute from cereals and chicory.-
Dmitrieva, E.T., Gulyaev, V.N., Nakhmedov, F.G., Safronov, M.I., Tanoiev, K.Sh. and Timokhina, L.M. SSSR 563, 152 (30.06.1977).
- P40. Natural seasonings (for coffee).-
Akagi, K. Japan. 78 47, 570 (28.04.1978).

- P41. Coffee flavouring agent.-
Yokoi, S., Yoshimura, T. and Yajika, K. Japan. 77 110, 873 (17.09.1977).
- P42. Intensification of the flavour and aroma of beverages (coffee and soya).-
Watanabe, S. Japan. Appl. 51-81948 (27.01.1978, Publ.).
- P43. Coffee flavour and taste improvement.-
Sakaguchi, Y. and Kojima, K. Japan. 77 139, 756 (21.11.1977).
-
- P44. Methylxanthine antagonism.-
Zeitlin, B.R. and Levenson, H.S. Can. 1, 043, 156 (28.11.1978).
- P45. Antagonising the stimulating effects of methylxanthines in foods.-
General Foods Corp. Neth. Appl. 76 03, 263 (03.10.1977).
- P46. Caffeine antagonists.-
General Foods Corp. Brit. 1, 510, 583 (10.05.1978).
- P47. Process for reducing the stimulating activity of caffeine.-
Zeitlin, B.R., Pritchard, A.B. and Levenson, H.S. U.S. 4, 007, 290 (08.02.1977).
- P48. Dipeptide-containing bitter edible material in particular low-grade coffee.-
Fimucane, T.P. and Halik, J.J. Brit. 1, 466, 388 (09.03.1977).
- P49. Low-grade coffee with addition of dipeptide.-
Fimucane, T.P. and Halik, J.J. Australian 480, 761 (10.02.1977).
- P50. Process for improving the flavour of food products and beverages.-
Fimucane, T.P. Swiss 590, 615 (15.08.1977).
-
- P51. Coffee percolation process.-
Saul, N.K. U.S. 4, 048, 345 (13.09.1977).
- P52. Process for producing coffee extract.-
Katz, S.N., Gottesman, M. and Haya, M. U.S. 4, 088, 794 (27.05.1977).
- P53. Procedure for the extraction of large particles in counter-current.-
General Foods Corp. Dutch 109, 292 (17.01.1977).
- P54. Soluble coffee.-
Ryder, W.S. and Mezzino, J.F. U.S. 4, 076, 855 (28.02.1978).
- P55. Soluble coffee.-
Hitchinson, P.W., Blain, J.R.P. and Walter, E. Brit. 1, 489, 166 (19.10.1977).
- P56. Coffee extraction process.-
Marsh, W.C. and Wimmers, J.E. U.S. 3, 995, 067 (30.11.1976).
- P57. Extraction of flavour components from coffee and tea.-
Kondo, T. Japan. 78 47, 571 (28.04.1978).
- P58. Readily water-soluble instant coffee.-
Shinozaki, T., Nagasawa, T., Kawashima, H., Ebisu, T., Aoki, I., Kawakami, E. and Shimazaki, I. Japan. 79 14, 653 (08.06.1979).
- P59. Freeze particle process.-
Lawrence, B. U.S. 4, 057, 652 (08.11.1977).
- P60. Stable aroma, flavour and aroma and flavour products from aroma- and flavour-bearing substances.-
Strobel, R.G.K. Can. 1, 014, 000 (19.07.1977).

- P61. Process for making an improved instant coffee.-
Gregg, R., Weikel, J.A., Patel, J.M. and Durchholz, R.F. U.S. 4, 100, 306 (11.07.1978).
- P62. Process for making an improved coffee volatiles concentrate.-
The Procter & Gamble Co. U.S. 4, 100, 305 (11.07.1978).
- P63. Soluble coffee of improved stability and flavour.-
Howland, R.F., Mansky, M.H. and Richards, W.J. U.S. 4, 045, 586 (30.08.1977).
- P64. Fixing cryogenically condensed coffee aromatics in a glyceride carrier.-
Howland, R.F., Jasovsky, G.A. and Galanti, J.A. U.S. 4, 119, 736 (10.10.1978).
- P65. Fixing coffee aroma obtained by deep freezing in a liquid glyceride.-
Howland, R.F., Jasovsky, G.A. and Galanti, J.A. Ger. Offen. 2, 652, 378 (07.07.1977).
- P66. Process for fixing coffee grinder gas.-
Siedlecki, D.T. and Meinhold, J.F. U.S. 4, 007, 291 (08.02.1977).
- P67. Aroma composition from coffee oil.-
General Foods Ltd. Japan. 77 87, 248 (20.07.1977).
- P68. Separation and recovery of aroma constituents from roasted coffee.-
Fairbairn, N.J., Perry, W.J. and Burt, R.W. Ger. Offen. 2, 836, 304 (01.03.1979).
- P69. Process for the aromatisation of coffee products.-
Margolis, G., Liu, R.T.-S. U.S. 4, 072, 761 (07.02.1978).
- P70. Process for aromatising soluble coffee.-
Jolly, M.D., Mills, H., Nacci, A.T., De Ceglie, G.J. and Vitti, R. U.S. 4, 044, 167 (23.08.1977).
- P71. De-aromatisation of coffee oil.-
Hurlow, G.S., Blain, J.R., Coombes, M., Richard, J.C. and Hitchinson, P.W. U.S. 4, 101, 681 (18.07.1978).
- P72. Dry foods containing glyceride-fixed aromas.-
Jasovsky, G.A., Vitti, R.A. and Jolly, M.D. Can. 1, 015, 209 (09.08.1977).
- P73. Extracting food with a dimethyl ether - water mixture.-
Yano, N., Fukinbara, I. and Takano, M. U.S. 4, 069, 351 (17.01.1978).
- P74. Aromatic soluble coffee.-
Clinton, W.D., Makwinski, J.A. and Mahlmann, J.P. Brit. 1, 538, 387 (17.01.1979).
- P75. Article and method for the aromatisation of coffee products.-
Pultinas, E.P., Jun. Eur. Pat. Appl. 1, 460 (30.09.1977).
- P76. Flavouring agent.-
Winter, M., Gautschi, F., Flament, I. and Stoll, M. U.S. 4,018,910 (19.04.1977).
- P77. Flavouring agent.-
Winter, M., Gautschi, F., Flament, I., Stoll, M. and Goldman, I.M. U.S. 4, 038, 435 (26.07.1977).
- P78. Sulphur-containing derivatives of pyridine as flavouring agents.-
Winter, M., Gautschi, F., Flament, I. and Stoll, M. U.S. 4, 085, 109 (18.04.1978).
- P79. Flavouring foods with 8-methylnon-2-ynol and its derivatives.-
Jindra, H. and Clinton, W.P. U.S. 4, 001, 454 (04.01.1977).
- P80. Caffeine-free coffee (extract).-
Procter & Gamble Co. Neth. Appl. 78 03, 436 (03.10.1978).
- P81. Decaffeinizing process.-
Margolis, G., Rushmore, D.F., Liu, R.T.-S. and Anderson, C.H. Ger. Offen. 2, 721, 765 (08.12.1977).

- P82. Partially decaffeinated instant coffee.-
General Foods Corp. Japan. 77 134, 054 (09.11.1977).
- P83. Partially decaffeinated soluble coffee product and method therefore.-
Meyer, F.W., Pitchon, E. and Earle, E.L., Jun. U.S. 4, 081, 561 (28.04.1978).
- P84. Anti-agglomeration agent for powdered foods.-
Nakamura, S. and Matsushita, S. Japan. 77 130, 932 (02.11.1977).
- P85. Iron-fortified soluble coffee product.-
Einstmann, W.J., Klug, S.L., Patrizio, F.J. and Rupp, G. Can. 1, 032, 824 (13.06.1978).
- P86. Iron-fortified soluble coffee product.-
Patrizio, F., Klug, S.L. and Rupp, G. Can. 1, 032, 823 (13.06.1978).
- P87. Colour improvement of cacao and coffee beans with polyphenol oxidase.-
Motoda, T. Jpn. Kokai Tokkyo Koho 79, 143, 561 (08.11.1979).

Late extras (unclassified)

226. Dandy, A.J.- Production and characterisation of activated carbon from agricultural waste products and wood charcoals. N.Z.J.Sci., 1977, 20 (3), 291-296 ; Biol. Abstr., 1980, 69, 1736.
227. Panda, N.C., Sahn, B.K., Rao, A. and Panda, S.K.- Tannic acid of tea and coffee incriminating factor for heart disease. Indian J. Nutr. Diet., 1979, 16 (9), 348-355 ; Chem. Abstr., 1980, 92.
228. Zuskin, E., Valic, F. and Skuric, Z.- Respiratory functions in coffee workers. Br. J. Ind. Med., 1979, 26 (2), 117-122.
229. Mettlin, C. and Graham, S.- Dietary risk factors in human bladder cancer. Am. J. Epidemiol., 1979, 110 (3), 255-264.
230. Heyden, S., Heyden, F., Heiss, G. and Ames, C.G.- Smoking and coffee consumption in three groups : cancer deaths, cardiovascular deaths and living controls. J. Chronic Dis., 1979, 32 (9/10), 673-678.
231. Foxx, R.M. and Rubinoff, A.- Behavioural treatment of caffeinism. Reducing excessive drinking. J. Appl. Behav. Anal., 1979, 12 (3), 335-364.
232. Schuller, E., Drasch, G., Von Meyer, L. and Anselm, D.- Effect of alcohol and caffeine on the driver fatigued by a long trip. A study on a driving simulator. Beitr. Gerichtl. Med., 1979, 37, 219-222 (German).
233. Aeschbacher, H.U. and Wuerzuer, H.P.- An evaluation of instant and regular coffee in the Ames mutagenicity test. Toxicol. Lett., 1980, 5 (2), 139-145.
234. Sherma, J. and Gray, D.A.- Quantitation of caffeine in beverages by TLC densitometry : A student experiment. Am. Lab. (Fairfield, Conn.), 1979, 11 (10), 21-22, 24.
235. Lomachinskii, V.A., Nakhmedov, F.G. and Andreeva, E.V.- Mineral composition of instant coffee drinks. Konservn. Ovoshchesush. Prom-st., 1980, (2), 28-30 (Russian) ; Chem. Abstr., 1980, 92, 145235g.
236. Moore, M.R., Hughes, M.A. and Goldberg, D.V.- Lead absorption from dietary sources. Effect of cooking on lead concentration of certain foods and beverages. Int. Arch. Occup. Environ. Health, 1979, 44 (2), 81-90.
237. Kulhanek, F., Linde, O.K. and Meisenberg, G.- Precipitation of antipsychotic drugs in interaction with coffee or tea. Lancet, 1979, 2 (8152), 1130.
238. De Oliveira, J.C., Silva, D.M., Amorim, H.V. and Teixeira, A.A.- Effects of the original pulping types and storage of coffee on the polyphenoloxidase activity and beverage quality. Cientifica, 1979, 7 (1), 79-84 (Portuguese) ; Chem. Abstr., 1980, 92, 127193v.

239. Waller, G.R. and Roberts, M.F.- N-methyltransferase and 7-methyl-N⁹-nucleoside hydro-
lase activity in vitro of Coffea arabica fruits and the in vivo metabolism of caffeine.
Symp. Pap.-IUPAC Int. Symp. Chem. Nat. Prod., 11th, 1978, (Part 2), 55-71 ; Chem. Abstr.,
1980, 92, 125017s. (cf. reference 48).
240. Chou, Chang-Hung and Waller, G.R.- Isolation and identification by mass spectrometry of
phytotoxins in Coffea arabica. Bot. Bull. Acad. Sci., 1980, 21 (11), 25-34 ; Chem.
Abstr., 1980, 92, 143317u.

INTERNATIONAL COFFEE STANDARDISATION AND LEGISLATION

R. J. CLARKE

General foods ltd.,

Banbury, Oxon,

England

INTRODUCTION

In a short presentation, it is only possible to deal very briefly with this subject. The subject has, however, been treated in some detail in a paper¹ published in 1978, and there was also an earlier presentation on International Standardisation to ASIC in 1969². In any event, progress by international agreement, or just within a group of countries is inevitably slow. In this paper, I will describe one or two examples of harmonization of standards and of legislation, that have taken place in recent years.

First of all, we have to understand that international standardisation has its objective, the removal of technically-based hindrances to trade, in industrial and agricultural products generally. There are two main international organisations promoting this objective. Firstly, the International Standards Organisation attempts to harmonize differences in and (importantly) understanding of, national commercial standards already established for the convenience of those in trade. Such international standards are, however, voluntary, or contractual. Secondly, for food-stuffs alone, the Codex Alimentarius Commission (of UN/WHO) tackles hindrances arising from differences in national food legislation (established to protect the consumer).

ISO through its Technical Committee no. 34 has been very active since 1963 in coffee standardisation, and since 1976, Sub-Committee SC 15 has been the operating unit.

FOOD STANDARDS

Like any other product, the elements of a food product standard or specification, whether national or international, can be illustrated as in table 1.

TABLE 1

FOOD PRODUCT STANDARDS

Definition	Hygiene
Designation	Residues
Composition	(Agro-chemical)
Additions	
Quality	
<hr/>	
Sampling and Methods of Analysis	
<hr/>	
Packing	
<hr/>	
Marking and Labelling	
<hr/>	

Not all the elements shown are, however, applicable or indeed necessary with a particular foodstuff. We should, however, emphasise the need for standard methods of analysis (test methods), together with its close relation, sampling. We all know of specifications being set, without a reliable or agreed test method. ISO has specialised formats for product and other standards.

Turning to green coffee, elements that appear in either the numerous commercial national standards, or in the fewer legislative requirements are shown in table 2.

TABLE 2

GENERAL NATURE OF GREEN COFFEE STANDARDS

<u>Item</u>	<u>Type of Description</u>
Definition	
Designation	
Composition	
Moisture Content	% maximum
Quality	
Bean Size	Screen analysis Grade - number or letter
Defective beans)Quantity per sample (count or)weight
Extraneous matter (coffee or non-coffee)) Commercial-type numbers) Legislative - maximum allowable

ISO standardisation has been rightly and primarily concerned with harmonizing terminology (or the meaning of words used), methods of chemical analysis, test methods for quality factors, and sampling. The international standards that have been developed (currently, mostly as draft standards), are shown in table 3.

TABLE 3

ISO STANDARDS FOR GREEN COFFEE

DIS 3509	Glossary of coffee terms
DIS 4072	Green Coffee in Bags - Sampling
DP 6666	Green Coffee in Bags - Triers
IS(R) 1446	Green Coffee Beans - Determination of moisture content - Reference method.
IS(R) 1447	Green Coffee Beans - Determination of moisture content - Practical method.
DIS 1445	Test methods concerning green coffee. Withdrawn, under replacement by
DIS 4149	Green coffee beans - Olfactory, visual examination and determination of foreign matter.
D.P. 6667	Green coffee beans - Determination of insect-damaged beans
D.P. 6669	Green coffee beans - Determination of bulk density.
D.P. 6673	Green coffee beans - Mass loss determination on drying.
DIS 4052	<u>Green</u> , roasted and instant coffee - Determination of caffeine content (modified Levine method)

The vocabulary (DIS 3509) is an important framework for clearly defining terms used in the coffee trade, e.g. the distinction between 'husks' and 'hulls'. In respect of test methods, it is important aspect of ISO work to insist wherever possible, on collaborative practical studies of methods with distributed samples to member laboratories, before adopting a method as standard, and to include repeatability/reproducibility data in the published method. This aspect has been fully implemented in practice by SC 15, for caffeine, mass loss and solvent residue determinations. In other cases, harmonization of existing practices (as in screen analyses) is sought. Assessing green coffee quality by cup-testing of the prepared roasted and ground coffee, and the vocabulary of the flavour terms used, are other obvious areas of difference in practice between countries, which are now being examined.

Roasted coffee itself, has not been the subject of much effort in harmonization of national standards, since it features little in cross-country trade, compared with instant coffee. Since its general introduction from the end of World War II, most countries in Europe and elsewhere, have now national legislation setting out statutory requirements for instant coffee when sold to the consumer by retail. The technical factors or items which are generally found, are shown in tables 4 and 5.

TABLE 4

GENERALIZED LEGISLATIVE REQUIREMENTS
FOR SOLUBLE (INSTANT) COFFEE

<u>Item</u>	<u>Type of Specification</u>
Definition)	
Designation)	Restrictions
Composition	
1. Extraction Yield	Restriction
2. Dryness (expressed as either)	
a. 'Moisture' content	% maximum
b. Dry matter content)	
c. Dry soluble content)	% minimum
3. Caffeine content	Allowable range
Additions	
Allowable additives	Type and maximum
Quality (Purity)	
1. Insolubles content)	
2. Non-coffee substance)	Maximum amount
content)	

TABLE 5

ADDITIONAL LEGISLATIVE REQUIREMENTS FOR
DECAFFEINATED SOLUBLE COFFEE

<u>Item</u>	<u>Type of Specification</u>
1. Caffeine content	% maximum allowable
2. Decaffeinating solvent or method	Description and purity
3. Solvent residues	Maximum residual solvent (in ppm)

The ISO coffee sub-committee (SC 15) has been particularly concerned with harmonizing methods of analysis and sampling for instant coffee. There are now some three draft International Standards available, and several more under development, (table 6).

TABLE 6

ISO STANDARDS FOR SOLUBLE (INSTANT) COFFEE

DIS 3509	Glossary of coffee terms
DIS 3726	Instant coffee - Mass Loss determination on drying (vacuum oven)
DIS 4052	Green, roasted and <u>instant</u> coffee - Determination of caffeine content (Levine method)
D.P. 6672/1	Roasted and <u>instant coffee</u> - Determination of chlorinated solvent residues
D.P. 6670	Instant coffee - Sampling from cases with liners.

Actual specifications (and their quantitative requirements) for instant coffee differ widely across different countries. Within the nine countries of the EEC, national specifications have now been harmonised by a Directive, indeed meant to be effective statutorily within each of these countries after July 12th, 1980. It is of interest to compare the various values assigned to various items, before and after harmonisation, and also, to compare values of some of these items for other countries, outside the EEC.

Tables 7 show some of these comparisons which, however, should be checked locally for up-to-dateness and accuracy. A blank means no reference made to the particular item.

TABLE 7.1

NATIONAL AND HARMONISED REGULATIONS FOR INSTANT COFFEE

COMPOSITIONAL REQUIREMENTS - DRYNESS

FRANCE	(1965)	3.5% max.
U.K.	(1971)	95% dry soluble solids minimum
GERMANY		-
DENMARK		-
BENELUX	(1968)	96% dry matter content, minimum
ITALY	(1976)	4.0% max.
EEC	(1977)	96% dry matter content (minimum) by the ISO Vacuum Oven Method for Mass Loss
<hr/>		
AUSTRALIA STATES	(1961)	-
ISRAEL (NAT. STANDARD)	(1977)	4.0% maximum (single jar) 3.0% maximum (average)
KENYA (NAT. STANDARD)	(1977)	3.5% maximum
SOVIET UNION (Gost/HRTU, 1971)		3.8% maximum ex factory; 6.0% maximum in samples at the end of their shelf life (9 mths)
SPAIN	(1976)	4.0% maximum
SWEDEN	(1976)	5.0%
U.S. (FEDERAL & SUPPLY AGENCIES)	(1974)	3.0% maximum 2.6% maximum (freeze dried)

TABLE 7.2

NATIONAL AND HARMONIZED REGULATIONS
FOR SOLUBLE COFFEE

COMPOSITIONAL REQUIREMENTS - CAFFEINE CONTENT

		<u>Normal</u>	<u>Decaffeinated</u> maximum values (dry basis)
FRANCE	(1965)	-	0.3%
U.K.	(1971)	-	0.3%
GERMANY	(1977)	-	0.3%
DENMARK	(1976)	-	-
BENELUX	(1969)	3-6% range	0.3%
ITALY	(1976)	-	0.3%
EEC	(1977)	-	0.3%

		<u>Minimum values</u>	<u>Maximum Values</u>
ARGENTINE	(1971)	2.5%	0.3%
AUSTRALIA (States)	(1961)	3.0%	-
AUSTRIA	(-)	-	0.36%
ISRAEL	(1977)	2.5%	0.3%
KENYA (Nat.Std.)	(1977)	2.8%	-
NEW ZEALAND	(1973)	2.25%	-
SOUTH AFRICA	(1976)	2.8%	-
SOVIET UNION (Gost/HRTU)	(1971)	3.0%	-
SPAIN	(1967)	2.5%	0.3%
SWEDEN	(1976)	-	0.15% max.
SWITZERLAND	(1972)	-	0.4%
U.S. (FEDERAL SUPPLY AGENCIES)	(1974)	1) 3.2% 2) 2.2%	-

The EEC Directive is unique in defining a maximum extraction yield i.e. at least 2.3 kg. of raw coffee must be used in the manufacture of 1 kg. finished product.

To conclude, considerable effort is being made in international standardisation and legislation to reduce technical hindrances to trade. There is no doubt that harmonisation of methods of analysis, test methods and of sampling, is or should be the primary step, in this process.

REFERENCES

1. R.J. Clarke, Food Chemistry (4), 1979 pg. 81-96.
2. G.F. Wilmink, 4th ASIC Colloquium, Amsterdam 1969.

LES GRANDES LIGNÉES DE CAFÉIERS

Prof. J.-F. LEROY

Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris

et

Ecole Pratique des Hautes Etudes

Mes travaux sur les Caféiers, entrepris en 1960, au Laboratoire d'Agronomie Tropicale du Muséum, avaient pour objectif de clarifier la systématique des grandes lignées ; précisément de tenter de déceler ces lignées et de les définir. Le Directeur du Laboratoire avant R. PORTERES, Auguste CHEVALIER, auteur de travaux classiques sur les Caféiers, était mort en 1956 et j'avais à coeur de prendre le relais de ces travaux. Avec l'accord de H. HUMBERT, directeur de l'Herbier du Muséum, je pus commencer l'étude des collections de Madagascar**

Aussitôt deux faits majeurs me furent révélés : d'une part, l'incroyable diversité des Caféiers sylvestres de Madagascar ; d'autre part, l'existence d'un complexe de quelques espèces du Domaine de l'Ouest malgache, extrêmement isolé, sans rapports directs avec les espèces connues non seulement à Madagascar, mais dans le Monde.

L'un des éléments de ce complexe fut décrit par mes soins en 1961, sous le nom de *Coffea humbertii* ; un autre élément en avait été établi dès 1938 sous le binome : *Coffea grevei* Drake ex Chevalier. D'autres encore reçurent statut, notamment le *C. decaryana* Leroy (1961) de la Réserve de Namoroka (n° VIII) (4). D'autres espèces furent décrites que j'ai, depuis, mises en synonymie. En fait, on est là devant une seule grande espèce linnéenne et les petites espèces la constituant (*C. grevei*, *C. humbertii*, *C. decaryana*) sont plus ou moins reliées entre elles par des intermédiaires. Ce complexe du *C. grevei* se définit par un ensemble de caractères bien structuré : ce sont des tropophytes à feuilles caduques, endémiques du Domaine occidental (partie Sud) de Madagascar, à développement sympodial ; l'inflorescence est 1-flore, terminale, et s'épanouit avant le développement des feuilles ; la fleur est toujours écalyculée. Par ailleurs la fleur (corolle, étamines, style), se rattache de très près à celle du *Coffea sensu stricto* (lequel est généralement allogame) : anthères non sessiles, exsertes, fixées dans leur moitié inférieure, style exsert, tube corollin moyennement long.

** Cette continuité des recherches dans le cadre du Muséum, à Paris et par la suite en rapport avec l'I.F.C.C. que dirigeait alors R. COSTE, eut pour conséquence d'entraîner une certaine gêne dans le développement des recherches du Dr. F.G. MEYER (Washington) que je rencontrai à Paris en 1960 : je lui en demande pardon.

Premier problème : d'où venait ce complexe complètement isolé géographiquement, écologiquement, morphologiquement ? Quels en étaient les rapports avec les autres espèces ? En d'autres termes, comment le classer ?

Très rapidement, je fus amené à envisager les problèmes posés par plusieurs Caféiers africains :

- Cas du *Psilanthus ebracteolatus* Hiern. -

En 1953, BRENAN (5), aujourd'hui directeur des célèbres Jardins et Laboratoires de Kew, propose de considérer le *Psilanthus ebracteolatus* comme un *Coffea* et lui donne le nom de *Coffea ebracteolata* (Hiern). Ce faisant, BRENAN se fonde, à juste titre, sur la parenté de cette espèce avec le *Coffea* subg. *Paracoffea* d'Asie, parenté qui avait déjà été évoquée par FROEHNER dès 1898 (6). BRENAN note même une ressemblance avec le *Coffea melanocarpa* de l'Angola. Un pont est donc jeté entre l'Afrique et l'Asie.

En 1947, CHEVALIER (7) avait également classé un *Coffea* de Madagascar, le *Coffea grevei*, dans la section, jusqu'alors asiatique, du *Paracoffea*, et il avait décrit sous le binôme *Coffea floreiifolia* une autre espèce, prétendument de Madagascar, qui était en fait, je pense, le *Coffea bengalensis* introduit de l'Inde. Il est certain que le *Coffea bengalensis* fut cultivé au Jardin botanique de La Réunion. Avec CHEVALIER le pont était jeté entre Madagascar et l'Asie : ce traitement était pour le moins osé et je n'ai pu le confirmer jusqu'à maintenant.

- En 1955 (8) survint la description d'un autre Caféier extraordinaire du bassin du Congo : le *Coffea lebruniana* Germain et Kesler. Caféier à développement sympodial, mais contrairement au *Coffea bengalensis* ou au *Coffea ebracteolata*, décrit comme à fleurs calyculées.

Enfin restait une énigme : le *Coffea melanocarpa* de l'Angola. Caféier à développement monopodial et à fleurs axillaires, calyculées comme le *Coffea sensu stricto*, il a par ailleurs une disposition florale du type des espèces asiatiques et du *Coffea ebracteolata*.

Ma position en 1967. -

Apparemment le *Coffea ebracteolata* et le *Coffea lebruniana* semblaient étroitement apparentés. Or le premier est écalyculé, le second avait été décrit comme calyculé. D'après Germain et Kesler le *C. lebruniana* avait "2-4 fleurs, rarement 1, disposées en cymes axillaires et terminales, avec 1 calyculé". En 1967 (9), je pus montrer que l'inflorescence est 1-flore et fondamentalement terminale et écalyculée. En d'autres termes l'étroite parenté des espèces était démontrée. De plus, le rapport assez général entre le mode de développement sympodial et le caractère écalyculé de l'inflorescence était établi.

Dès lors, je proposai (10), nous sommes en 1967, la création du genre *Paracoffea*. A mes yeux il existait deux grandes lignées de Caféiers, si l'on met à part les genres voisins, et notamment *Nostolachma* : *Coffea sensu stricto*, genre rigoureusement africano-malgache et *Paracoffea*, genre africano-asiatique et du Pacifique (jusqu'en Nouvelle-Guinée). Le critère du mode de développement avait été admis comme n° 1, mais il comportait deux exceptions essentielles :

1) l'une représentée par le *Coffea melanocarpa*, lequel a les fleurs de type *Paracoffea*, mais est monopodial,

2) l'autre par le complexe du *Coffea grevei*, *Coffea* presque typique, mais sympodial.

Provisoirement, et conjecturalement, me référant à l'affinité des caractères autres que le mode de développement, je rattachai le *C. melanocarpa* à la lignée

du *C. lebruniana*. Pour le complexe du *C. grevei*, la difficulté était plus grande encore car l'ensemble forme un taxon isolé de façon absolue parmi tous les Caféiers : la question ne fut pas tranchée et le complexe du *C. grevei* fut maintenu dans le *Paracoffea* où CHEVALIER l'avait placé, alors que ce genre n'était encore qu'une section.

A partir de 1968, je tentai auprès des services agronomiques de l'Angola, mais en vain, d'obtenir des graines du *Paracoffea melanocarpa*. Finalement en 1973, mon collaborateur N. HALLÉ, excellent spécialiste des Rubiacées, devant se rendre en Afrique du Sud, accepta de se charger d'une mission de prospection en Angola en vue de retrouver la plante en cause, jamais récoltée depuis 1953. La mission, à laquelle s'associèrent deux spécialistes portugais, fut partiellement subventionnée par l'I.F.C.C. alors sous la direction de Monsieur R. COSTE. Elle dura une huitaine de jours et aboutit à la redécouverte de deux individus dans une station classique à 280 km de Luanda. L'année suivante, l'espèce était cultivée au Muséum de Paris où elle fleurit depuis 1978.

L'analyse du mode de développement a montré que ce Caféier est typiquement monopodial : les inflorescences sont axillaires, 1-flores et calyculées. Mais deux observations essentielles ont été faites : la production exceptionnelle 1) d'un sommet d'axe long portant 3 inflorescences calyculées dont la centrale est terminale 2) d'une fleur terminale écalyculée au bout d'une pousse latérale. En bref, il y a des cas exceptionnels où l'extinction des potentialités végétatives n'obéit pas à la règle chez l'espèce en cause : ces cas témoignent du mode de développement phylogénétiquement antérieur.

Etant donné cette petite part d'instabilité du mode de développement d'un côté, et surtout la parenté des espèces *P. ebracteolata*, *P. lebruniana* et *P. melanocarpa*, de l'autre côté, on doit admettre que le mode de développement a été un avant d'être double, en d'autres termes qu'il y a eu un ancêtre commun aux trois espèces. Je pense que le *Paracoffea melanocarpa* dérive d'une espèce sympodiale assez proche du *P. lebruniana*.

Donc le critère du mode de développement doit céder la 1ère place à celui de l'organisation florale : les faits imposent ce changement dans la subordination des caractères.

Conséquences : le *C. grevei* doit être considéré plutôt comme un *Coffea*. Par ailleurs, il n'y a plus qu'une différence secondaire entre le *Paracoffea* et le *Psilanthus*, celui-là incluant une espèce monopodiale.

Je propose donc aujourd'hui une classification nouvelle : le genre *Coffea sensu stricto*, strictement africano-malgache, comprend 3 sous-genres :

Coffea (Afrique, Madagascar).

Psilanthopsis (Chevalier) Leroy, *comb. nov.* [= genus *Psilanthopsis* Chevalier, *Rev. Bot. Appl.* XIX : 403 (1939)]. (Afrique).

Baracoffea (Leroy) Leroy [*C.R. Acad. Sc. Paris*, 252 : 2287, 1961]. (Madagascar).
Ce sous-genre couvre en fait le complexe du *C. grevei*.

Le genre *Psilanthus* (y compris les *Paracoffea* africano-asiatiques) étroitement apparenté au *Coffea*, se subdivise en deux sous-genres :

Paracoffea (Miquel) Leroy, *comb. nov.* [= *Coffea* sect. *Paracoffea* Miquel, *Flora Indiae Batavae*, 1856, p. 308]. (Afrique, Asie, Nouvelle-Guinée,...)

et *Psilanthus* (Afrique).

Dans l'un et l'autre genres, il s'est produit une variation parallèle qui a donné les sous-genres *Psilanthopsis* et *Psilanthus*, dont les lobes calicinaux sont très développés et accrescents. On retrouve cette variation même dans un autre genre, l'*Argocoffea*, sous la forme d'une espèce sympodiale encore non décrite de l'Angola, et considérée par CHEVALIER comme un *Psilanthus*. Il est notable que cette variation parallèle

chez les trois genres voisins soit inconnue à Madagascar et en Asie, où le patrimoine génétique semble plus réduit. Elle se retrouve ailleurs chez les Rubiacées-Cinchonoïdées.

Les Caféiers nouveaux de Tanzanie. -

Mrs. BRIDSON a signalé l'existence de deux Caféiers très intéressants en Tanzanie, mais, l'insuffisance du matériel l'empêchant de donner une détermination spécifique, elle s'est bornée à les décrire et à les désigner comme "*Paracoffea* sp. A" et "*? Paracoffea* sp. B", sans écarter la possibilité que le second soit un *Argocoffea* (travaux non encore publiés).

J'ai pu analyser chacun des deux spécimens d'herbier et suis arrivé à la conclusion que ce sont bien des *Paracoffea*, c'est-à-dire des *Psilanthus*, mais ils relèvent de l'ensemble asiatique. Le premier n'est autre que le *Psilanthus bengalensis*. Le second est une espèce nouvelle, donc endémique en Afrique, caducifoliée. On doit penser, donc, que le *Psilanthus bengalensis* est indigène en Afrique de l'Est. Le groupe asiatique est en fait africano-asiatique, et, selon toute probabilité, originaire d'Afrique où la diversité du *Psilanthus* est remarquable, alors que le genre est très homogène en Asie.

Il est extrêmement remarquable que quelques petites espèces de *Coffea* (sous-genre *Baracoffea*) aient encore un développement sympodial et des fleurs ébractéolées, terminales. Ce sont, certes, des Caféiers évolués dans leur adaptation à la sécheresse du Sud du Domaine occidental de Madagascar mais ils semblent encore, par ailleurs, assez proches de l'ancêtre du genre *Coffea*, lequel peut être imaginé ainsi : arbuste petit, buissonnant, entièrement sympodial (à rameaux orthotropes ?) allogame, à fleurs écalculées, terminales, longistylées, à anthères non-sessiles, exsertes, à tube corollin relativement court, à fruits bacciens et feuilles persistantes. Le *Coffea* est un genre endémique de l'aire africano-malgache où il est abondamment diversifié, notamment à Madagascar où, de plus, le sous-genre sympodial est endémique.

C'est à coup sûr dans cette aire que se situe le berceau du genre. Madagascar pourrait être un lieu de refuge ou, mieux, une partie relictuelle du berceau ; c'est de plus un lieu d'actuelle et active différenciation. Hypothèse d'autant plus forte que les espèces de Madagascar et aussi celles de l'Est africain sont à fruits dépourvus ou pauvrement pourvus de caféine, donc peut-être chimiquement primitives. Le *Psilanthus* est une lignée parallèle très conquérante qui a réussi, mais seulement en Afrique, le franchissement de nouveaux degrés d'évolution. Une lignée sympodiale ancestrale, parallèle au *Psilanthus* et au *Coffea* a pu pénétrer en Asie donnant naissance au *Nostolachma* (monopodial) d'aujourd'hui ; une autre restée africaine serait représentée de nos jours par le genre *Argocoffea* (espèces sympodiales et monopodiales).

Conclusion

La classification des Caféiers n'a progressé que très lentement : elle a beaucoup souffert, à mes yeux, de la méthode utilisée, laquelle s'est généralement bornée à une taxonomie ponctuelle et pratique. On ne trouve chez les auteurs aucune préoccupation d'ordre théorique : ceux-ci collent aux faits et sans doute se comportent trop en empiristes. Les cas patents ne manquent pas : je suis consterné, par exemple, de voir à quel point on s'est détourné de la science dans le traitement des caractères aussi essentiels que le calyculé ou la structure de l'inflorescence. L'empirisme a conduit à des descriptions fausses, parfois de façon absolue.

L'étude morphologique des Caféiers a été l'occasion pour moi d'éprouver et de définir une méthode que j'ai appelée par la suite taxonomie syncrétique, c'est une taxonomie intégrative qui tente de fonder la classification sur l'analyse de l'évolution. A l'opposé de la taxonomie numérique, qui, par souci d'objectivité, dénombre les caractères non liés entre eux, et tente de se fonder sur une base de type mosaïque, la taxonomie syncrétique recherche les rapports entre caractères de façon à mettre en évidence les processus d'évolution. La science moderne est assez avancée maintenant sur le plan

de la physiologie et de la biologie, pour qu'on tente de saisir ou de deviner les grands mouvements génétiques de la vie hautement différenciée. Ainsi, loin de l'analyse numérique ou de la statistique qui n'éclairent pas quant aux fonctions, la taxonomie syncrétique prétend prendre solidement pied, et de façon féconde, dans la science contemporaine. Elle s'impose d'ailleurs d'elle-même, en dehors de toute conscience. C'est dans cette voie par exemple que l'étude comparative de la photosynthèse a donné un sens aux observations anatomiques faites sur les stomates dans les Graminées et qu'elle est venue confirmer, par ailleurs, la définition du grand phylum des Caryophyllidées.

Le calyculé des Caféiers ne devient intelligible que dans l'éclairage de la théorie de l'évolution : la différence entre le calyculé du *Psilanthus melanocarpus* et le pseudo-calyculé du *P. lebrunianus* est strictement de l'ordre de la biologie des hormones : quand les potentialités végétatives s'éteignent génétiquement chez le dernier, le *P. melanocarpus* est produit. L'empirisme - non guidé par l'idée - avait conduit à décrire la fleur du *P. lebrunianus* comme calyculée : c'est là une observation de première venue qui eût dû être traitée dans le cadre d'une problématique puisqu'elle était en contradiction avec les faits observés chez le *P. ebracteolatus* ou le *P. bengalensis*.

La taxonomie intégrative s'efforce, compte tenu des progrès de la biologie moderne, d'être une théorie scientifique en constant perfectionnement.

P.S. ASHTON (11) écrit (1979) au sujet des Diptérocarpacées : "All species within a taxon should share at least a pair of characters which are not causally interrelated". Cette opinion est recevable dans la mesure où le taxon est mal connu et où les caractères en question sont les "marqueurs" de deux différences fonctionnelles, mais c'est l'approfondissement de la connaissance biologique qui permettra d'intégrer chacun des caractères à un ensemble fonctionnel : on pourra alors apprécier l'importance des différences.

Le *P. lebrunianus* et le *P. melanocarpus* diffèrent par beaucoup de petits caractères signifiant peu, mais par un seul grand caractère décisif : le premier est sympodial et corrélativement la fleur est écalyculée et terminale ; le second est monopodial et donc à fleurs axillaires, calyculées. Ce sont des espèces étroitement apparentées mais cependant incontestablement distinctes. Il est donc préférable, quand cela est possible, de fonder les espèces sur la comparaison d'un même ensemble intégré de caractères plutôt que sur plusieurs caractères sans rapports entre eux. Tel est l'objectif de la taxonomie syncrétique ou intégrative.

Bibliographie

1. - C.R. Acad. Sc. Paris, sér. D, 291 : 593 (1980).
2. - C.R. Acad. Sc. Paris, sér. D, 252 : 2285 (1961).
3. - Rev. Bot. Appl., XVIII : 836 (1938).
4. - Rev. Bot. Appl., VIII : 540 (1961).
5. - Kew Bull. : 115 (1953).
6. - Engler Bot. Jahrb., 25 : 255 (1898).
7. - A. Chevalier : Les Caféiers du Globe. Lechevalier (Edit.), fasc. III : 120 (1947).
8. - Bull. Jard. Bot. Etat, Bruxelles, XXV : 405 (1955).
9. - C.R. Acad. Sc. Paris, sér. D, 265 : 1373 (1967).
10. - Journ. Agr. Trop. et Bot. Appl., WIV : 276 (1967).
11. - Mém. Mus. Nat. Hist. Nat. Paris, sér. B, Botanique 27, XXVII : 129 (1974).

Cette note a été présentée à Londres, le 19 juin 1980. La forme en est ici modifiée pour tenir compte d'une mienne publication sur le même sujet parue le 13 octobre 1980 (1).

QUELQUES DONNÉES PALYNOLOGIQUES SUR LE GENRE *COFFEA* ET AUTRES GENRES DU CERCLE DES CAFÉIERS

D. LOBREAU-CALLEN

Chargé de Recherche au CNRS*

J.-F. LEROY

Professeur, Directeur du Laboratoire de Phanérogamie du Muséum National d'Histoire Naturelle

et du L.A. 218 du C.N.R.S., Directeur du Laboratoire de Phytomorphologie de l'E.P.H.E.

* Laboratoire de Taxonomie et Ecologie des Flores Tropicales (L.A. 218).

Laboratoire de Phanérogamie du Muséum National d'Histoire Naturelle.

Laboratoire de Phytomorphologie de l'E.P.H.E.

16, rue Buffon, 75005 Paris, France

Le complexe des Caféiers tel qu'il est compris par l'un d'entre nous (Leroy, 1980) est représenté par trois genres : *Coffea*, *Psilanthus*, *Notolachma*.

Dans cette étude nous avons essayé de dégager les bases palynologiques applicables à la systématique de l'ensemble des caféiers : divisions en genres, rapports entre les espèces, évolution du pollen.

En outre, la faible quantité de matériel nécessaire pour les études de cette sorte est un avantage : ainsi l'investigation peut porter sur un plus grand nombre d'espèces et permet en particulier d'envisager une contribution à la recherche des origines des espèces hybridogènes, telle *C. arabica*.

L'étude que nous présentons n'est encore que préliminaire puisque ne portant que sur une cinquantaine d'espèces. L'illustration des pollens étudiés est présentée sous la forme d'un atlas et dans la mesure du possible montre la variabilité de la sculpture exinique.

Liste des Espèces étudiées *

Les binômes retenus dans la présente liste le sont à titre de référence palynologique et le plus souvent aussi (mais non nécessairement) sous l'angle taxonomique. Plusieurs binômes sont des combinaisons nouvelles.

* Seuls figurent les échantillons illustrés.

- Coffea arabica* L. : Ethiopie, Kaffa, Meyer 9060, P (Pl. IV, fig. 7 à 10, 12 à 15). -
Inde, Monts Palmi, Thanikaimoni 1527, P (Pl. IV, fig. 11).
- Coffea arabica* L. x *C. canephora* Pierre cv. 393, hybride naturel triploïde : Côte d'Ivoire,
Bingerville, I.F.C.C. s.n., cultivé (Pl. III, fig. 13 à 16).
- Coffea boiviniana* (Bn.) Drake : Madagascar, Antonibe, Capuron 18851-SF, P (Pl. I, fig.
13 à 17).
- Coffea brevipes* Hiern : Cameroun, Chevalier 33761, P (Pl. III, fig. 7).
- Coffea campaniensis* Leroy : Ile Maurice, Duljeet 109, P (Pl. II, fig. 18 à 21, 23 ; Pl. VI,
fig. 15 à 20) ; Petrin, Leroy s.n., P (Pl. II, fig. 17, 22).
- Coffea canephora* Pierre : Congo belge, Corbiseis-Balaud 905, P (Pl. III, fig. 5, 6 ; Pl.
VI, fig. 18), 929, P (Pl. III, fig. 1 à 4).
- Coffea canephora* Pierre cv. T 79, tétraploïde : Côte d'Ivoire, Bingerville, I.F.C.C. s.n.,
cultivé (Pl. III, fig. 8 à 12).
- Coffea eugenioïdes* Moore : Congo belge, Lebrun 9901, P (Pl. IV, fig. 1 à 6 ; Pl. VI, fig.
22).
- Coffea greveï* Drake : Madagascar, Perrier de la Bâthie 1626, P (Pl. VI, fig. 1 à 5, 24).
- Coffea homolleï* Leroy : Madagascar, Capuron 8596-SF, P (Pl. I, fig. 1 à 4).
- Coffea humbertii* Leroy : Madagascar, Tuléar, Leroy 1-12, P (Pl. VI, fig. 10), 11, P (Pl.
VI, fig. 7, 9, 14, 25), 13, P (Pl. VI, fig. 6, 8).
- Coffea humblotiana* Baill. : Grande Comore, Humblot 412, P (Pl. II, fig. 11, 12 ; Pl. VI,
fig. 27).
- Coffea humilis* Chev. : Côte d'Ivoire, cultivé dans les serres du Muséum National d'Histoire
Naturelle de Paris (Pl. III, fig. 17, 18).
- Coffea kapakata* Hirschfeldt : Angola, Alston, Gossweiler 9958, P (Pl. VI, fig. 11 à 13).
- Coffea kianjavatensis* Leroy : Madagascar, Kianjavato, Leroy 196 B, P, holotype (Pl. I,
fig. 8).
- Coffea lancifolia* Chev. : Madagascar, Réserve Naturelle n° 1 (Betampona), cultivé à
Kianjavato sous les n° A 320-405 (Pl. I, fig. 5 à 7).
- Coffea liberica* Bull ex Hiern : Côte d'Ivoire, Chevalier 15346, P (Pl. III, fig. 19 à
21, 23). - Guinée, Chevalier 12043, P (Pl. III, fig. 22).
- Coffea ligustrioides* Moore : Rhodésie, Chipete Forest, Swynnerton 67, BM, Type (Pl. V,
fig. 4 à 6) ; Mont Silinda, Shirinda Forest, Obermeyer 2178, BM (Pl. V, fig.
1 à 3).
- Coffea macrocarpa* Rich. : Ile Maurice, C.L. Florin, Leroy s.n., P (Pl. II, fig. 2) ; C.L.
Perrier, Vaughan 1605, P (Pl. II, fig. 1, 3, 4 ; Pl. VI, fig. 19).
- Coffea mauritiana* Lam. : Ile de La Réunion, Friedmann 3310, P (Pl. II, fig. 7 ; Pl. VI,
fig. 21) ; Leroy 158, P (Pl. II, fig. 5, 6) ; Richard 392, P (Pl. 22, fig.
8, 9, 10).

- Coffea nufindiensis* Hutch. : Tanagerjika, Iringa Dist., T 7, Carmichael 22, K (Pl. 5, fig. 9 à 12).
- Coffea paolia* Bridson : Kenya, Tana Dist., T 7, Makin 13041 in EA, K (Pl. IV, fig. 16 à 20).
- Coffea pervilleana* (Bn) Drake : Madagascar, Ankarana, Capuron 27364-SF, P (Pl. I, fig. 18 à 22).
- Coffea racemosa* Lour. : Mozambique, N. Hallé & Telma Faria 48, P (Pl. V, fig. 13, 14).
- Coffea salvatrix* Swynnerton & Philipson : Mozambique, Amatongas Forest, Swynnerton & Philipson 53, K (Pl. V, fig. 15, 19). - Rhodésie du Sud, Sitatonga Hills, Swynnerton s.n., BM (Pl. V, fig. 16, 17).
- Coffea* sp.: Ussambara, Monga, Peter 18367, K (Pl. V, fig. 7, 8).
- Coffea tricalysioides* Leroy : Madagascar, Homolle 78, P, holotype (Pl. I, fig. 11, 12 ; Pl. VI, fig. 23).
- Coffea tsaratananensis* Leroy : Madagascar, Tsaratanana, Perrier de la Bâthie 15313, P Type (Pl. I, fig. 9-10).
- Coffea vaughanii* Leroy : Ile Maurice, C.L. Cabinet, Vaughan 3374, P (Pl. II, fig. 13 à 15 ; Pl. VI, fig. 26), 10483, P (Pl. II, fig. 16, 17).
- Coffea zanguebariae* Lour. : Tanzanie, T 8, Vollesen 2982, K (Pl. V, fig. 19, 20).
- Nostolachma densiflora* (Bl.) Dur. : Herb. Richard & Blume s.n., P (Pl. VI, fig. 35 ; Pl. VII, fig. 1 à 3).
- Nostolachma odorata* (Pierre) Leroy, *comb. nov.* (= *Hymenocarpum odoratum* Pierre, Lecomte Flore Générale Indochine, t. 3, fasc. 3 : 339, 1924) : Cambodge, Prov. de Kampot, Pierre 3204 a (Pl. VII, fig. 4).
- Nostolachma triflora* (Korth.) Dur. : Sumatra, Korthals s.n., P (Pl. VI, fig. 17, 34 ; Pl. VII, fig. 5 à 7).
- Nostolachma* sp.: Moluques, Nedi 650, L (Pl. VI, fig. 38).
- Nostolachma* sp. : Nouvelle-Guinée, Brass 12821, P (Pl. VI, fig. 16, 33, 39 ; Pl. VII, fig. 8).
- Nostolachma viridiflora* (Ridl.) Leroy, *comb. nov.* (= *Coffea viridiflora* Ridley, Journ. Roy. Asiat. Soc. on Straits Bot. 74, 1918) : Peninsule Malaise, Selangor, Batu Caves, Ridley s.n., P (Pl. VI, fig. 36-37 ; Pl. VII, fig. 9).
- Psilanthus bengalensis* (Roxb.) Leroy, *comb. nov.* (= *Coffea bengalensis* Roxb., Hort. Bengal. : 15, 1814) : Inde, Hooker s.n., P, 1867 (Pl. VIII, fig. 5 à 7). - Java, Herb. Bogor s.n., P (Pl. VI, fig. 31 ; Pl. VIII, fig. 8). - Kenya, Semsei 3400, K (Pl. VII, fig. 24, 25). - La Réunion (Bourbon), Jardin Botanique, Richard 16, P (Pl. VIII, fig. 9).
- Psilanthus ebracteolatus* Hiern : Guinée française, Chevalier 20718, P (Pl. VI, fig. 29 ; Pl. VIII, fig. 17 à 19 ; s. réf. (Pl. VIII, fig. 20)).

- Psilanthus horsfieldianus* (Miq.) Leroy, *comb. nov.* (= *Coffea horsfieldiana* Miq., Flora Indiae Batavae II : 308, 1855) : Java, Baker 35053, L (Pl. VII, fig. 26).
- Psilanthus lebrunianus* (Germain & Kesl.) Leroy, *comb. nov.* (= *Coffea lebruniana* Germain & Kesler) : Gabon, N. Hallé 2879, P (Pl. VIII, fig. 21), 3084, P (Pl. VI, fig. 30 ; Pl. VIII, fig. 22, 23).
- Psilanthus manni* Hook.f. : Cameroun, Letouzey 3129, P (Pl. VII, fig. 28). - Congo, Sita 4005, P (Pl. VI, fig. 32 ; Pl. VII, fig. 14 à 18). - Gabon, Tisserant 217, P (Pl. VII, fig. 19, 20, 22), 1401, P (Pl. VII, fig. 21-27).
- Psilanthus melanocarpus* (Welw.) Leroy, *comb. nov.* (= *Coffea melanocarpa* Welw. Transact. Linn. Soc. Bot., sér. 2, 1 : 174, 1876) : Angola, Golungo Alto, Welw. 3180, P, Type (Pl. VI, fig. 28 ; Pl. VII, fig. 12, 13, 23 ; Pl. VIII, fig. 24, 25). - Serres du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris, cultivé (Pl. VII, fig. 10, 11).
- Psilanthus merguensis* (Ridl.) Leroy, *comb. nov.* (= *Coffea merguensis* Ridl., Féd. Mal. States Mus. : 96, 1920) : Siam, Kerr 16220, P (Pl. VIII, fig. 10 à 13).
- Psilanthus travancorensis* (Wight & Arn.) Leroy, *comb. nov.* (= *Coffea travancorensis* Wight & Arn., Prodr., t. 1 : 435, 1834) : Inde, Wight s.n., P, 1836 (Pl. VIII, fig. 14 à 16).
- Psilanthus wightianus* (Wall.) Leroy, *comb. nov.* (= *Coffea wightiana* Wall., Cat., n° 6246, 1832) : Inde, Wight 1429, K (Pl. VIII, fig. 1 à 4).

Description du pollen

Le pollen a été acétolysé selon les techniques classiques mises au point par ERDTMAN en 1952. Il a été étudié au microscope photonique (Mph) avec l'objectif immersion x 100 et au microscope électronique à balayage (MeB) après avoir été métallisé à l'or, sous vide.

La terminologie utilisée est celle de FAEGRI & IVERSEN (1964)⁽¹⁾.

(1) - On trouvera la bibliographie complète dans : Index bibliographique, G. Thanikaimoni, 1971-1980, Mémoires et Travaux de l'Institut Français de Pondichéry. Parmi les premières observations du pollen du genre *Coffea* s.l., il faut noter celles de MOENS (1962), de BRONCKERS & DE KEYSER (1964), de KRAUDREN-AYMONIN (1969)... qui ont étudié plusieurs espèces en microscopie photonique.

Le pollen est subsphérique, iso- ou subisopolaire, l'un des triangles polaire pouvant être plus petit, ou les extrémités des sillons soudées à l'un des pôles. L'ornementation est très fine et ne peut être correctement étudiée qu'au microscope électronique à balayage (MeB).

Le tectum ou le mur du réseau est lisse microverruqueux ou micro-rugulé. Les perforations ou mailles du réseau sont de forme variable selon les espèces. La couche infratectale est columellaire (Pl. VI, fig. 18 à 35). La nexine finement endo-sculptée est composée de deux couches, la sole et l'endexine. Cette dernière couche peut être exceptionnellement très réduite ou absente (*P. lebrunianus*, *P. ebracteolatus*).

Les ouvertures sont complexes (schémas 1 à 4), composées de trois parties superposées concentriques et centrées sur l'équateur : une ectoouverture en forme de sillon d'origine tectale, une ouverture moyenne ou mésoouverture elliptique, allongée selon l'axe polaire ou circulaire parfois entourée d'un annulus et localisée dans la sole (LOBREAU-CALLEN, 1978), une endoouverture circulaire, elliptique ou losangique allongée selon l'équateur, située dans l'endexine (Pl. VI, fig. 14 à 17). Chez les grains où l'endexine est très réduite ou absente, seule l'ectouverture est visible (Pl. VIII, fig. 17, 19).

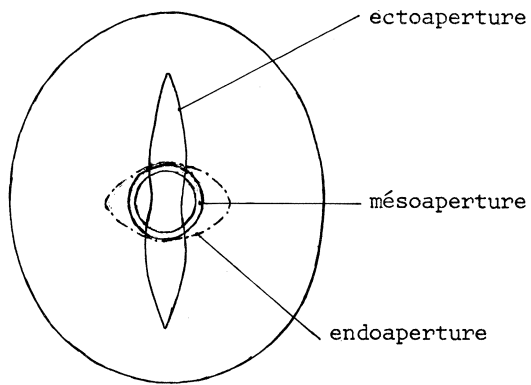
Clé établie d'après les caractères polliniques des espèces diploïdes spontanées

1. Pollen tricolporé dans plus de 60 % des cas. Grains généralement tectés, perforés.
 2. Endoouverture généralement mal délimitée latéralement toujours de petites dimensions ; endexine peu épaisse dans la région aperturale. *Coffea*
 - 2! Endoouverture bien délimitée latéralement, de grandes dimensions, le pollen tendant à être zonicolporé ; endexine épaisse notamment dans la région aperturale. *Nostolachma*
- 1! Pollen tétra- ou pentacolporé dans plus de 60 % des cas. Grains fréquemment réticulés. *Psilanthus*

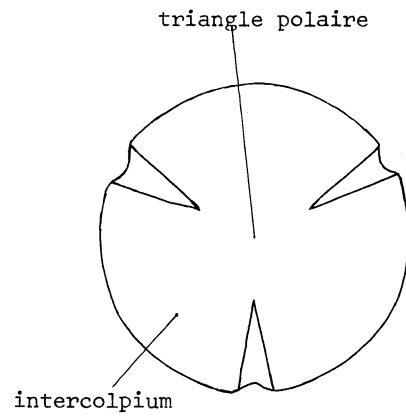
Description du pollen du genre *Coffea* (Pl. I à VI)

Le pollen est isopolaire, tricolporé, rarement tétracolporé (sauf espèces polyploïdes, hybrides... Pl. III, fig. 8 à 16 ; Pl. IV, fig. 7 à 15).

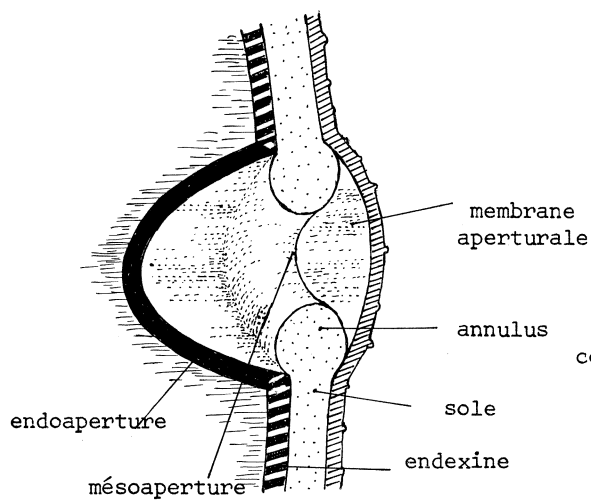
Exine : le tectum est généralement perforé, mais dans de rares cas, il tend à être réticulé (grandes perforations chez *C. arabica* p.p., *C. ligustrioides*, *C. salvatrix* p.p.). Les perforations sont petites, arrondies et rares ou absentes chez *C. humilis*, *C. macrocarpa*, *C. mauritiana*, *C. racemosa*..., circulaires chez *C. humblotiana*, *C. kianjavatensis*, *C. tricalysioides*, *C. tsaratananensis*, *C. vaughanii*..., plus ou moins allongées chez *C. campaniensis*, *C. lancifolia*, *C. paolia*..., anguleuses et allongées chez *C. arabica* p.p., *C. canephora*, *C. grevei*, *C. homollei*, *C. kapakata*...



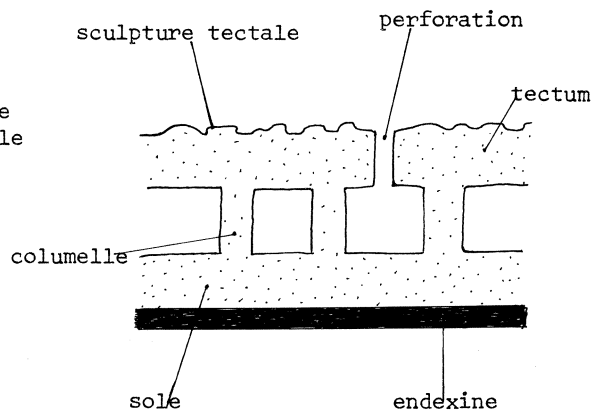
1 - Aperture complexe vue de face



2 - Vue polaire d'un grain tricolporé



3 - Coupe longitudinale passant de l'ectoaperture par l'axe principal



4 - Structure de l'exine

Entre les perforations, le mur est lisse (*C. kapakata* par exemple), microverruqueux (*C. humbertii*, *C. macrocarpa*, *C. mauritiana*...), microrugulostrié (*C. campaniensis*, *C. ligustrioides*, *C. nufindiensis*, *C. paolia*, *C. vauhanii*...) ; parfois l'exine tend à être insulée, le mur étant épaissi : *C. liberica*, *C. campaniensis*, *C. paolia*, *C. vauhanii*...

Lorsque les perforations sont très allongées, l'exine paraît alors rugulo-striée : *C. canephora*, *C. grevei*, *C. homollei*, *C. humbertii* p.p. ... Chez *C. liberica*, *C. paolia* au fond des perforations allongées on peut observer plusieurs petites perforations plus ou moins circulaires.

La couche infratectale (Pl. VI, fig. 18 à 27) est homogène et les columelles sont généralement courtes, de petit diamètre, souvent de 0,2 à 0,3 µm et nombreuses, tout particulièrement chez les espèces malgaches. Toutefois, il faut remarquer que les columelles sont plus grosses et moins nombreuses chez les espèces *C. humilis*, *C. kapakata*, *C. ligustrioides*, *C. salvatrix*.

Apertures : elles sont toujours complexes et constituées de deux ou trois parties. L'ectoaperture est un sillon allongé, aux extrémités aiguës, parfois dichotomiques, libres ou soudées (parasyncolpie). Lorsqu'il y a parasyncolpie, l'apocolpium a la même ornementation que l'intercolpium. L'aperture moyenne est généralement elliptique ou circulaire. L'endoaperture est losangique lorsqu'elle est distincte (*C. campaniensis*), mais le plus souvent ses limites latérales sont indistinctes.

Le genre *Coffea* est scindé en trois sous-genres : *Coffea*, *Psilanthopsis* et *Baracoffea*.

Le sous-genre *Coffea* qui est le plus important par le nombre des espèces qu'il renferme peut être scindé en trois groupes correspondant à la répartition géographique des espèces selon les divisions de A. CHEVALIER :

1° - *Mascarocoffea* : le tectum est plus ou moins perforé, souvent microéchinulé ou microverruqueux, lisse, microstrié ou à la fois microstrié et microverruqueux. Les perforations sont petites, circulaires, parfois anguleuses. La tendance à avoir une exine microrugulée est peu marquée. Les columelles sont fines et nombreuses. Les apertures présentent soit trois parties, soit deux seulement. L'aperture moyenne peut être ou non entourée d'un annulus.

Le pollen de deux séries seulement a été observé en partie : *Verae*, *Mauritanae* et aussi celui de quelques autres espèces malgaches :

a - *Verae* (Pl. I, fig. 1 à 12).

Les pollens des deux espèces *C. tsaratananensis* et *C. tricalysioides* sont identiques. Ceux de *C. kianjavatensis* et de *C. homollei* présentent également des caractères communs, tectum perforé à mur lisse, perforations circulaires et anguleuses particulièrement nettes chez *C. homollei*. L'exine tectée, aréolée, perforée à mur légèrement microstrié de *C. lancifolia* isole le pollen de cette espèce de celui des autres précédemment envisagés.

b - *Mauritanae* (Pl. II).

Le pollen de *C. mauritiana* et celui de *C. macrocarpa* sont affines bien que la variabilité de l'ornementation chez *C. mauritiana* soit beaucoup plus importante que chez *C. macrocarpa*. Celui de *C. humblotiana* est très proche des grains de *C. macrocarpa* par son ornementation densément microverruqueuse ; mais les perforations tectales relativement nombreuses distinguent les grains de cette espèce. Chez *C. vauhanii*, les microverruques sont moins bien différenciées, le tectum tend à être aréolé, perforé et l'exine entre les perforations est microstriée. Cette espèce est proche de *C. mauritiana* où cette ornementation se rencontre parfois. Chez *C. campaniensis* cette sculpture exinique est comparable et plus accentuée ; par contre le pollen a de plus petites dimensions.

Dans toutes les espèces de cette série, les perforations tectales sont arrondies plus ou moins régulières et circulaires. Les ouvertures ont généralement trois parties de contours bien distincts les uns des autres. *C. campaniensis* est la seule que nous ayons observée dans le genre *Coffea* où l'endoouverture losangique, est bien délimitée latéralement. De plus l'ouverture moyenne est généralement entourée de deux petits demi-annulus sous la membrane aperturale.

c - Autres espèces (Pl. I, fig. 13-22).

Chez *C. pervilleana*, l'exine est tectée perforée et tend à être rugulée ; le mur est lisse. Chez *C. boiviniana*, par contre le mur est microverruqueux et légèrement microstrié. Le pollen de ces deux espèces est distinct, mais il est possible qu'elles se classent dans deux sous-séries distinctes.

2° - Espèces de l'Ouest africain (Pl. III).

Le pollen est tecté, plus ou moins perforé. Les perforations de forme variable sont allongées ou étoilées donnant ainsi un aspect microrugulé à l'exine (*C. canephora*). Le mur épaissi entre les perforations (à l'exception de *C. canephora* et de *C. kapakata*) est souvent lisse dans certains grains et microéchinulé ou microverruqueux dans d'autres grains, tous issus de la même fleur (ex. *C. liberica*). Chez *C. humilis*, les perforations sont relativement rares et fines. Les columelles sont relativement fines et bien distinctes, à l'exception de celles de *C. humilis* qui ont un diamètre de 0,5 μ m et sont moins nombreuses.

Les trois ouvertures concentriques ne sont visibles que chez *C. canephora*. L'ouverture moyenne est généralement entourée d'un annulus.

C. brevipes, *C. humilis* et *C. liberica* ont un pollen comparable où le tectum microverruqueux ou microéchinulé est \pm épaissi entre les perforations qui sont régulières.

Chez *C. canephora* les microverrues sont peu nombreuses, parfois mêmes absentes. Parmi les espèces étudiées c'est du pollen de *C. brevipes* que celui de *C. canephora* se rapproche le plus.

3° - *Mozambicoffea* (Pl. IV-V).

Le pollen dans ce groupe présente plusieurs tendances.

Le tectum plus ou moins régulièrement perforé et les murs microstriés chez *C. ligustrioides*, *C. nifindiensis*, *C. paolia* rapproche ces espèces de celles des *Mascarocoffea* telles que *C. boiviniana*, *C. vaughanii*... Le tectum \pm largement perforé de *C. salvatrix* et de *C. zanguebariae* rappelle celui de *C. homollei* également dans les *Mascarocoffea*. Par contre le tectum épaissi et le système complexe de perforations tectales chez *C. paolia* rapproche cette espèce de celles de l'Ouest africain telle que *C. liberica*.

L'exine microrugulée et finement perforée de *C. eugenioides* et de *C. sp.* (Peter 18367, K) ⁽¹⁾ rapproche ces espèces de celles du groupe *Canephora* et des *Mascarocoffea* (*C. pervilleana*). *C. racemosa* avec son pollen à tectum finement et rarement

(1) - Le genre *Coffea* est actuellement en cours de révision par D. BRIDSON pour les espèces de l'Est africain.

perforé, à peine ornementé rappelle d'une part *C. humilis* parmi les espèces ouest-africaines, d'autre part *C. macrocarpa* chez les *Mascarocoffea* où le tectum est toutefois plus rarement perforé. *C. humilis*, *C. ligustrioides* et *C. salvatrix* ont de grosses columelles de 0,5 µm de diamètre comme certaines espèces ouest-africaines telles que *C. kapakata*.

Les espèces *C. nufindiensis* et *C. ligustrioides* sont palynologiquement affines : les dimensions du pollen, la répartition des perforations, l'ornementation du mur sont semblables. Un tel rapprochement est confirmé par les observations de D. BRIDSON sur la morphologie florale et les fruits (communication personnelle).

Les trois ouvertures sont particulièrement bien représentées chez *C. ligustrioides* où l'ouverture moyenne tend à être entourée d'un annulus.

En outre, les *Mozambicoffea* présentent de nombreux rapports avec les *Mascarocoffea* comme CHEVALIER (1947) l'avait déjà noté, et apparaissent palynologiquement comme intermédiaires entre les espèces de *Coffea* de l'Ouest-africain et celles de Madagascar et des Mascareignes.

En conclusion le pollen des *Mozambicoffea* paraît hétérogène et entraîne à considérer le groupement comme relativement artificiel.

Cas du *Coffea arabica*

L'espèce *C. arabica* appartient également au sous-genre *Coffea*. Bien que probablement originaire d'Ethiopie ou du Kenya, donc de l'Est-africain, cette espèce a toujours été classée parmi celles de l'Ouest-africain, plusieurs de ses caractères botaniques étant proches de ceux de *C. canephora*.

Le *C. arabica* est probablement un allotétraploïde donc d'origine hybride et constitué de deux sous-génomés (DEMARLY, 1975 ; CHARRIER, 1978). Comme prévisible le pollen en est extrêmement variable (Pl. IV, fig. 7 à 15) : il y a deux types extrêmes reliés par une série d'intermédiaires. Nombreux sont les grains tétracolporés, et de relativement grandes dimensions ; la symétrie des grains est souvent altérée par des distorsions dans la disposition des ouvertures dont par ailleurs le nombre tend à augmenter. Remarques souvent déjà notées en ce qui concerne les espèces polyploïdes en général (VAN CAMPO, 1966) (Pl. III, fig. 9 à 12). En outre un certain nombre de grains sont avortés ou mal conformés par suite d'incidents à la méiose. Ce sont là des caractères polliniques de plantes hybrides F₁ notamment (Pl. III, fig. 13 à 16). Ces observations sont les mêmes que celles exprimées par VAN CAMPO (1966) relativement à d'autres groupes systématiques. Cette variabilité pollinique est donc comparable à celle que l'on observe chez les hybrides F₁ ou F₂, F₃... non fixés.

Nos observations ont porté principalement sur un matériel provenant d'Ethiopie, contrée, où l'espèce est encore représentée par des éléments probablement spontanés et où la variabilité génétique présente une ampleur exceptionnelle. Les deux types polliniques extrêmes, pourraient à notre avis, porter des caractères morphologiques hérités des parents.

Les deux types polliniques extrêmes sont bien distincts :

1 - Le pollen mesure 28 µm environ selon l'axe polaire ; le tectum est perforé, les perforations étant arrondies ou le plus souvent anguleuses et l'exine tendant à être rugulée ; le mur est lisse ou présente quelques microverrues ; les columelles sont relativement fines. Les ouvertures présentent généralement trois parties, l'endoouverture est mal délimitée latéralement, la mésoouverture est entourée d'un annulus qui peut être relativement net (Pl. IV, fig. 7 à 10).

Parmi les espèces étudiées ce type pollinique - où le mur entre les perforations est droit - est plutôt comparable à celui du *C. canephora* (Pl. III, fig. 4), qu'à celui du *C. eugenioides* dont le mur est ondulé (Pl. IV, fig. 3).

2 - Le pollen mesure 34 µm selon l'axe polaire ; le tectum est tantôt largement perforé et tendant à être réticulé (Pl. IV, fig. 14-15), tantôt finement et rarement per-

foré (Pl. IV, fig. 12-13) ; les perforations sont irrégulières et de contour variable. Le mur entre les perforations est microstrié. Les columelles sont nettes. Les apertures sont composées de deux ou trois parties et l'annulus de l'aperture moyenne semble peu distinct.

Parmi les espèces étudiées jusqu'à ce jour, ce type pollinique se rapproche plus par la sculpture microstriée de l'exine, de celui du *C. paolia* que de celui du *C. ligustrioides* ou du *C. nufindiensis*. En outre le *C. ligustrioides* présente des caractères macromorphologiques distincts du *C. arabica* dont il est géographiquement très éloigné le *C. nufindiensis* est exigeant en humidité contrairement au *C. arabica*. L'exine du *C. paolia* est nettement épaissie entre les perforations alors que chez *C. arabica* ces épaississements semblent plus discrets mais réapparaissent dans un croisement *C. arabica* x *C. canephora* (Pl. III, fig. 16). De plus, le *C. paolia* est géographiquement le plus proche du *C. arabica* et est comme celui-ci la seule autre espèce du genre qui soit xérophytique.

Le pollen du *C. canephora* cultivar tétraploïde a un tectum plus largement perforé que celui de la forme diploïde (Pl. III, fig. 4, 8).

Un croisement entre *C. canephora* et *C. arabica* nous donne deux grands types polliniques :

- Le premier, rare et bien caractéristique où le tectum tend à être aréolé (Pl. III, fig. 16) et qui rappelle les grains du *C. paolia*,

- Le second, très fréquent où le tectum est plus ou moins largement perforé et rugulé (Pl. III, fig. 14, 15) qui est comparable aux grains du *C. canephora*.

Il serait intéressant de voir, si expérimentalement un croisement entre le *C. canephora*, espèce de régions plus ou moins humides, et le *C. paolia*, espèce de régions sèches, est possible et s'il existe ou non une barrière génétique entre elles.

Subgen. *Baracoffea* (Pl. VI, fig. 1 à 10). (cf. Leroy, article précédent).

Ce sous-genre strictement malgache n'est représenté que par des "petites espèces". Notre étude a porté sur deux d'entre elles : *C. grevei* et *C. humbertii*.

Les pollens sont très proches. L'exine varie de tectée, perforée, lisse à microverruqueuse et les perforations sont soit triangulaires, soit très allongées, donnant à l'exine un aspect rugulé. Les apertures ne présentent que deux parties.

Subgen. *Psilanthopsis* (Pl. VI, fig. 11 à 13). (cf. Leroy, article précédent).

Une seule espèce (ouest-africaine) : *C. kapakata*.

Le pollen, de grandes dimensions, a une exine tectée perforée. Le mur, entre les perforations est lisse et les perforations sont plus ou moins anguleuses et allongées, donnant ainsi un aspect rugulé à l'exine. Les columelles sont bien distinctes comme chez *C. humilis*. Les apertures ne montrent que deux parties.

L'exine de *C. kapakata* rappelle celle de *C. canephora*.

Description du pollen de *Nostolachma* (Pl. VI, fig. 33 à 39 ; Pl. VII, fig. 1 à 9).

Le pollen est tricolporé exceptionnellement tétracolporé, isopolaire, équiaxe à faiblement longiaxe.

Exine : le tectum est perforé ou réticulé selon les espèces. Le tectum est perforé chez *N. sp.* (Brass 12821, L, P) et *N. sp.* (Nedi 650, L) ; les perforations sont circulaires. L'exine est réticulée avec des mailles plus ou moins anguleuses chez *N. densiflora* et *N. odorata* ; les mailles sont circulaires et le mur bien régulier à l'équateur chez *N. triflora* et *N. viridiflora*.

Les columelles sont fines et le mur est duplicolumellé chez les espèces tectées perforées (Pl. VI, fig. 33). Par contre chez les espèces à pollen réticulé telles que *N. triflora* et *N. densiflora* les columelles (Pl. VI, fig. 34-35) sont nettes et ont un diamètre de 0,5 μm . L'endexine est épaisse.

Apertures : les apertures sont complexes et présentent toujours trois parties concentriques et de contour très différent (Pl. VI, fig. 16-17). L'endoaperture est bien individualisée losangique ou subelliptique très longue et allongée selon l'équateur, principalement chez les espèces à exine tectée perforée ou finement réticulée. L'aperture moyenne est elliptique chez *N. densiflora*, *N. triflora*, ou subcirculaire chez *N. sp.* (Brass 12821, L, P), *N. sp.* (Nedi 650, L), *N. viridiflora*, *N. odorata*. Elle est entourée d'un annulus plus ou moins bien développé chez *N. sp.* (Brass 12821, L, P) et *N. sp.* (Nedi 650, L).

Clé

1. Pas d'annulus ; mésoaperture plus ou moins nette parfois réduite à une fente (*N. densiflora*, *N. triflora*) ; endoapertures losangiques ; réseau.
2. Exine réticulée, nettement simplicolumellée à mailles anguleuses.
 3. Mésoaperture circulaire ; petit pollen de 22 μm *N. odorata*
 - 3! Mésoaperture réduite à une fente ou elliptique ; pollen de 28 μm *N. densiflora*
 - 2! Exine finement réticulée à mailles circulaires et mur régulier à l'équateur.
 4. Mésoaperture subcirculaire ou elliptique ; petit pollen de 23 μm *N. viridiflora*
 - 4! Mésoaperture réduite à une fente ; pollen de 39 μm *N. triflora*
- 1! Annulus autour de la mésoaperture ; endoapertures subelliptiques très allongées à l'équateur et presque jointives ; tectum perforé.
 5. Mésoaperture subcirculaire ou elliptique ; pollen de 23 μm ; perforations elliptiques allongées parallèlement à l'axe polaire. *N. sp.*
(Brass 12821, L, P)
 - 5! Mésoaperture circulaire ; pollen de 19,5 μm ; perforations circulaires et elliptiques régulièrement réparties *N. sp.*
(Nedi 650, L)

Description du pollen du *Psilanthus* (Pl. VII, fig. 10 à 28 ; Pl. VIII).

Le pollen est iso- ou subisopolaire, tétracolporé, tétracolporoïde ou tétracolpé (*P. ebracteolatus*, *P. lebrunianus*), parfois penta-aperturé ou plus, rarement tricolporé (jusqu'à 40 % des grains dans *P. manni* et *P. bengalensis*), subsphérique équiaxe ou longiaxe (faiblement).

Exine : elle est généralement réticulée, les mailles étant fréquemment anguleuses ou tectée ; perforée chez les trois espèces : *P. bengalensis*, *P. horsfieldianus* et *P. wightianus*. Le réseau est simplicolumellé ou bien le mur du tectum entre les perforations est pluricolumellé. Le mur est lisse dans la plupart des espèces et finement verruqueux chez *P. bengalensis*, *P. horsfieldianus*, *P. merguensis*.

Les columelles sont bien nettes et ont un diamètre de 0,5 µm environ.

Apertures : elles sont composées dans la plupart des cas et présentent 3 parties chez *P. bengalensis*, *P. manni*, *P. melanocarpus*, *P. madurensis*, *P. horsfieldianus*, *P. wightianus* ; 2 parties chez *P. travancorensis*, *P. merguensis* ainsi que chez *P. ebracteolatus* p.p. et *P. lebrunianus* p.p. selon les échantillons étudiés. Parfois nous n'avons observé qu'un simple sillon chez *P. ebracteolatus* et *P. lebrunianus*.

L'endoaperture n'est distinctement losangique que chez *P. wightianus* visible uniquement sous la membrane aperturale chez les autres espèces. L'aperture moyenne est généralement elliptique, parfois extrêmement réduite ou absente (*P. travancorensis*, *P. merguensis*, *P. ebracteolatus*, *P. lebrunianus*). Nous n'avons pas observé d'annulus entourant l'aperture moyenne dans le genre *Psilanthus*.

Le genre *Psilanthus* est scindé en deux sous-genres *Psilanthus* en Afrique et *Paracoffea* depuis l'Afrique jusqu'en Océanie.

Subgen. *Psilanthus* : *P. manni*.

L'exine est réticulée et le mur du réseau est de largeur très irrégulière parfois le mur est absent entre les columelles.

Subgen. *Paracoffea*. (cf. Leroy, article précédent).

L'exine est réticulée avec un mur extrêmement régulier chez *P. melanocarpus* l'exine tendant à être microrugulostriée, ou plus ou moins régulier et ondulé chez les autres espèces. Lorsque l'exine est tectée perforée, les perforations sont étroites et allongées parfois arrondies chez *P. bengalensis*, plus ou moins circulaires ou elliptiques chez *P. madurensis* et régulièrement réparties ; les perforations peuvent être rangées selon un réseau, l'exine étant ainsi nettement aréolée (*P. wightianus*).

Par sa sculpture exinique le pollen de *P. melanocarpus* est proche de *P. manni*.

Les quatre autres espèces à exine réticulée avec un mur ondulé se regroupent selon les apertures : *P. travancorensis* et *P. merguensis* ont des apertures internes petites mais bien distinctes, *P. merguensis* se distinguant de l'autre espèce par son pollen de plus grandes dimensions ($P = 25,5 \mu\text{m}$) et son mur microéchinulé ; *P. ebracteolatus* et *P. lebrunianus* ont des apertures internes exceptionnellement distinctes et de hautes columelles de 1 µm.

Parmi les échantillons de *P. bengalensis* étudiés il faut noter les plus grandes dimensions de ceux d'Océanie et l'identité morphologique des grains issus d'Afrique avec ceux d'Inde.

Clé

1. Columelles de moins de 1 μm de haut ; deux ou trois apertures concentriques de contour différent.
 2. Exine réticulée.
 3. Mailles anguleuses ; mur anguleux.
 4. Mur de largeur très irrégulière. *P. manni*
 - 4! Mur de largeur très régulière. *P. melanocarpus*
 - 3! Mailles subtriangulaires et mur ondulé.
 5. Mur lisse. *P. travancorensis*
 - 5! Mur microverruqueux. *P. merguensis*
 - 2! Exine tectée perforée
 6. Exine aréolée ou tectum perforé, perforations irrégulières. *P. wightianus*
 - 6! Exine régulièrement perforée, mur large.
 7. Perforations étroites et allongées. *P. bengalensis*
 - 7! Perforations circulaires ou elliptiques. *P. horsfieldianus*
- 1! Columelles de 1 μm de haut ; une ouverture visible exceptionnellement ; pollen colporeïdé ; exine réticulée.
 8. Columelles disposées légèrement en quinconce sous le mur étroit, ces dernières paraissant saillantes..... *P. ebracteolatus*
 - 8! Columelles bien alignées sous le mur. *P. lebrunianus*

Conclusion

Les pollens à annulus ne se rencontrent que dans les genres *Coffea* et *Nostolachma*. Il s'agit généralement de grains tricolporés de petite taille avec de courtes columelles, un tectum perforé, une endexine épaisse. En outre les fleurs ont un style exsert.

Dans ces mêmes genres, ainsi que chez le *Psilanthus*, les pollens totalement dépourvus d'annulus sont généralement ceux qui ont de grosses columelles, une exine tendant à être réticulée ou nettement réticulée, un nombre d'ouvertures complexes souvent supérieur à trois. De plus, les fleurs ont un style subinclus ou totalement inclus.

Ces observations nous conduisent donc à penser que dans cet ensemble de genres, les pollens à ornementation nette, à columelles hautes et larges, à endexine réduite, à nombreuses ouvertures complexes, mais aussi dépourvus d'annulus sont dérivés. D'autre part, le petit pollen tricolporé à annulus, à columelles courtes, tectum perforé, endexine épaisse est le moins hautement différencié. Ces résultats sont comparables à ceux que l'un d'entre nous avait déjà donnés pour d'autres groupes systématiques ainsi que dans les Rubiaceae (LOBREAU-CALLEN, 1975, 1978). En outre, dans le genre *Coffea s.l.* accompagnant l'augmentation de complexité de l'ectexine et la réduction de l'endexine, il y a réduction et perte de l'annulus et même de l'ouverture moyenne.

En conclusion, l'étude du pollen des Caféiers permet généralement :

- De séparer par les seuls caractères de celui-ci les trois genres *Coffea*, *Psilanthus*, *Nostolachma*,
- D'une part d'établir la variation pollinique et son ampleur chez le *C. arabica*, et d'autre part d'esquisser une recherche sur l'origine de cette espèce allotétraploïde,
- De suggérer des rapports phylogénétiques entre les pollens des trois genres.

Remerciements

Le matériel étudié provient des Herbiers du British Museum, de Kew, de Leiden et de Paris. Nous tenons à remercier MM. les Conservateurs de ces Institutions qui ont mis ce matériel d'étude à notre disposition.

Les observations en microscopie photonique et électronique ont été réalisées grâce à l'assistance de Mademoiselle CHALOPIN. Celles au microscope électronique à balayage ont été exécutées par Mademoiselle WEBER à l'Institut de Paléontologie du Muséum (dirigé par Monsieur le Professeur LEHMAN) et par Monsieur CLEMENT, du Laboratoire de Géologie (dirigé par Monsieur le Professeur LECLAIRE).

Bibliographie

- BRONCKERS, F. & DE KEYSER, B., 1964. - Rubiaceae in Van Campo & al., Palynologie africaine, Bull. Inst. Français Afr. Noire, sér. A, t. 26, n° 4, pl. 115-118.
- CHARRIER, A., 1978. - La structure génétique des Caféiers spontanés de la région malgache, *Macarocoffea*. Leurs relations avec les Caféiers d'origine africaine (*Eucoffea*), Mémoires ORSTOM n° 87, 223 p.
- CHEVALIER A., 1947. - Les caféiers du Globe, fasc. III, Encyclopédie biologique, vol. 28, 357 p.
- DEMARLY, Y., 1975. - Amélioration du Caféier liée aux progrès génétiques. 7e Col. Int. Chimie Cafés, Hambourg (9-14 juin 1975), ASIC : 423-436.
- FAEGRI, K. & IVERSEN, J., 1964. - Text book of Pollen Analysis, Scandinavian University Books Munksgaard, 2e éd., 237 p.
- KERAUDREN-AYMONIN, M., 1969. - Rubiaceae in Palynologica Madagassica et Mascarenica, fam. 184-188, Pollen et Spores, vol. II, n° 2 : 299-332.
- LEROY, J.F., 1980. - Evolution et taxogenèse chez les Caféiers (*Coffea* L., *Psilanthus* Hook. f. et *Nostolachma* Durand). Hypothèse sur leur origine. C.R. Acad. Sc. Paris, sér. D, t. 291 : 593-596.
- LOBREAU-CALLEN, D., 1978. - L'aperture composée des Rubiaceae. Ann. Mines Belgique, n° 2 : 167-173.
- MOENS, P., 1962. - Observations sur le pollen de quelques espèces du genre *Coffea* et de certains genres voisins (Rubiaceae). Pollen et Spores, vol. 4, n° 1 : 47-64.
- VAN CAMPO, M., 1966. - Variations polliniques intraflorales. Adansonia, sér 2, 6 (1) : 55-64.

Planche I : *Coffea* subg. *Coffea*
(espèces de Madagascar)

- Fig. 1 à 4 : *C. homollei* Leroy : 1, vue polaire x 2700 ; 2, aperture complexe de face x 1200 ; 3, détail de l'aperture x 6000 ; 4, tectum perforé x 5500.
- Fig. 5 à 7 : *C. lancifolia* Chev. : 5, triangle polaire x 1100 ; 6, aperture complexe de face x 2700 ; 7, tectum x 5000.
- Fig. 8 : *C. kianjavatensis* Leroy : triangle polaire x 5500.
- Fig. 9, 10 : *C. tsaratananensis* Leroy : 9, triangle polaire x 1100 ; 10, détail du triangle polaire x 5500.
- Fig. 11, 12 : *C. tricalysioides* Leroy : 11, aperture complexe de face x 1100 ; 12, détail de l'aperture et du tectum x 5500.
- Fig. 13 à 17 : *C. boiviniana* (Bn) Drake : 13, aperture complexe de face x 2000 ; 14, détail x 4000 ; 15, tectum perforé et microrugulo-strié vers un sillon x 8000 ; 16, tectum dans un intercolpium x 8000 ; 17, triangle polaire x 1500.
- Fig. 18 à 22 : *C. pervilleana* (Bn) Drake : 18, triangle polaire x 1500 ; 19, intercolpium x 1500 ; 20, tectum perforé x 10000 ; 21, aperture complexe de face x 1500 ; 22, détail, noter l'annulus x 4000.

Planche II : *Coffea* subg. *Coffea*, ser. *Mauritianae*

- Fig. 1 à 4 : *C. macrocarpa* Rich. : 1, intercolpium x 4000 ; 2, triangle polaire x 6000 ; 3, tectum dans un intercolpium x 5000 ; 4, vue polaire x 1900.
- Fig. 5 à 10 : *C. mauritiana* Lam. : 5, triangle polaire x 4000 ; 6, 7, tectum microverruqueux ou microrugulé variant d'un échantillon à l'autre, 6 x 10000, 7 x 5600 ; 8, aperture complexe de face x 1650 ; 9, détail, noter l'annulus x 6000 ; 10, triangle polaire x 1700.
- Fig. 11, 12 : *C. humblotiana* Baill. : 11, aperture complexe de face x 1100 ; 12, détail x 2800.
- Fig. 13 à 16 : *C. vauhanii* Leroy : 13, aperture complexe de face x 1700 ; 14, triangle polaire x 1700 ; 15, détail du tectum microéchinulé, perforé x 4250 ; 16, membrane apertural x 4000.
- Fig. 17 à 23 : *C. campaniensis* Leroy : 17, aperture complexe de face, noter l'annulus x 4000 ; 18, aperture complexe de face x 1650 ; 19, intercolpium x 1600 ; 20, détail au niveau de l'aperture x 5000 ; 21, tectum aréolé, perforé, microéchinulé et microrugulé x 3500 ; 22, tectum microéchinulé chez un autre échantillon x 4000 ; 23, couche infratectale columellaire x 5500.

Planche III : *Coffea*, subg. *Coffea*
(espèces de l'Ouest africain)

Fig. 1 à 6 : *C. canephora* Pierre, diploïde spontané : 1, intercolpium x 2000 ; 2, triangle polaire x 2000 ; 3, détail du tectum x 4000 ; 4, tectum dans un intercolpium x 10000 ; 5, membrane aperturale et tectum x 5600 ; 6, tectum perforé x 5600.

Fig. 7 : *C. brevipes* Hiern : détail de l'exine, tectum perforé, microéchinulé x 6000.

Fig. 8 à 12 : *C. canephora* Pierre cv. T 79, forme tétraploïde obtenue par culture : 8, tectum plus ou moins microverruqueux et plus largement perforé (tendant à être réticulé) que dans la forme diploïde x 5600 ; 9, 10, variations dans la symétrie et augmentation du nombre ou de la surface des apertures, 9 x 560, 10, x 840 ; 11, détail de l'exine à l'aperture et au bord des sillons, tectum avec de larges perforations irrégulières x 3000 ; 12, détail d'une exine tectée, plus ou moins rugulée x 5600.

Fig. 13 à 16 : *C. canephora* Pierre x *C. arabica* L. cv. 393, hybride naturel triploïde : 13, aperture complexe de face x 1800 ; 14 à 16, variations dans la sculpture de l'exine : 14, tectum perforé x 5600, 15, tectum perforé et rugulé x 5600, 16, tectum rugulé tendant à être aréolé, microverruqueux; ce type ornemental est le moins fréquent x 5600.

Fig. 17, 18 : *C. humilis* Chev. : 17, intercolpium x 1500 ; 18, détail de l'exine à l'aperture x 4000.

Fig. 19 à 23 : *C. liberica* Bull : 19, aperture complexe de face x 2000 ; 20, triangle polaire x 2000 ; 21, intercolpium x 1800 ; 22, tectum microverruqueux x 5600 ; 23, tectum lisse, rugulé tendant à être aréolé x 15500.

Planche IV : *Coffea*, subg. *Coffea*
(espèces de l'Est africain)

Fig. 1 à 6 : *C. eugenioides* Moore : 1, vue polaire x 1500 ; 2, apertures et tectum x 6000 ; 3, tectum x 10000 ; 4, intercolpium x 1500 ; 5, détail du triangle polaire x 4000 ; 6, membrane aperturale x 6000.

Fig. 7 à 15 : *C. arabica* L. : 7, intercolpium d'un grain tricolporé x 1600 ; 8, aperture complexe, noter l'annulus saillant x 4000 ; 9, tectum perforé dans un intercolpium x 4000 ; 10, tectum largement perforé d'un autre grain x 10000 ; 11, grain parasyncolpé ; 12, grain tétracolporé, tecté, microrugulé x 1500 ; 13, détail de l'ornementation tectale x 4000 ; 14, vue polaire d'un grain tétracolporé x 1500 ; 15, détail de l'exine presque réticulée et microrugulée striée sur le mur x 4000.

Fig. 16 à 20 : *C. paolia* Bridson : 16, tectum rugulé et perforé, à mur microrugulo-strié x 10000 ; 17, intercolpium x 1500 ; 18, détail de l'exine vers le pôle et membrane aperturale x 4000 ; 19, vue subpolaire x 1500 ; 20, membrane aperturale microverruqueuse x 4000.

Planche V : *Coffea* subg. *Coffea*
(espèces de l'Est africain)

- Fig. 1 à 6 : *C. ligustrioides* Moore : 1, aperture complexe de face x 1500 ; 2, sillon et tectum perforé, microrugulé x 4000 ; 3, tectum perforé, microrugulo-strié rappelant un peu l'ornementation crotonoïde x 10000 ; 4, annulus étroit x 4000 ; 5, vue polaire x 1500 ; 6, détail de l'exine dans ce cas largement perforée et microrugulée x 3000.
- Fig. 7, 8 : *C. sp.* (Peter 18367, K, Monga) : 7, aperture de face x 2000 ; 8, tectum perforé à mur ondulé entre les perforations x 10000.
- Fig. 9, 10 : *C. nufindiensis* Hutch. : 9, vue polaire x 1500 ; 10, détail du tectum perforé et microrugulo-strié x 6000 ; 11, aperture complexe de face x 1400 ; 12, détail de l'exine à l'aperture, membrane verruqueuse mal déterminée, tectum microrugulé x 5600.
- Fig. 13, 14 : *C. racemosa* Lour. : 13, aperture de face x 1800 ; 14, tectum perforé, exceptionnellement microrugulé x 10000.
- Fig. 15 à 18 : *C. salvatrix* Swynn. & Phil. : 15, aperture complexe de face x 2000 ; 16, membrane aperturale et tectum largement perforé x 3000 ; 17, intercolpium x 1500 ; 18, tectum finement perforé x 3300.
- Fig. 19, 20 : *C. zanguebariae* Lour. : 19, aperture complexe de face x 1400 ; 20, tectum perforé x 11000.

Planche VI

Coffea subg. *Baracoffea*

Fig. 1 à 5 : *C. grevei* Drake : 1, aperture complexe de face x 1200 ; 2, intercolpium x 1100 ; 3, triangle polaire x 1100 ; 4, ectoaperture x 3000 ; 5, tectum x 5500.

Fig. 6 à 10 : *C. humbertii* Leroy : 6, aperture complexe de face x 1100 ; 7, triangle polaire x 1400 ; 8, aperture complexe de face x 5500 ; 9, 10, tectum, 9 x 8800, 10 x 5500.

Coffea subg. *Psilanthopsis*

Fig. 11 à 13 : *C. kapakata* Hirschfeldt : 11, aperture complexe de face x 1700 ; 12, triangle polaire x 1450 ; 13, tectum x 11000.

Aperture interne

Fig. 14 à 17 : *Coffea humbertii* Leroy : 14, x 3800. - *C. campaniensis* Leroy : 15, x 1750. - *Nostolachma* sp. (Brass 12821, P) : 16, x 2200. - *Nostolachma triflora* (Korth.) Hur. : 17, x 2200. Dans ces deux dernières espèces, l'endoaperture est particulièrement distincte de l'aperture moyenne ou mésoaperture.

Structure columellaire de l'exine

Fig. 18 à 35 : *Coffea canephora* Pierre : 18, x 8800. - *C. macrocarpa* Rich. : 19, x 12000. - *C. campaniensis* Leroy : 20, x 1200. - *C. mauritiana* Lam. : 21, x 10000. *C. eugenioides* Moore : 22, x 10000. - *C. tricalysioides* Leroy : 23, x 6000. - *C. grevei* Drake : 24, x 12000. - *C. humbertii* Leroy : 25, x 6000. - *C. vaughanii* Leroy : 26, x 5000. - *C. humblotiana* Baill. : 27, x 5000. - *Psilanthus melano-carpus* (Welw.) Leroy : 28, x 6000. - *P. ebracteolatus* Hiern : 29, x 6600. - *P. lebrunianus* Leroy : 30, x 5000. - *P. bengalensis* (Roxb.) Leroy : 31, x 10000. - *P. manni* Hook.f. : 32, x 7500. - *Nostolachma* sp. (Brass 12821, P) : 33, mur duplicolumellé x 8000. - *N. triflora* (Korth.) Dur. : 34, x 5700. - *N. densiflora* (Bl.) Dur. : 35, x 6000.

Nostolachma

Fig. 36, 37 : *N. viridiflora* (Ridl.) Leroy : 36, vue subpolaire x 2000 ; 37, détail de l'aperture complexe x 4000.

Fig. 38 : *N. sp.* (Nedi 650, L) : aperture complexe de face x 2000.

Fig. 39 : *N. sp.* (Brass 12821, P) : aperture complexe de face x 2600.

Dans les fig. 36 à 39, on peut remarquer l'image plus sombre de l'endoaperture sous l'ecto- et la mésoaperture.

Planche VII : *Nostolachma* (fig. 1 à 9), *Psilanthus* (fig. 10 à 28)

Fig. 1 à 3 : *Nostolachma densiflora* (Bl.) Dur. : 1, intercolpium x 1500 ; 2, triangle polaire x 1500 ; 3, aperture complexe x 4000.

Fig. 4 : *N. odorata* (Pierre) Leroy x 1200.

Fig. 5 à 7 : *N. triflora* (Korth.) Dur. : 5, membrane aperturale granuleuse, tectum largement perforé x 5600 ; 6, membrane au niveau de l'annulus peu marqué x 5600 ; 7, intercolpium x 1700.

Fig. 8 : *N. sp.* (Brass 12821, P) : membrane aperturale et annulus x 11000.

Fig. 9 : *N. viridifolia* (Ridl.) Leroy : exine x 4000.

Fig. 10 à 13 : *Psilanthus melanocarpus* (Welw.) Leroy : 10, vue d'ensemble x 1450 ; 11, réseau x 5600 ; 12, vue polaire x 1200 ; 13, réseau à mailles ouvertes x 5500.

Fig. 14 à 21 : *P. manni* Hook.f. : 14, aperture de face x 1450 ; 15, vue polaire x 1350 ; 16, réseau avec quelques mailles ouvertes x 9000 ; 17, réseau à mailles très irrégulières x 3300 ; 18, détail de l'aperture x 4000 ; 19, vue polaire subcirculaire x 1700 ; 20, aperture chez un grain à réseau à mailles fermées x 5600 ; 21, exine à mailles fermées et à murs du réseau épaissis par endroits x 5500.

Fig. 22, 23 : comparaison des exines à réseau à mailles ouvertes chez *P. manni* x 8400 (22) et *P. macrocarpus* x 5500 (23). Dans cette dernière espèce, le mur du réseau n'est pas toujours développé et les columelles sont alors visibles.

Fig. 24, 25 : *P. bengalensis* (Roxb.) Leroy : 24, intercolpium chez un grain tétracolporé x 1500 ; 25, tectum x 4000.

Fig. 26 : *P. horsfieldianus* (Miq.) Leroy : exine x 10000.

Fig. 27, 28 : *P. manni* Hook.f. : vue polaire d'un grain tricolporé x 1400 ; 28, réseau à mailles fermées comparables à celles de la fig. 21 x 6000.

Planche VIII : *Psilanthus*

- Fig. 1 à 4 : *P. wightianus* (Wall.) Leroy : 1, vue subpolaire et aperture complexe x 2000 ; 2, tectum largement et régulièrement perforé x 3600 ; 3, aperture complexe de face x 1500 ; 4, détail du tectum irrégulièrement perforé x 4000.
- Fig. 5 à 9 : *P. bengalensis* (Roxb.) Leroy : 5, vue polaire x 2000 ; 6, aperture de face x 1800 ; 7, détail de l'aperture x 5600 ; 8, tectum perforé x 5600 ; 9, exine x 5500.
- Fig. 10 à 13 : *P. merguensis* (Ridl.) Leroy : 10, aperture de face x 2000 ; 11, détail de l'aperture, annulus x 14500 ; 12, vue polaire d'un grain pentacolporé x 2200 ; 13, réseau à mur microverruqueux x 17000.
- Fig. 14 à 16 : *P. travancorensis* (Wight & Arn.) Leroy : 14, aperture de face x 2200 ; 15, vue polaire d'un grain pentacolporé x 2200 ; 16, exine réticulée et membrane aperturale x 5600.
- Fig. 17 à 20 : *P. ebracteolatus* Hiern : 17, aperture de face x 2000 ; 18, vue polaire d'un grain pentacolporé x 1800 ; 19, détail de l'aperture réduite à un court sillon x 6700 ; 20, détail du réseau à mur simplicolumellé x 11000.
- Fig. 21 à 23 : *P. lebrunianus* (Germain et Kesler) Leroy : 21, vue polaire d'un grain tétracolporé x 2500 ; 22, 23, détail du réseau à mur fortement ondulé (22) ou non (23) x 5000.
- Fig. 24, 25 : *P. melanocarpus* (Welw.) Leroy : 24, intercolpium x 1100 ; 25, aperture de face x 1100.

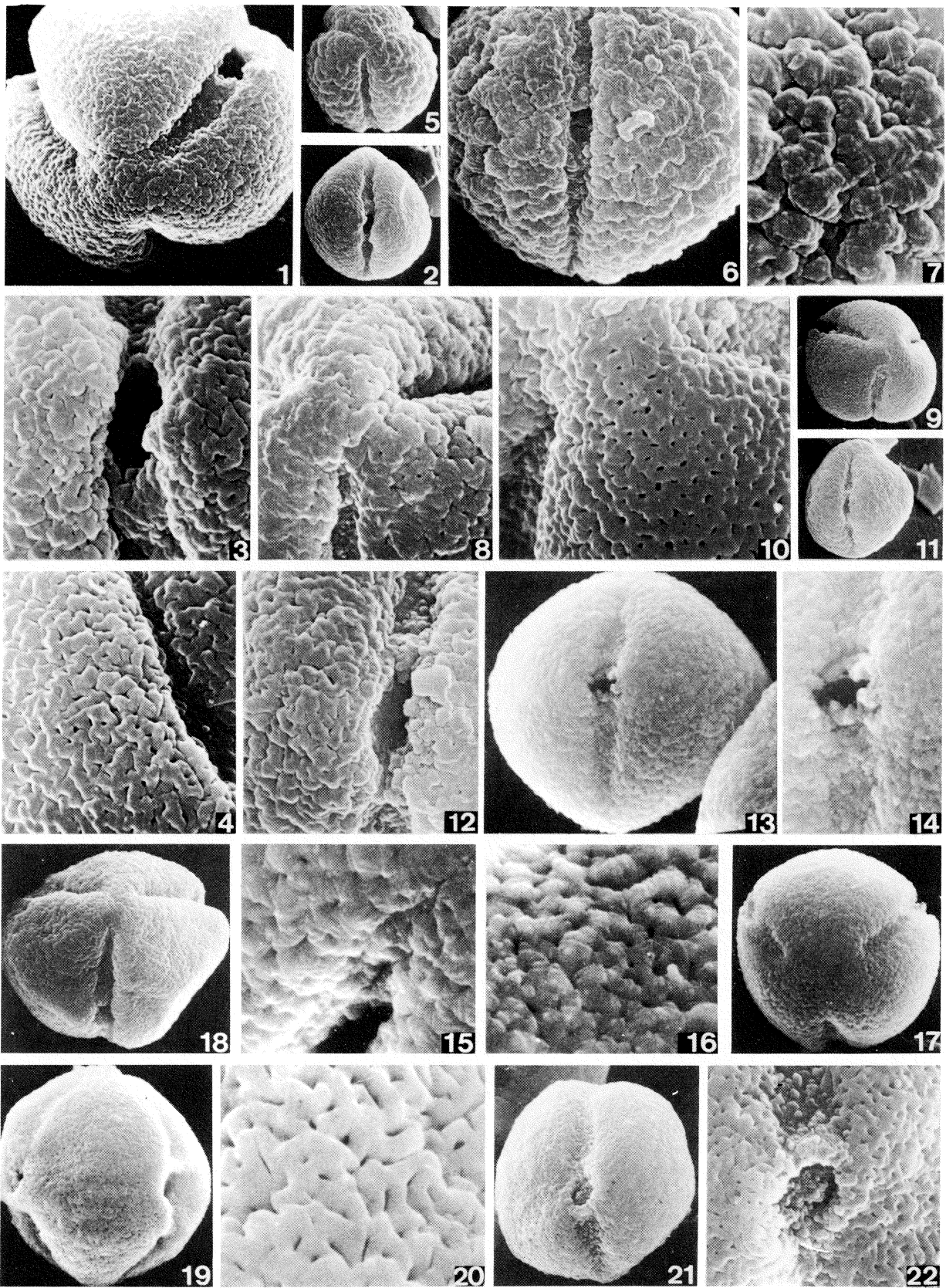


Planche I

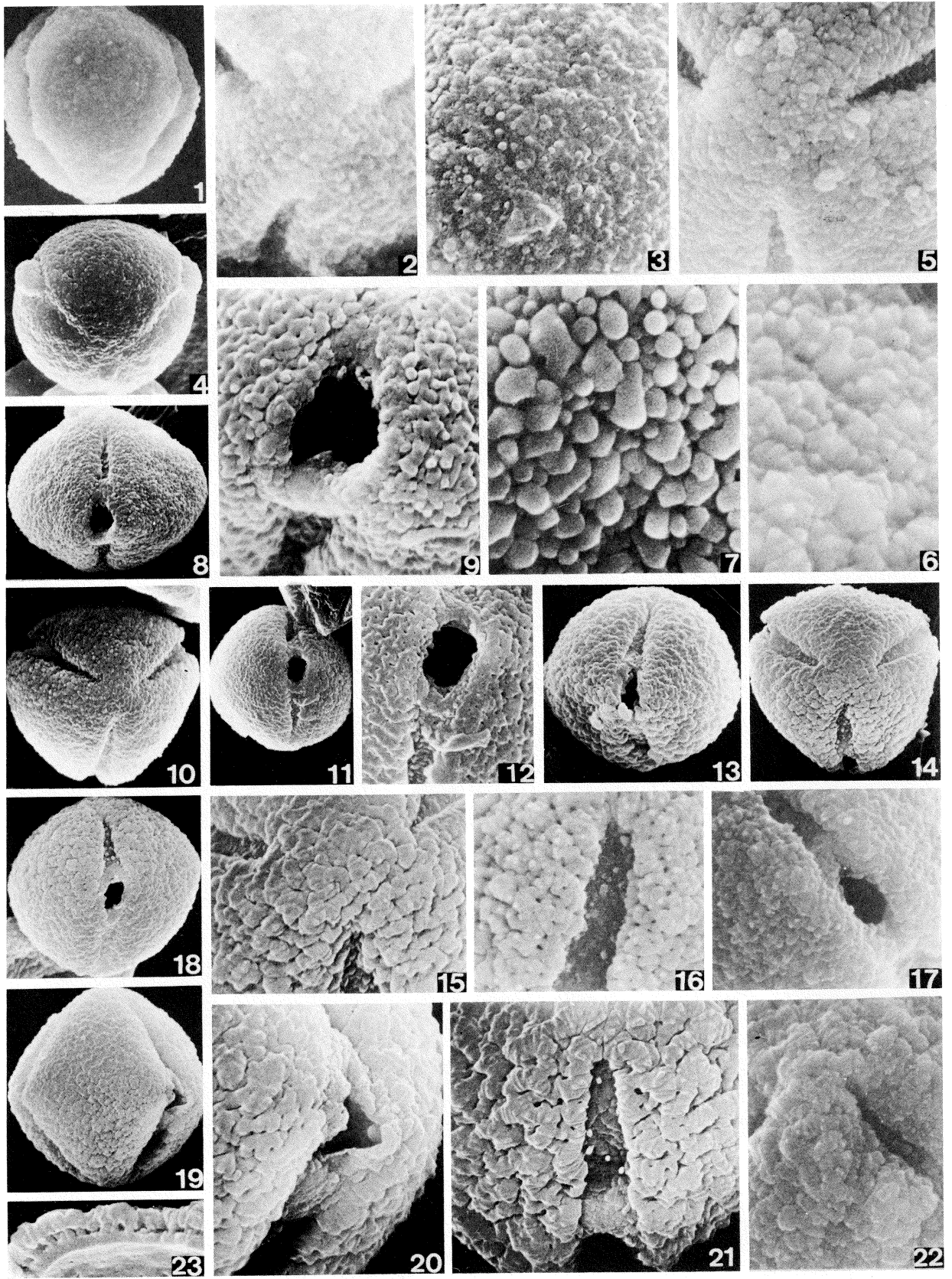


Planche II

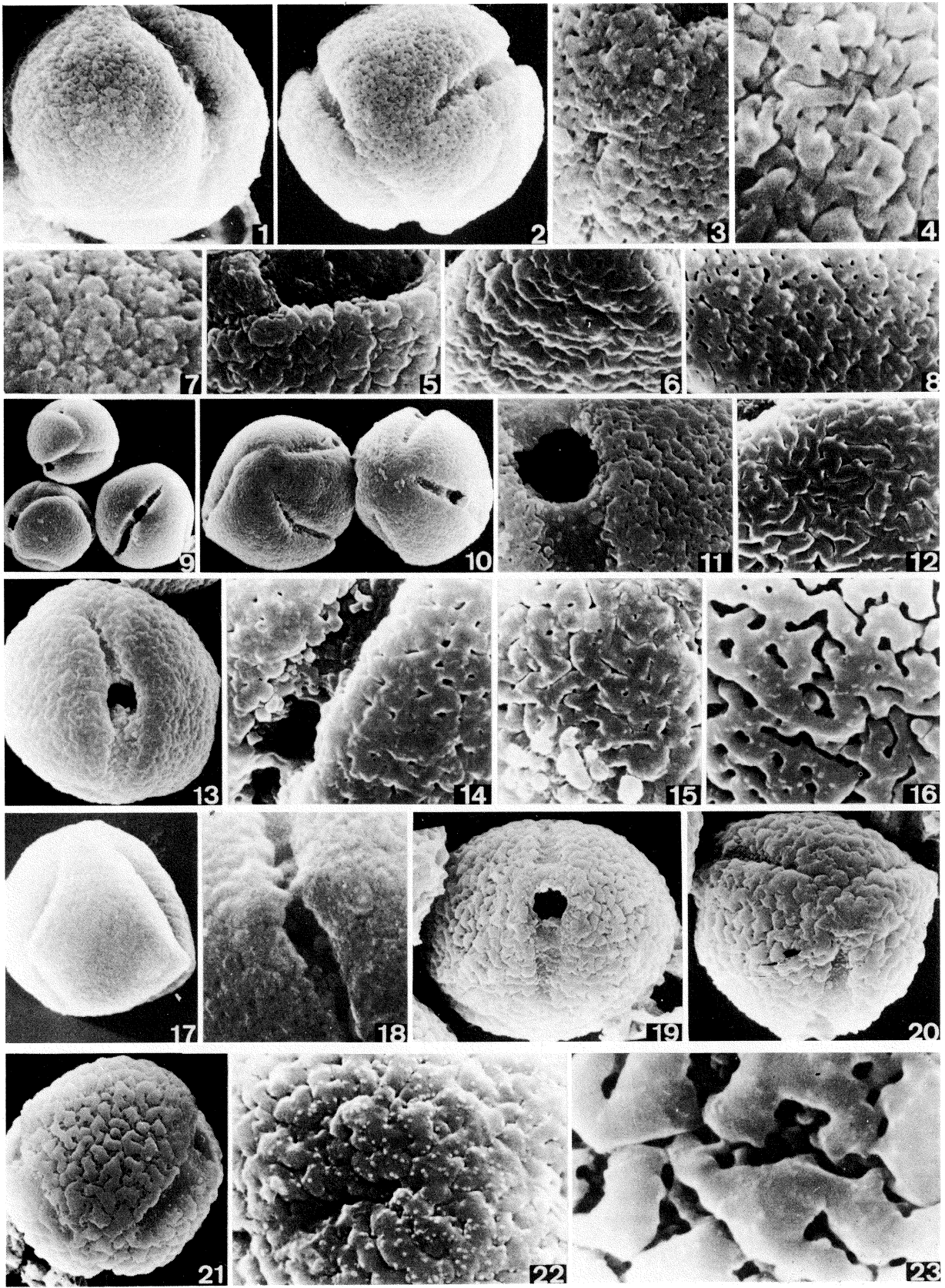


Planche III

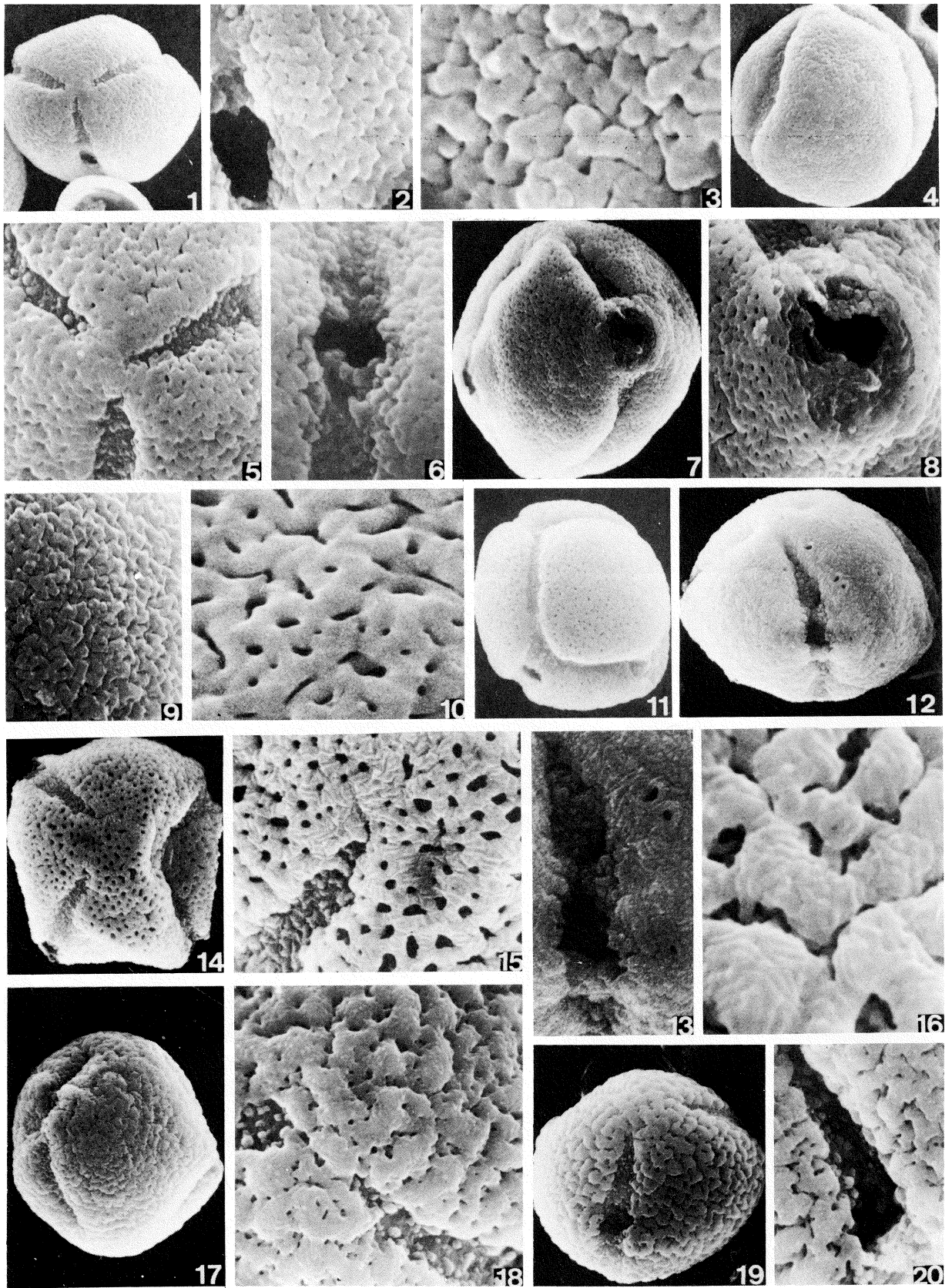


Planche IV

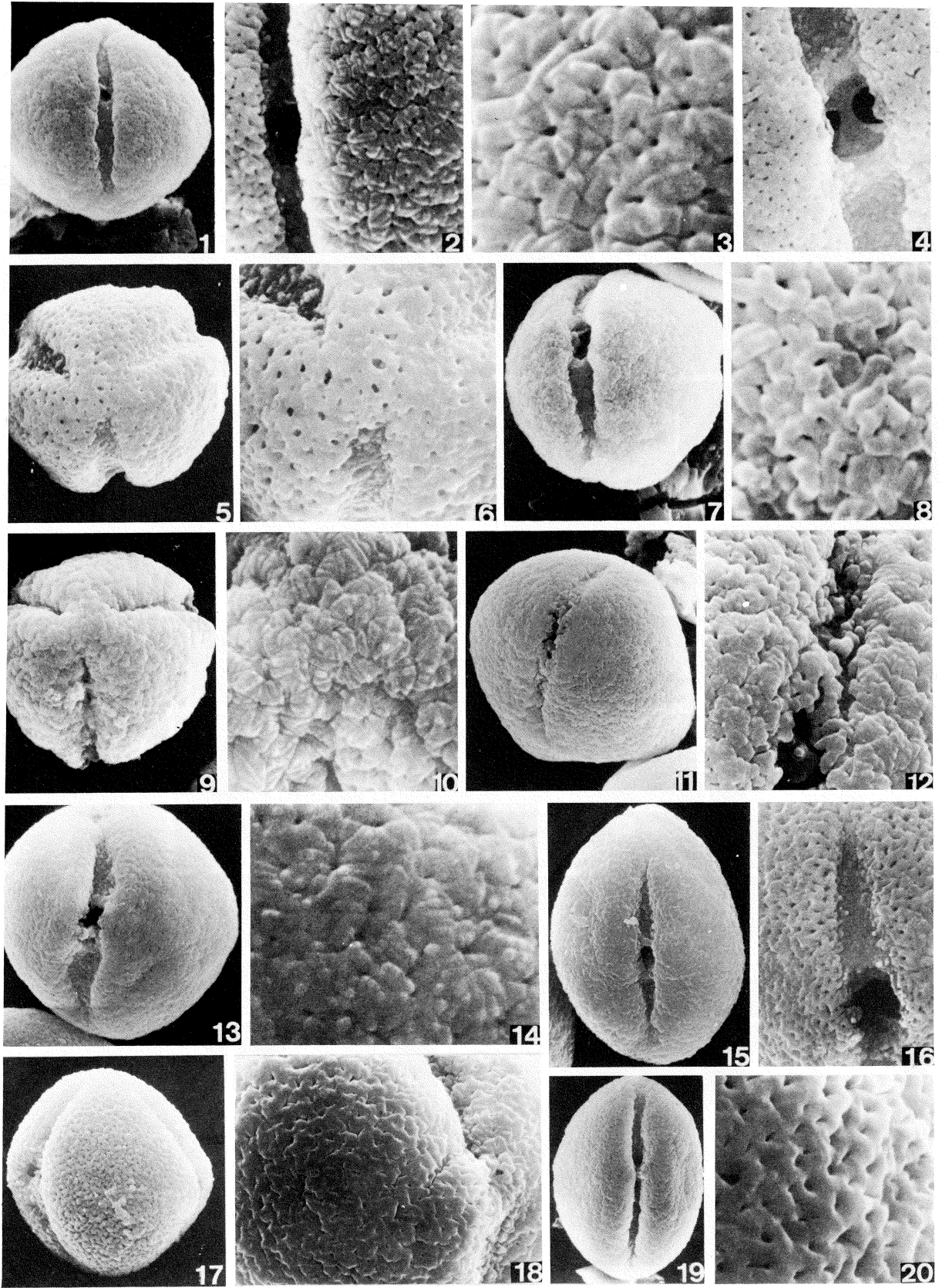


Planche V

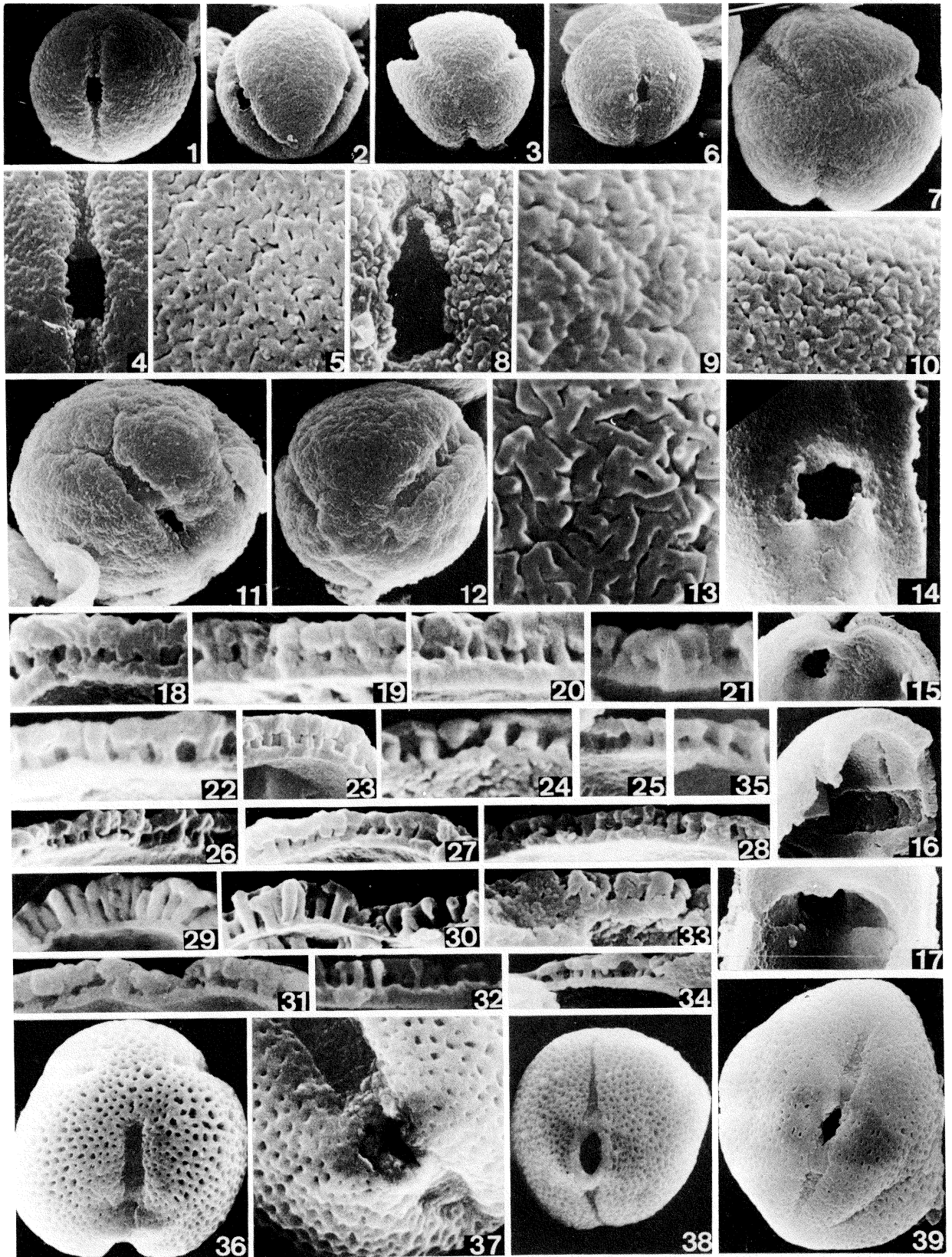
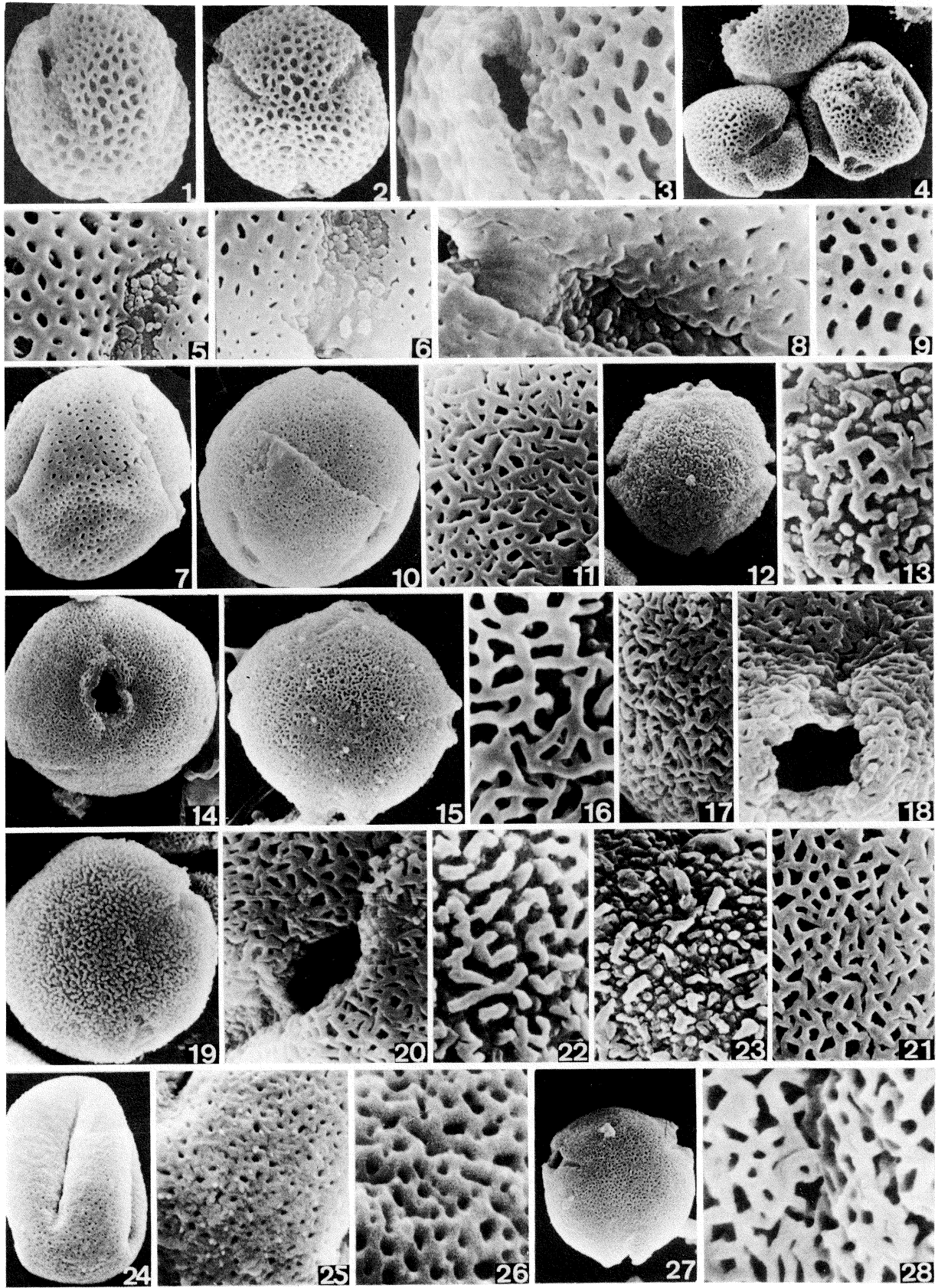


Planche VI



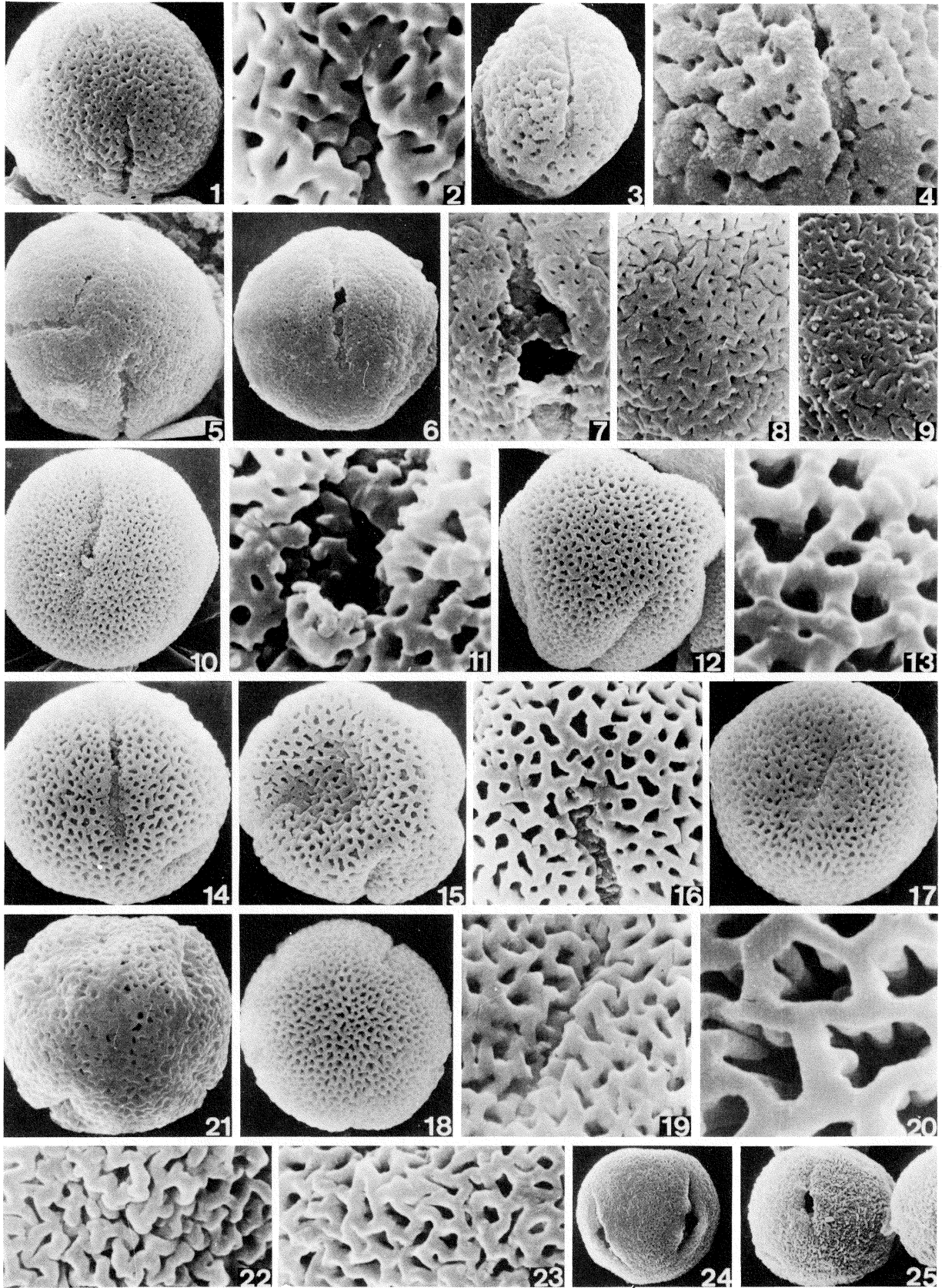


Planche VIII

CONSERVATION OF THE GENETIC RESOURCES OF THE GENUS *COFFEA*

A. CHARRIER

Genetics Laboratory, ORSTOM, B.P. V51, Abidjan (Ivory Coast)

Any research center specialized in improving coffee production maintains collections of cultivated coffee trees under the breeder's responsibility. These collections have been of minor importance compared to the breeding and agronomic programs. These "working collections" of breeders are to be distinguished from the rare major collections which ensure the conservation of genetic resources. The latter are distinguished by their specific wealth and their origin diversity resulting from prospectings of wild coffees.

One knows that coffee genetic resources are not limited to the two cultivated species alone ; the whole genus *Coffea* (with more than 70 sp.), even the close genus *Paracoffea* and *Psilanthus*, belong to the same gene pool (Charrier, 1978). An organisation and methods adapted to genetic resources centers are required for the safeguard and the rational use of the major coffee collections. Based on our experience in Ivory Coast and Madagascar in this field, we will suggest the general orientations to ensure conservation, evaluation and distribution of the coffee germplasm by autonomous organisations in charge of the major coffee collections.

I. WORKING COLLECTIONS FOR COFFEE RESEARCH CENTERS

Their first objectives are the improvement of the two cultivated species, *C. arabica* and *C. canephora*. Such collections are often established and completed by successive introductions of strains more or less selected from other coffee stations, botanical gardens or local plantations. The other species are rarely represented.

A world wide survey conducted in 1978-79 on the existing coffee collections under the auspices of FAO provides an up-to-date document. Let us summarize the common gaps in the working collections :

- (i) some cultivars are replicated in most stations ; these redundancies are common for *C. arabica* mutants,
- (ii) on the contrary, some species and strains are represented in unique collection and should be distributed in order to reduce the risks of genetic erosion. That is the case of *Mascarocoffea* species in Madagascar, *C. congensis*, *C. eugenioides*, *C. zanguebariae* in Ivory Coast.
- (iii) the species and variety names of the genus *Coffea* are confusing ; a more modern taxonomy would be necessary to replace that of Chevalier (1947),
- (iv) the establishment of coffee collections through exchange of open-pollinated seeds does not preserve their genetic structure. This method may be acceptable for the autogamous species *C. arabica*, but in allogamous species, we only know the maternal filiation. In the case of the multiplication of a specific genotype, vegetative propagation could be used,
- (v) the pedigree and sampling technique of the coffee trees in collection are not always well defined,
- (vi) the museum collections are established without experimental design and isolation. Cross pollination between and within species are therefore likely to occur.

Now let us have a look at some possibilities of increasing genetic diversity of cultivated and wild coffee species in the major collections.

II. ENRICHING THE COLLECTIONS WITH PRIMITIVES STRAINS OF *COFFEA*

It is known that wide expansion of coffee culture in the world has been done with few genetic origins, especially for *C. arabica* (Wellman, 1961). Consciousness of the lack of variability in the coffee collections has led FAO and French organisations (ORSTOM, IFCC, Museum) to intensify collecting missions in the last twenty years. These collecting missions are summarized in table 1 where one can see the countries covered, species collected and the countries where the coffee germplasm is stored (FAO 1968 ; Charrier 1976 et 1978 ; Porteres 1962 ; Berthaud et al. 1977 ; Leroy 1962). This increase of the coffee germplasm concerned particularly *C. arabica*, because of its economic importance. A number of uncultivated species were also collected like *Mascarocoffea* (caffeine free), *C. congensis* (genitor for *congesta* hybrids), *Pachycoffea*, *C. eugenioides* (presumed ancestor of *C. arabica*) and the close genus *Psilanthus* and *Paracoffea*.

In intertropical Africa, one can still find, at least for a short time, wild coffee in undisturbed forests and semi-cultivated coffee in traditional agricultural areas. It is therefore urgent to proceed with the coffee germplasm collecting missions in the following areas (figure 1):

Years	Collections countries	Organisations	Species	Germplasm maintenance countries
1964	Ethiopia	FAO	<i>Arabica</i>	Ethiopia, India, Tanzania, America
1966	Ethiopia	ORSTOM	<i>Arabica</i>	Ethiopia, Madagascar, Cameroon, Ivory Coast
1960-1974	Malagasy region	Museum/IFCC/ORSTOM	<i>Mascarocoffea</i>	Madagascar
1975	Central Africa	ORSTOM/IFCC	<i>Congensis, liberica, canephora, caféier Nana</i>	Ivory Coast, Central Africa
1975-1980	Ivory Coast	ORSTOM	<i>Liberica, canephora, Humilis, stenophylla, Paracoffea, Psilanthus</i>	Ivory Coast
1977	Kenya	ORSTOM/IFCC	<i>Arabica, eugeniooides, sanguibarica, C. sp.</i>	Ivory Coast, Kenya

Table 1 : Summary of major Germplasm Coffee missions since 1960

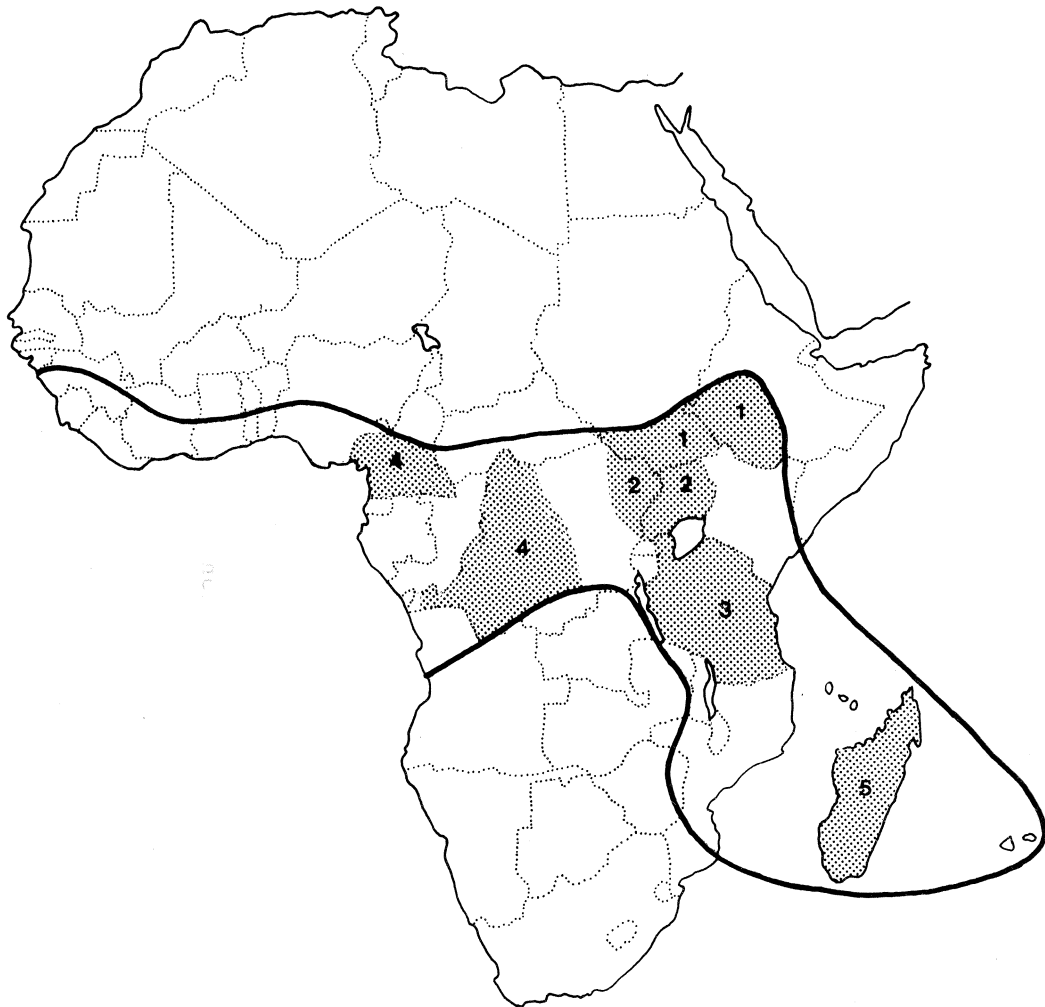


Fig. 1 : COFFEE GERMLASM AREAS TO BE EXPLORED

- (i) Southwestern Ethiopia and southeastern Sudan which are centers of diversification of *C. arabica*. The new expeditions should be directed towards areas not covered by the preceding missions and the collection of strains tolerant to coffee berry disease (CBD).
- (ii) Uganda and eastern Zaïre.
In this zone where the distribution areas of the major diploid species overlap, emphasis will be put on the biogeographical relationships with *C. arabica* of south Sudan and the origin of this allotetraploid species.
- (iii) Tanzania will complete the exploration of Kenya in order to increase representation of the *Mozambicoffea* section.
- (iv) Central Africa : A coffee exploration in Cameroon, Gabon, Congo, Zaïre would increase the representation of *C. canephora*, *C. congensis*, *C. liberica*, *C. brevipes* which are very important species in breeding programs.

- (v) Malagasy region : the diversity and the originality of *Marcara-coffee* alone justify further prospectations.

One can see that sending germplasm collecting missions from abroad for a short time, have been effective in collecting large amount of seeds and cuttings to be sent to the conservation centers. This approach should be completed with a germplasm collection on a permanent basis, at a local level.

III. CONSERVATION SYSTEMS OF THE COFFEE GENETIC RESOURCES

It is possible to protect that gene pool either through natural forest reserves or through living plant collections.

(i) Strict natural reserves

It is the best conservation system because it maintains the evolutionary potential of natural populations. They follow the dynamic transformations of the biotype and particularly the evolution of pests and diseases. In this respect, the *C. arabica* exemple is very instructive. A number of genotypes collected from Ethiopia show a good tolerance for rust ; a host-parasite equilibrium has taken place in the variability center. On the other hand, the recent spread of the CBD from East Africa is a serious threat to the world production of arabica coffee. The cultivated varieties are susceptible and tolerant genitors are scarce among the plant material from Ethiopia and Sudan (Van der Vossen, 1978). Is the selective pressure of *Colletotrichum coffeanum* too recent for the natural populations of *C. arabica* to develop an adaptive response ?

Undisturbed forests containing wild coffee trees are becoming rare and should be reserved. Could we have the facilities to create such strict natural reserves in Ethiopia, Madagascar, Tanzania, Zaïre, Cameroon, Ivory Coast or Guinea ? Such system will require experimental studies on the genetic structure of the local populations.

(ii) Living collections of coffee trees

They are established from seeds and unrooted cuttings obtained from the existing collections or during the explorations. This genetic variability that has been accumulated is strongly influenced by the initial sampling, the propagation means, the structure of the original populations and the reproductive system. With this conservation technique the genotypes introduced in living collections are maintained vegetatively but are static.

Coffee tree plantations require a large area because of the size of the trees : around 5 ha with 1000 to 2000 trees per ha. The long life span of coffee trees (20 to 50 years) is an advantage for maintaining the genetic integrity for a long time which can be extended through a vegetative propagation. The risk of genetic erosion depends therefore upon the adaptation of the different origins to the same new biotope and the care and treatment of the plant material.

As an exemple, let summarize what has been done in that respect in Ivory Coast :

- plantation in two favorable locations, one at high altitude (Mt Tonkoui 1100 m) and the other at low altitude (Divo 200 m),
- plantation under natural or artificial shade in order to recreate the original environment of the wild coffee trees,
- grafting of the less vigorous species (*C. congensis*, *C. humilis*, *C. eugenioides*) on the *C. canephora* adapted to local conditions,
- spraying with pesticides and fungicides, watering the young coffee trees, and grafting the dying plants.

These precautions do not protect against exceptional climatic aleas such as tornadoes, cyclons, drought, epidemics and pests. Only can the duplication of the living collections increase the security of the conservation.

In view of the high coast of these operations, it seems appropriate to study the possibility of making living collections of small plants through tissue culture.

IV. ORGANISATION OF GENETIC RESOURCES CENTERS (GRC's)

We will go through the different functions of GRC's as shown in Figure 2.

(i) To increase the genetic pool

This can be achieved through germplasm collecting missions and introductions. The risk of transferring diseases and pests will be strictly controlled by the use of healthy plant material, their treatment with fungicides or pesticides, and their isolation in quarantine outside the coffee culture areas (USDA Station at Gleen Dale in USA ; GERDAT at Montpellier in France).

(ii) To ensure the conservation of the plant material

Living collections are grown in a research station having agricultural and horticultural facilities (nurseries, greenhouses). Other means of conservation of genetic resources such as a long term conservation of seeds, or pollen storage or small plants through tissue culture need to be more studied before they can be applied to coffee collections.

For example, the seed viability of *C. arabica* could be maintained above 80% only for 2 or 3 years through storage of hydrated seeds containing 40% water, at a temperature between 15 and 19°C (Van der Vossen 1978, Couturon 1980). This conservation time is still too short to be applied to coffee collections although the method is commonly used for other plant species.

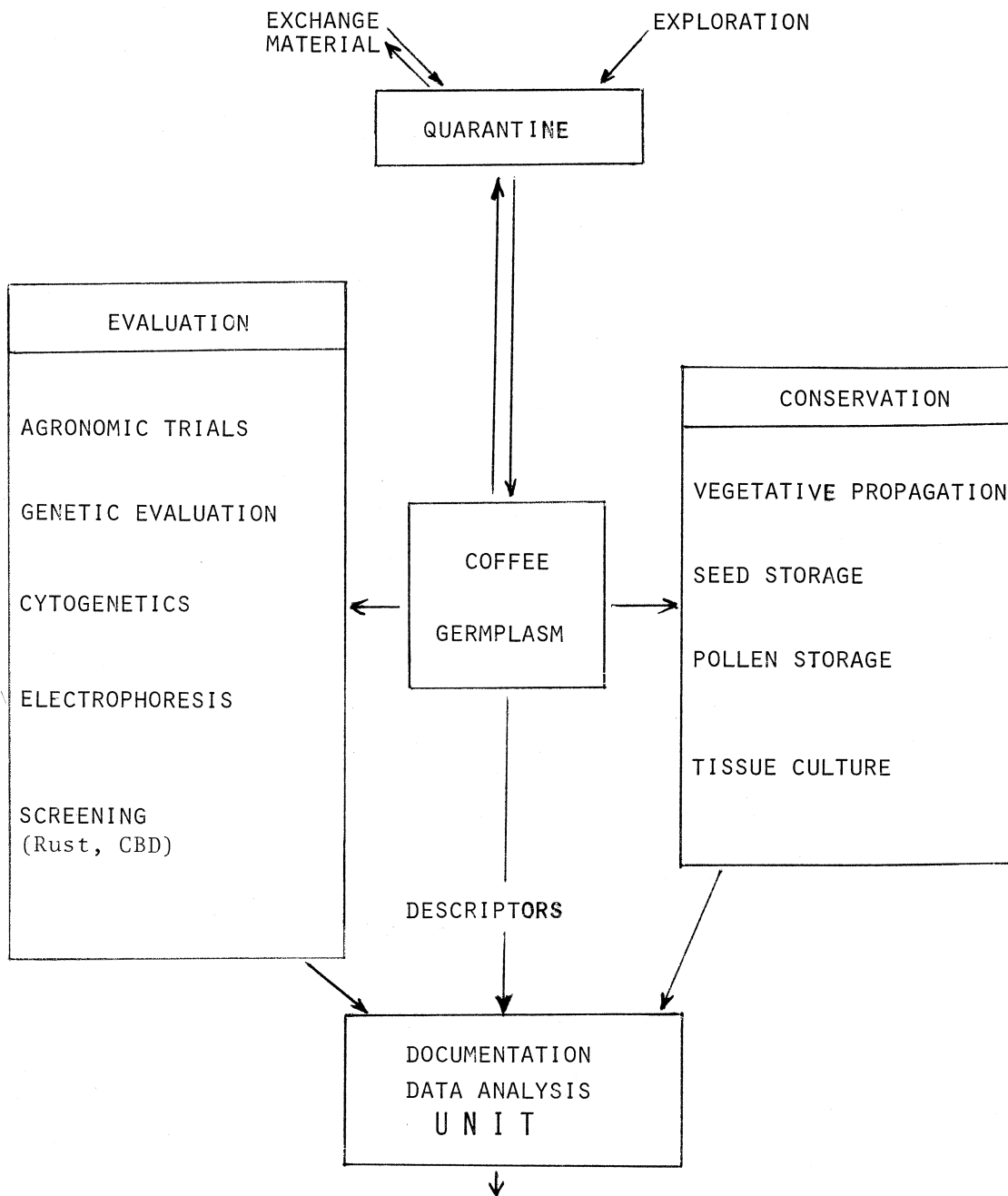


Fig. 2 : Organization of the Genetic Resources Centers

The pollen storage of coffee trees is commonly used in plant breeding. The dehydrated pollen of *C. arabica* stored under vacuum at minus 18°C has 60% of germination after 26 months of conservation (Walyaro, Van der Vossen 1977). This technique can only be used to distribute pollen for different genetic and breeding research programs in order to gain several years over the transfer of whole plants.

The different systems of tissue culture of coffee will be discussed during this congress = bud culture (Custers 1980), regeneration of tissue (Staritsky 1970 ; Dublin 1980), single cells or protoplasts (Söndahl 1979), male and female gametophyte (Lanaud 1980). As far as the genetic resources are concerned, it is important to be able to apply the tissue culture technique to various genotypes and also to obtain an exact copy of the mother plant i.e. exactly the same genetic and chromosomal make up and the same morphogenesis as the mother plant. Usually microcutting and apex culture are the most appropriate and provide an exceptional phytosanitary protection during international transfers of plant material.

(iii) To evaluate the plant material

Plant breeders are directly interested in the agronomic evaluation of coffee germplasm. This evaluation is useful only under the same climatic and parasitic conditions as the collection. A more general agronomic evaluation requires a network of trials at several locations and the evaluation of resistance to different races of parasites under artificial conditions as it is done at the "Centro de Investigação des Ferrugens do Caffeeiro" at Oeiras in Portugal. Now it would be necessary to have a research center outside the coffee culture areas to screen material for resistance to *Colletotrichum coffeanum* using the method developed in Kenya by Van der Vossen (1976).

The use of desirable agronomic traits requires information on the reproductive barriers and the genetic relationship within the coffee gene pool. This information could be obtained through intra and interspecific hybridization, cytogenetic studies, quantitative genetic analysis and enzymatic variability by electrophoresis. The team ORSTOM is conducting both genetic and agronomic evaluations of the coffee germplasm maintained in Ivory Coast.

The use of carefully chosen descriptors is absolutely necessary for a standard approach to germplasm collections and should facilitate international exchange of information.

(iv) To create a documentation and data analysis unit

The classification and statistical analysis require computing and data storage facilities. Different management units are available. Recently the American Institut of Boulder in Colorado (USA) has developed a new type of germplasm data management (GDM) adapted to minicomputers which can be connected to more powerful computers.

(v) To dispatch the plant material and the information

A GRC ensures a regional and world wide dispatch of germplasm material and information in cooperation with other GRC's and coffee breeding stations. Some international regulations are necessary to facilitate the exchanges.

(vi) To train and to inform

Besides maintaining the genetic resources, one should inform politicians and scientists on the usefulness of germplasm conservation, use the media to educate the public on the interest of the biological heritage, and also train scientists from developed and developing countries in the subject.

The staff members of a GRC have different education levels and are specialized in different subjects : botany, population and quantitative genetics, plant pathology, statistics and computer sciences, agronomy and horticulture, biochemistry, physiology...

In fact, the organisation of GRC's requires a multidisciplinary approach and laboratories specialized in different fields.

V. CONCLUSION

The difference made between the breeders' working collections and the major collections of GRC's is very important as far as the responsibility sharing and the working facilities are concerned. So the management of GRC's in poor countries cannot be efficient without foreign financial aid.

Depending upon the world distribution of coffee culture and major collections, it would be advisable to establish an international network of about 10 regional GRC's in the following countries : Ethiopia, Tanzania, Malagasy, Cameroon, Zaïre, Ivory Coast, America, Indonesia, Portugal (rust center of Oeiras) and a Center for CBD. We should also mention the "Centro agronomico tropical de Investigacion y Ensênanza" at Turrialba (Costa Rica) wich is in charge of conserving and distributing *C. arabica* germplasm throughout Colombia and Brazil.

This genetic resources conservation scheme should be accompanied by international harmonisation. The IBPGR (FAO) which organizes and promotes the conservation of genetic resources has been interested in the genus *Coffea* since 1978 : as a result a working group on coffee germplasm met in Rome in December 1979 to define priorities and make recommandations.

Acknowledgments

The author is grateful to Dr. K. MIEZAN for translating assistance.

LITERATURE

- BERTHAUD (J), GUILLAUMET (JL), LE PIERRES (D), LOURD (M) - 1977 - 8ème Colloque ASIC, (Abidjan), 365-372.
- CHARRIER (A) - 1978 - Mémoires ORSTOM, n° 87, 304 p., 22 fig., 54 tabl., 15 pl.
- CHARRIER (A) - 1977 - 8ème Colloque ASIC (Abidjan), 399-405.
- CHARRIER (A) et al. - 1978 - Bulletin IFCC n°14, 100 p.
- CHEVALIER (A) - 1947 - Encycl. biol., XXVIII, fasc. III, P. Lechevalier, Paris.
- COUTURON (E) - 1980 - Café, Cacao, Thé, XXIV, 1, 27-32.
- CUSTERS (JMB) - 1980 - 9ème Colloque ASIC, Londres.
- DUBLIN (P) - 1980 - Café, Cacao, Thé, XXIV, 2, 121-130.
- F.A.O. - 1968 - F.A.O. (Rome) 200 p.
- LANAUD (C), PARVAIS (JP) - 1980 - 9ème Colloque ASIC, Londres.
- LEROY (JF) - 1962 - J. Agric. trop. et Bota. appl., 9, 211-249.
- PORTERES (R) - 1962 -
J. Agric. trop. et Bota. appl., IX, 3, 4, 5, 6, 201-210.
- RODRIGUEZ (CJ) - 1977 - 8ème Colloque ASIC (Abidjan) 537-538.
- SÖNDAHL (MR), SHARP (WR) - 1979 -
In : Plant cell and Tissue Culture. Principles and applications, pp. 527-584.
- STARITSKY (G) - 1970 - Acta bot. neerl. 19, 509-514.
- VAN DER VOSSSEN (HAM), COOK (RTA), MURAKARU (GNW) - 1976 -
Euphytica, 25 (3), 733-745.
- VAN DER VOSSSEN (HAM) - 1978 - 8ème Colloque ASIC (Abidjan), 507-508.
- VAN DER VOSSSEN (HAM) - 1978 - Seed Science and Technology.
- WALARYO (DJ), VAN DER VOSSSEN (HAM) - 1977 - Euphytica, 26 (1), 225-232.
- WELLMAN (FL) - 1961 - Interscience Publishers, Inc., New-York.

L'INCOMPATIBILITÉ CHEZ *COFFEA CANEPHORA* :

Méthode de test et déterminisme génétique

J. BERTHAUD

ORSTOM, B.P. 434, Man, Côte d'Ivoire

L'autoincompatibilité, c'est-à-dire l'impossibilité pour une plante que ses fleurs soient fécondées par son propre pollen, est très répandue chez les Angiospermes. C'est un système efficace de maintien de la variabilité génétique. Cette incompatibilité peut exister aussi entre plantes différentes quand elles ont certains allèles en commun. Chez les caféiers, toutes les espèces testées se sont montrées autoincompatibles, à l'exception de *C. arabica* (MENDES 1949; MEDINA *et al.* 1959; DEVREUX *et al.* 1959; DUBLIN 1957, 1960; CONAGIN 1961; CONAGIN *et al.* 1961; CHARRIER 1972, 1976).

Chez les Angiospermes on connaît deux types principaux de système d'incompatibilité. L'un est appelé sporophytique : les grains de pollen ne germent pas sur les stigmates de plantes ayant les mêmes allèles du gène d'incompatibilité; tous les grains de pollen ont la même réaction déterminée par le génotype diploïde de la plante fournissant le pollen. L'autre système est appelé gamétophytique car la réaction de rejet dépend du génotype du grain de pollen lui-même.

La réaction d'incompatibilité peut se situer au niveau des stigmates : une fois déposés sur les stigmates les grains de pollen ne germent pas : c'est le cas des systèmes sporophytiques et du système gamétophytique des graminées. Cette réaction d'incompatibilité peut se produire dans le style : après la germination des grains de pollen la croissance des tubes polliniques s'arrête au niveau de la base des stigmates ou de l'extrémité du style. On constate que ce type d'inhibition accompagne presque toujours un système gamétophytique. C'est ce type de réaction qui permit à DEVREUX *et al.* 1959 de faire l'hypothèse que chez les caféiers un tel système est en place. L'existence d'un système de cette nature a aussi été avancée par CONAGIN et MENDES 1961. L'étude du déterminisme génétique n'a pas été développée par ces auteurs. C'est une hypothèse que nous nous proposons de vérifier.

Après avoir rappelé le fonctionnement d'un tel système et les relations qu'il détermine entre les descendants des différents croisements, nous exposerons notre méthode de test en laboratoire de la compatibilité des combinaisons pollen-style et les résultats obtenus par cette méthode.

		♂		J (S ₄ S ₅)	
				S ₄	S ₅
♀	I (S ₂ S ₃)	S ₂	S ₂ S ₄ (I)	S ₂ S ₅ (II)	
		S ₃	S ₃ S ₄ (III)	S ₃ S ₅ (IV)	

Tableau 1 : Génotypes des descendants d'un croisement I x J.

		♂			
		I	II	III	IV
♀	I	0	+	+	+
	II	+	0	+	+
	III	+	+	0	+
	IV	+	+	+	0

+ combinaison compatible
0 combinaison incompatible

Tableau 2 : Réactions de compatibilité entre les groupes des descendants d'un croisement entre arbres ayant des allèles S différents.

		♂		Y (S ₁ S _y)	
				S ₁	S _y
♀	X	S ₁		S ₁ S _y (β)	
		S ₁ S _x S _x		S _x (γ) S _y	

		♂		X (S ₁ S _x)	
				S ₁	S _x
♀	Y	S ₁		S ₁ S _x (α)	
		S ₁ S _y S _y		S _x (γ) S _y	

Tableaux 3 - 4 : Génotypes des descendants des croisements (X x Y) et (Y x X) (X et Y ont un allèle S commun).

		♂			
		(α)	(β)	(γ)	
♀	X x Y	S ₁ S _x	S ₁ S _y	S _x S _y	
		(β)	+	0	+
		(γ)	+	+	0

+ combinaison compatible
0 combinaison incompatible

		♂			
		(α)	(β)	(γ)	
♀	Y x X	S ₁ S _x	S ₁ S _y	S _x S _y	
		(α)	0	+	+
		(γ)	+	+	0

α β γ : groupes d'incompatibilité correspondant aux génotypes des tableaux 3 - 4.

Tableaux 5 - 6 : Réactions de compatibilité entre les groupes des descendants de deux croisements réciproques entre arbres ayant un allèle S₁ commun.

I. CARACTERISTIQUES D'UN SYSTEME GAMETOPHYTIQUE MONOGENIQUE COMPORTANT UNE SERIE D'ALLELES

La figure 1 montre le comportement des grains de pollen dans des combinaisons incompatible, semi-compatible et compatible dans un système gamétophytique monogénique. Quand le tube pollinique d'un grain de pollen porteur de l'allèle S1 rencontre les tissus du style possédant le même allèle la croissance de ce tube est bloquée; il ne peut arriver à l'ovule. Dans le cas d'une autopolinisation tous les grains de pollen portent des allèles existant aussi dans le style; il ne peut donc y avoir d'autofécondation. Quand les allèles S des grains de pollen et du tissu des styles sont différents la croissance des tubes polliniques est régulière. La fécondation peut se réaliser. Si on amène sur un style des grains de pollen porteurs d'un allèle identique à celui du style et d'autres porteurs d'un allèle différent, seuls les grains de pollen du deuxième type assureront la fécondation. C'est le cas quand les plantes fournissant le pollen et celles portant les styles ont un allèle commun. Ce type de pollinisation est dite semi-compatible.

Le nombre d'allèles S dans une espèce pouvant être élevé il est souvent difficile de rencontrer des plantes incompatibles entre elles; par contre il en va différemment quand on observe les descendants d'un croisement puisque dans ce cas il ne peut y avoir plus de 4 allèles mis en jeu. Nous exposerons donc les résultats théoriques concernant des arbres ayant des allèles différents puis entre des arbres ayant un allèle S commun.

Dans le cas de croisements entre deux arbres I et J ayant tous leurs allèles S différents I : S2 S3 et J : S4 S5 les descendants auront les génotypes déterminés dans le tableau 1.

On obtient quel que soit le sens du croisement I x J ou J x I des descendants n'ayant que 4 génotypes possibles. Ces 4 génotypes ont la même probabilité de réalisation. Aucun de ces génotypes n'est identique à celui de l'un des parents. Ces arbres ayant le même génotype seront tous incompatibles entre eux et formeront donc un groupe. Ils seront tous compatibles avec les arbres des autres groupes. On aura donc 4 groupes que nous pourrions appeler I, II, III, IV. En analysant les réactions de compatibilité des descendants entre eux on aboutira au tableau 2. On remarquera que le sens de réalisation de la combinaison pollen-style n'a aucune répercussion sur le résultat du test.

Dans le cas du croisement entre deux arbres X et Y ayant un allèle en commun : X : S1 Sx, Y : S1 Sy les descendants auront les génotypes suivants (tableau 3-4).

Tous les styles portant l'allèle S1, aucun grain de pollen avec l'allèle S1 ne pourra féconder un ovule. Les deux croisements réciproques ne conduisent pas à des génotypes identiques. Dans les deux cas il existe deux génotypes possibles pour les descendants, l'un identique au parent mâle du croisement, l'autre différent mais commun aux deux croisements; ils forment un même groupe γ .

Pour mettre en évidence une telle situation parmi les descendants de deux croisements réciproques il faut et il suffit qu'une partie (la moitié environ) des descendants soit incompatible avec le parent mâle de départ, et que tous les arbres des deux croisements qui sont compatibles avec leurs deux parents soient incompatibles entre eux. Au total il est donc possible de former 3 groupes α , β , γ . Nous présenterons une situation de ce type dans la deuxième partie. Dans les tableaux suivants (tableaux 5-6) apparaissent les réactions de compatibilité des descendants des deux croisements réciproques.

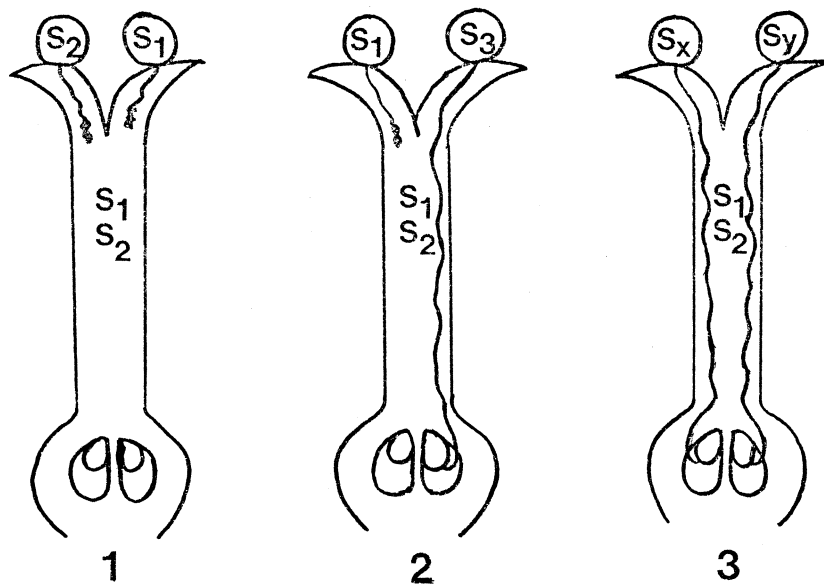


Figure 1 : Croissance des tubes polliniques selon le type de pollinisation

1. pollinisation incompatible
2. pollinisation semi-compatible
3. pollinisation compatible.

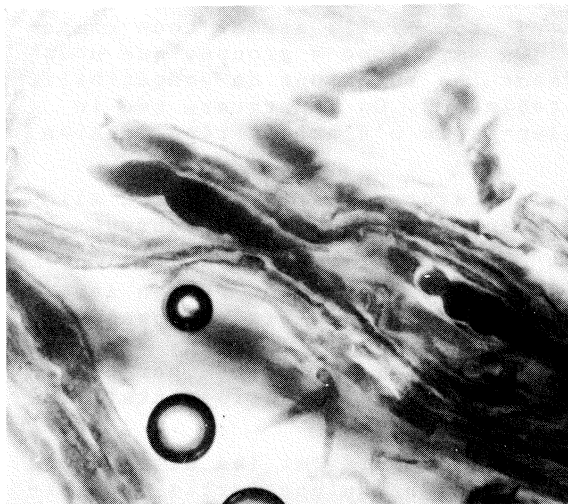


Figure 2 : 1. Extrémité de tube pollinique à la base du stigmate dans une pollinisation incompatible.



Figure 2 : 2. Extrémité de tube pollinique à la base du style dans une combinaison compatible.

II. METHODE DE TEST ET RESULTATS

1. Méthode

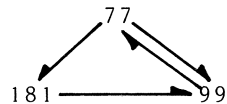
Il ne s'agit pas d'une méthode originale, mais de l'adaptation au caféier d'une méthode déjà utilisée chez d'autres plantes : Pommier, Noisetier (THOMPSON, 1979). Elle consiste dans l'observation de la croissance des tubes polliniques de grains de pollen déposés sur les stigmates de fleurs maintenues en survie dans des boîtes hermétiquement closes, saturées en humidité. Vingt quatre heures après la pollinisation les styles sont placés dans des tubes contenant du lactophénol et stockés au réfrigérateur. Pour l'observation les styles sont refendus en deux, colorés au Bleu Coton et écrasés entre lame et lamelle dans une goutte de lactophénol.

Dans le cas d'une combinaison pollen-style compatible on trouve des tubes polliniques tout le long du style jusqu'à la base de celui-ci. Dans le cas d'une combinaison incompatible les tubes polliniques ne dépassent jamais la base des stigmates, ils se boursoufflent à leur extrémité, certains pouvant même "éclater". Les formes observées que l'on pourrait appeler figures d'incompatibilité sont caractéristiques et correspondent à celles rapportées par DEVREUX *et al.* (fig. 2). Les pollinisations de type semi-compatible (fig. 1) sont classées comme compatibles dans nos tests puisqu'il est possible de trouver des tubes polliniques à la base des styles.

Pour établir la validité de notre méthode de test de compatibilité nous avons réalisé 16 combinaisons par fécondation contrôlée au champ. Aucun fruit n'a été produit sur les branches correspondant aux combinaisons déterminées comme incompatibles par les tests précédents, alors que pour les combinaisons déterminées comme compatibles la production de fruits a été celle qu'on attend d'une fécondation contrôlée.

2. Matériel

Nous avons utilisé 3 clones de *C. canephora* et leurs descendance provenant des croisements réalisés selon le schéma suivant.



Les clones 77 et 99 ont la particularité d'avoir un parent commun, le clone A1 et donc la possibilité d'avoir hérité d'un même allèle du gène S. Le clone 181 a une origine très différente. Ce sont les descendants de ces différents croisements qui sont testés pour leur réaction de compatibilité.

3. Résultats

3.1. Observation des descendants des croisements 77 x 99 et 99 x 77

Une première série de tests limitée à quelques descendants des croisements réciproques 77 x 99 et 99 x 77 nous a montré qu'il existait parmi ces arbres des descendants incompatibles avec les parents mâles des croisements et d'autres compatibles avec ceux-ci et incompatibles entre eux. Cela correspond à la situation présentée aux tableaux 5 - 6. Afin de confirmer ce résultat nous avons testé un nombre plus important d'arbres des deux croisements par 3 testeurs déterminés au préalable, c'est-à-dire représentant les 3 groupes α , β , γ auxquels on attribue les génotypes suivants :

♀	♂		α		β		γ	
	S ₁	S _x	S ₁	S _x	S ₁	S _x	S ₁	S _x
L25	A1	+	+	0	+	+	+	
L25	A2	+	+	0	+	+	+	
L25	A10	+	+	0	+	+	+	
L10	A10	+	+	0	+	+	+	
L23	A2	+	+	0	+	+	+	
L23	A5	+	+	0	+	+	+	
L23	A6	+	+	0	+	+	+	
L23	A7	+	+	0	+	+	+	
L23	A8	+	+	0	+	+	+	
L25	A3	+	+	+	+	0	0	
L25	A4	+	+	+	+	0	0	
L25	A6	+	+	+	+	0	0	
L25	A7	+	+	+	+	0	0	
L10	A1	+	+	+	+	0	0	
L10	A2	+	+	+	+	0	0	
L10	A5	+	+	+	+	0	0	
L10	A4	+	+	+	+	0	0	
L10	A7	+	+	+	+	0	0	
L10	A8	+	+	+	+	0	0	
L10	A9	+	+	+	+	0	0	
L23	A3	+	+	+	+	0	0	
L23	A4	+	+	+	+	0	0	
L23	A9	+	+	+	+	0	0	
L25	A10	+	+	+	+	0	0	

+ : Combinaison compatible
0 : Combinaison incompatible

Tableau 7 : H16 : 77 x 99

♀	♂		α		β		γ	
	S ₁	S _x	S ₁	S _x	S ₁	S _x	S ₁	S _x
L4	A2	0	+	+	+	+	+	
L4	A3	0	+	+	+	+	+	
L4	A4	0	+	+	+	+	+	
L4	A6	0	+	+	+	+	+	
L4	A7	0	+	+	+	+	+	
L4	A8	0	+	+	+	+	+	
L4	A10	0	+	+	+	+	+	
L28	A4	0	+	+	+	+	+	
L28	A6	0	+	+	+	+	+	
L28	A9	0	+	+	+	+	+	
L26	A6	0	+	+	+	+	+	
L4	A1	+	+	+	+	0	0	
L4	A5	+	+	+	+	0	0	
L4	A9	+	+	+	+	0	0	
L28	A1	+	+	+	+	0	0	
L28	A2	+	+	+	+	0	0	
L28	A3	+	+	+	+	0	0	
L28	A5	+	+	+	+	0	0	
L28	A7	+	+	+	+	0	0	
L28	A8	+	+	+	+	0	0	
L28	A10	+	+	+	+	0	0	
L26	A1	+	+	+	+	0	0	
L26	A2	+	+	+	+	0	0	
L26	A4	+	+	+	+	0	0	
L26	A5	+	+	+	+	0	0	
L26	A8	+	+	+	+	0	0	
L26	A9	+	+	+	+	0	0	
L26	A10	+	+	+	+	0	0	

Tableau 8 : H19 : 99 x 77

♀	I			II			III			IV		
	15-2	15-3	17-10	15-7	15-9	20-1	29-10	20-4	29-4	29-6		
15-2	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+		
15-3	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+		
15-4	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+		
15-5	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+		
15-6	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+		
17-10	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+		
29-9	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+		
15-1	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+		
15-7	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+		
15-8	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+		
17-2	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+		
15-9	+	+	+	+	0	0	0	+	+	+		
15-10	+	+	+	+	0	0	0	+	+	+		
17-1	+	+	+	+	0	0	0	+	+	+		
20-1	+	+	+	+	0	0	0	+	+	+		
20-2	+	+	+	+	0	0	0	+	+	+		
20-8	+	+	+	+	0	0	0	+	+	+		
29-5	+	+	+	+	0	0	0	+	+	+		
29-7	+	+	+	+	0	0	0	+	+	+		
29-10	+	+	+	+	0	0	0	+	+	+		
20-4	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0		
20-6	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0		
29-1	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0		
29-6	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0		

+ : Combinaison compatible
0 : Combinaison incompatible

Tableau 9 : H21 : 99 x 181

α : S₁ S_x identique au parent 77
 β : S₁ S_y identique au parent 99
 γ : S_x S_y différent de 77 et 99

Les résultats apparaissent dans les tableaux n° 7 et 8. Dans chaque croisement on ne trouve que deux groupes α , γ ou β , γ . Un test de χ^2 montre que la répartition entre les deux groupes 9-15 et 11-14 est conforme à une répartition du type 1:1 (χ^2 : 1,3). Etant en accord avec les tableaux 5-6 nous pouvons dire que les arbres 77 et 99 ont hérité d'un même allèle de leur parent commun A1.

3.2. Observation des descendants du croisement 99 x 181

Les combinaisons testées apparaissent dans le tableau 9 ; on voit qu'il existe 4 et seulement 4 groupes parmi les descendants du croisement considéré. Ceci correspond bien à la situation attendue quand les deux parents ont des allèles différents du gène S (tableau 3).

Avec quelques déterminations complémentaires, c'est au total 30 arbres de ce croisement qu'on a pu classer dans les groupes I : 9, II : 6, III : 10, IV : 5. L'hypothèse de 4 groupes ayant une même fréquence peut être acceptée ($\chi^2 = 2,27$, 3 ddl : P = 0,48).

3.3. Observation des descendants du croisement 181 x 77 et relation entre les différents groupes déterminés

Dans ce croisement les arbres se répartissent aussi selon 4 groupes (tableau 10). Le quatrième groupe (D) correspond aux arbres compatibles avec les trois autres groupes. Nous n'avons pas pu montrer que les arbres appartenant à ce groupe sont incompatibles entre eux car l'une des plantes de ce groupe ne produit pas de pollen et l'autre ne fournit que du pollen non viable. La répartition des arbres entre les 4 groupes déterminés est la suivante : A : 6, B : 4, C : 3, D : 2.

Pour ce croisement, sur 14 arbres nous avons pu vérifier que les descendants sont compatibles avec leurs parents 181 et 77.

Dans le tableau 11 nous présentons les résultats des relations de compatibilité entre les groupes I, II, III, IV et A, B, C, D, des croisements 181 x 77 et 99 x 181. Nous voyons que deux groupes de l'un des croisements sont incompatibles avec deux groupes de l'autre croisement. Nous devons donc en conclure que ces groupes ont des génotypes identiques constitués d'un allèle du parent 181 et de l'allèle S₁ commun aux parents 77 et 99.

En attribuant aux parents les génotypes suivants : 77 : S₁ S_x ; 99 : S₁ S_y ; 181 : S₂ S₃, nous pouvons proposer pour les plantes appartenant aux groupes déterminés dans les différents croisements les génotypes ci-après :

α : S ₁ S _x	A : S ₂ S _x ou S ₃ S _x	I	: S ₂ S _y ou S ₃ S _y
β : S ₁ S _y	B : S ₂ S ₁ ou S ₃ S ₁	II=C	: S ₃ S ₁ ou S ₂ S ₁
γ : S _x S _y	C : S ₃ S ₁ ou S ₂ S ₁	III=B	: S ₂ S ₁ ou S ₃ S ₁
	D : S ₃ S _x ou S ₂ S _x	IV	: S ₃ S _x ou S ₂ S _x

Dans l'état actuel de l'analyse génétique il ne nous est pas possible d'attribuer aux différents groupes l'un plutôt que l'autre allèle du clone 181.

♀	♂																					
	A				B				C				D									
	L0 A3	L0 A4	L0 A6	L0 A8	L0 A7	L0 A9	L0 A10	L0 A18	L0 A12	L0 A14	L0 A18	L0 A22	L0 A2	L0 A14	L0 A18	L0 A13	L0 A15	L0 A18	L0 A15	181	77	
L0 A3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L0 A4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L0 A6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L0 A8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L0 A12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L18A18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L0 A17								+				0	0								+	+
L0 A9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L0 A10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L22A18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L0 A2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+
L0 A14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+
L20A18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+
L0 A12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L0 A15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : Combinaison compatible
 0 : Combinaison incompatible
 Case vide : Combinaison non réalisée

Tableau 10

♀	♂											
	181 x 77				99 x 181							
	A	B	C	D	I	II	III	IV	I	II	III	IV
181 x 77	A 0	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
	B +	0	+		+	+	+	+	+	+	0	+
	C +	+	0		+	0	+	+	+	+	0	+
	D +	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
99 x 181	I +	+	+		0	+	+	+	0	+	+	+
	II +	+	0		+	0	+	+	+	0	+	+
	III +	+	0		+	+	+	+	+	+	0	+
	IV +	+	+		+	+	+	+	+	+	+	0

+ : Combinaison compatible
 0 : Combinaison incompatible
 Case vide : Combinaison non réalisée

Tableau 11 : Relation entre les groupes A, B, C, D et I, II, III, IV des descendants des croisements (181 x 77) et (99 x 181).

III. DISCUSSION - CONCLUSION

Tous les résultats exposés sont conformes à ceux attendus dans le cas d'un système d'incompatibilité de type gamétophytique monogénique comportant une série polyallélique. Ces résultats confirment donc l'hypothèse émise par DEVREUX et *al.* (1959) chez l'espèce *C. canephora* considérée. L'étude du déterminisme génétique sera étendue aux autres espèces de caféiers existant dans nos collections ainsi qu'à certains hybrides interspécifiques.

Les travaux déjà cités ayant établi l'autoincompatibilité des différentes espèces de caféiers étaient basés sur l'observation de la production de fruits de branches placées en situation d'autofécondation. Cette méthode présente l'inconvénient de ne pouvoir distinguer plusieurs phénomènes. En effet l'absence de fructification peut non seulement être due à l'arrêt de la germination des tubes polliniques dans le style (incompatibilité) mais aussi à l'absence de germination du pollen (stérilité mâle, mauvaise conservation...) ou encore à des phénomènes de chute précoce des fruits avant ou après nouaison pouvant avoir des causes génétiques ou physiologiques. Il paraît donc plus intéressant pour l'étude de l'incompatibilité d'avoir accès à l'observation du phénomène lui-même, c'est-à-dire la croissance ou l'arrêt de croissance des tubes polliniques dans le style. Des observations de ce type avaient déjà été faites (DEVREUX et *al.* 1959, CONAGIN, 1961) mais seulement pour mettre en évidence l'autoincompatibilité et non l'incompatibilité entre plantes différentes. Avec la méthode que nous proposons il est possible de tester les relations de compatibilité entre de nombreuses plantes. Toutefois notre technique de coloration ne permet pas de suivre l'ensemble des tubes polliniques des grains déposés sur un style. Aussi notre test ne met-il en évidence que deux classes :

- (0) : combinaison incompatible : quand tous les tubes polliniques sont bloqués à la base des stigmates et aucun tube ne peut être observé dans le style (c'est la situation de la figure 1.1.)
- (+) : combinaison compatible : quand les tubes polliniques se trouvent à la base des styles, que des tubes polliniques restent bloqués ou non à la base des stigmates. Nous ne pouvons donc distinguer les situations 2 et 3 de la figure 1.

Une amélioration de la méthode consisterait donc à pouvoir séparer les 3 classes possibles. Nous pensons qu'avec une autre coloration (Bleu d'aniline) pour une observation en fluorescence il devrait être possible d'arriver à ce résultat, cette méthode permettant de suivre un grand nombre de tubes polliniques dans le style (HAMON, 1979). L'estimation du nombre d'allèles S intervenant dans les différentes populations des espèces de *Coffea* en serait facilitée.

Par ailleurs, la méthode est suffisamment rapide pour cribler un grand nombre d'arbres et trouver des plantes autocompatibles chez les caféiers allogames, c'est-à-dire dont le système d'incompatibilité a un fonctionnement modifié. Nous disposerions alors de la possibilité d'obtenir des plantes très homozygotes qui pourraient être introduites dans les programmes d'amélioration des caféiers.

BIBLIOGRAPHIE

- CHARRIER, A., 1972.- L'intercompatibilité des clones de caféiers cultivés sur la côte est malgache.
Café, Cacao, Thé, vol. XVI, n° 2, pp. 111-122.
- CHARRIER, A., 1976.- La structure génétique des caféiers spontanés de la région malgache (*Mascarocoffea*). Leurs relations avec les caféiers d'origine africaine (*Eucoffea*). Thèse Université Paris Sud. Mém. ORSTOM N° 87, 1978.
- CONAGIN, C.H.T.M., 1961. Microsporogénèse, incompatibilidade e esterilidade masculina em *Coffea congensis*.
Bragantia, 20, pp. 669-677.
- CONAGIN, C.H.T.M., MENDES, A.J.T., 1961.- Pesquisas citologicas e geneticas em tres especies de *Coffea*. Autoincompatibilidade em *Coffea canephora*.
Bragantia, 20, pp. 787-804
- DUBLIN, P., 1957.- Recherches sur la floraison et la fructification du caféier de la "Nana".
L'Agronomie tropicale, 12 (2) pp. 132-208.
- DUBLIN, P., 1960.- Biologie florale du *C. dewevrei*. 3ème partie : Floraison pollinisation, fécondation.
L'Agronomie tropicale, 2, pp. 189-212.
- HAMON, S., 1979.- Etude de l'incompatibilité dans le genre *Coffea*. Rapport de stage. Centre ORSTOM d'Adiopodoumé., 7 p.
- MEDINA, D.M., CONAGIN, C.H.T.M., 1959.- Autoincompatibilidade em *Coffea dewevrei*.
Bragantia, 18, pp. 283-293
- MENDES, C.H.T., Introdução ao estudo da autosterilidade no genero *Coffea*.
Bragantia, 9, pp. 35-41.
- MONACO, L.C., CARVALHO, A., 1972.- Melhoramento de *Coffea canephora* e *C. congensis*.
I. Determinação de compatibilidade.
Bragantia, 31, pp. 401-409.
- NETTANCOURT, (D. de), 1977.- Incompatibility in Angiosperms. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 230 p.
- THOMPSON, M.M., 1979.- Incompatibility alleles in *Corylus avellana* L. cultivars.
Theor. Appl. Genetics, 55, pp. 29-33.

**ANALYSE EN ÉLECTROPHORÈSE DU POLYMORPHISME
BIOCHIMIQUE DES CAFÉIERS :**
Variation enzymatique dans dix-huit populations sauvages
Variation de l'ADN mitochondrial dans les espèces :
C. canephora*, *C. eugenioides* et *C. arabica



F. Berthou

F. BERTHOU, P. TROUSLOT, S. HAMON

ORSTOM, Centre d'Adiopodoumé, B.P. V51, Abidjan, Côte d'Ivoire

F. VEDEL, F. QUETIER

Université de Paris-Sud, Orsay, France

L'analyse en électrophorèse du polymorphisme des caféiers regroupe deux études réalisées, la première, au Centre O.R.S.T.O.M.d'Adiopodoumé (Côte d'Ivoire), sur la variation enzymatique dans les populations sauvages de caféiers, la seconde, à l'Université de Paris-Sud à Orsay (France), sur la variation de l'ADN mitochondrial dans quelques espèces du genre Coffea.

Le premier type d'analyse caractérise la population par ses fréquences allozymiques. Il contribue essentiellement à déterminer pour chaque espèce les modèles de variation qui lui sont propres, en fonction des Hétérozygoties moyennes et des Distances génétiques entre populations. Notons qu'un allozyme est une forme moléculaire repérée en électrophorèse comme l'expression d'un gène : c'est un marqueur nucléaire.

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

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

1° partie : la variation enzymatique dans les populations sauvages

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

Le matériel végétal

Sur le Tableau I figurent les localités d'origine et les effectifs par population dans les 7 taxons étudiés :

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

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

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

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

Les méthodes biochimiques

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

Une série d'analyses se propose pour but l'observation de 8 électrophorogrammes d'enzymes différents sur 20 à 40 individus d'une même population (Figure I).

Elle met en jeu un procédé d'extraction rapide (BERTHOU et TROUSLOT, 1977) et 4 électrophorèses simultanées, utilisant deux variantes de la technique d'électrophorèse en gel d'amidon de SMITHIES, 1955 : pour chaque individu, en effet, l'extrait brut utilisé est fractionné en 4 aliquots qui migrent simultanément dans 4 gels différents, durant 20 H, sous une tension de 6 V/cm, à 10°C.

Les deux variantes de la technique d'électrophorèse adoptée sont, d'une part, celle de SPENCER, HARRIS et HOPKINSON (1964) in I. SMITH (1968) pour l'analyse des 4 enzymes : Phosphoglucomutase BREWER (1970) Estérase α et β SCANDALIOS (1969), Leucine aminopeptidase

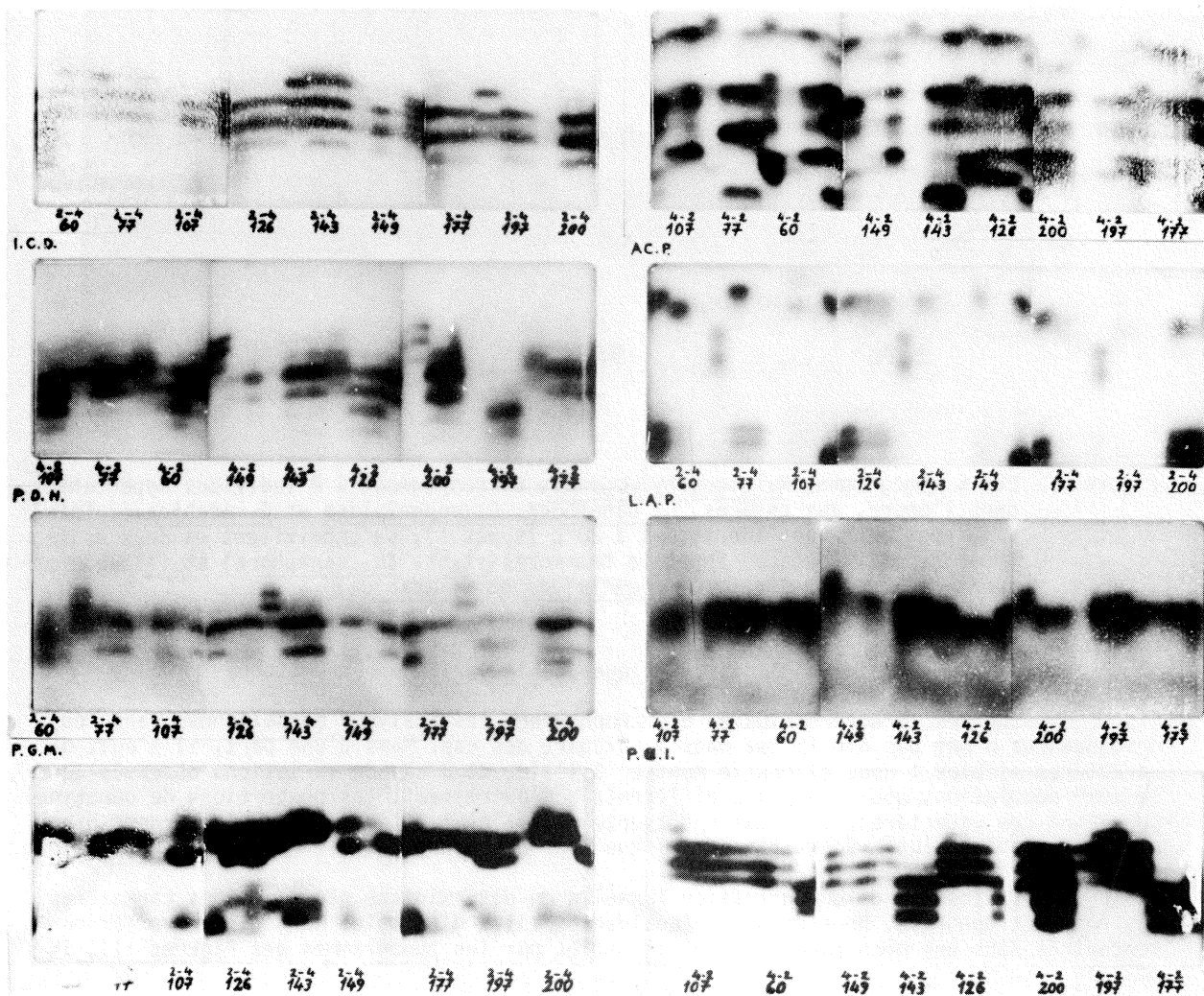


Fig. I - Les 8 zymogrammes révélés en électrophorèse simultanée de 8 enzymes, pour identifier une série de 9 génotypes *C. canephora* ; colonne de gauche : 3 oxydoréductases : Malate déshydrogénase ; Isocitrate déshydrogénase ; 6 Phosphogluconate déshydrogénase et 1 transférase : Phosphoglucomutase ;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

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

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

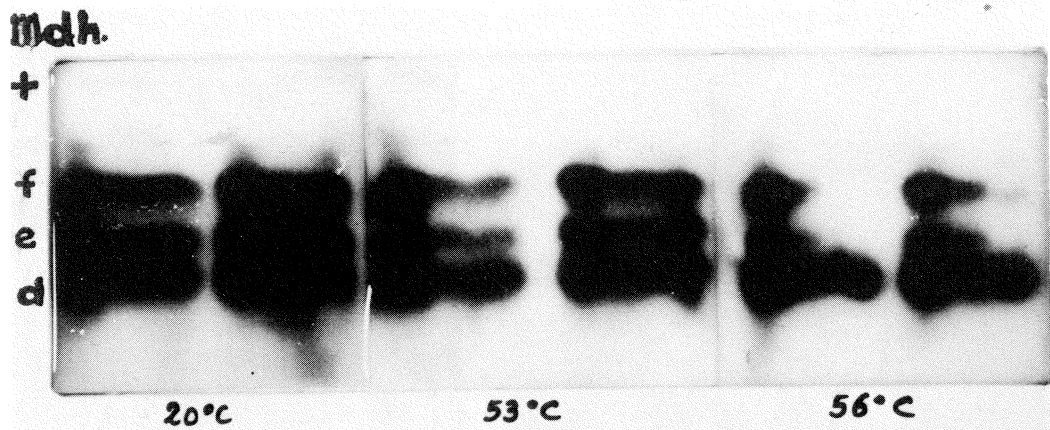


Figure 11 - Les 6 zymogrammes Malate déshydrogénase correspondent à 6 individus appartenant, dans l'ordre, aux espèces, C. canephora, C. eugenioïdes et C. arabica (2 fois). Les types observés, identiques à 20°C (types f), se subdivisent en deux sous-types à 56°C : f bande frontale thermorésistante (C. canephora) et f' bande frontale thermosensible (C. eugenioïdes et C. arabica)

Les bases génétiques de la variation enzymatique

Sur les caractères lus en électrophorèse, les analyses mendéliennes dans les descendance n'ont pas été faites dans la plupart des cas. Mais d'une part, il s'agit de caractères simples : nous allons le montrer à l'aide de 3 cas de variations observés dans la même population, pour 3 enzymes différents ; d'autre part, les proportions de génotypes possédant ces caractères, à l'état homozygote et à l'état hétérozygote, s'accordent bien avec l'hypothèse d'une répartition allélique dans des populations en équilibre panmixtique.

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

La variation pour l'enzyme 6-Phosphogluconate déshydrogénase (Figure III) représente la situation la plus simple : sur le schéma des électrophorégrammes porté en bas de cette Figure, nous observons des numéros (02, 04, etc...) qui désignent 21 génotypes au total de la population C. canephora Ira, et des lettres (Tcg et TAr), qui désignent les génotypes témoins appartenant à d'autres espèces. Abstraction faite des témoins, les zymogrammes présentent deux cas de figure : soit une seule bande, qui est basse et notée b (voir les clones 18 et 124), médiane et notée e (voir les clones 166 et autres) ou haute et notée j; soit trois bandes qui ont les caractéristiques suivantes : associations des bandes : b - j (voir les clones 02 et 04), b - e (voir le clone 166 et autres), e - j (voir les clones 05 et 07) avec bande intermédiaire, généralement deux fois plus intense, et située en position médiane vis-à-vis des précédentes. Ce cas de figure manifeste une structure de l'enzyme de type dimère : les bandes extrêmes sont les homodimères et la bande médiane, l'hétérodimère formé par l'association des deux allozymes présents chez l'hétérozygote, dont la constitution est notée (b,j), (b,e) ou (e,j). Dans cette population, les 41 individus analysés se répartissent comme suit : 10 (e,e) - 15 (b,e) - 5 (b,b) - 4 (b,j) et 7 (e,j), ce qui permet de calculer les fréquences alléliques au locus "3" (colonne "F" du tableau I de l'annexe.)

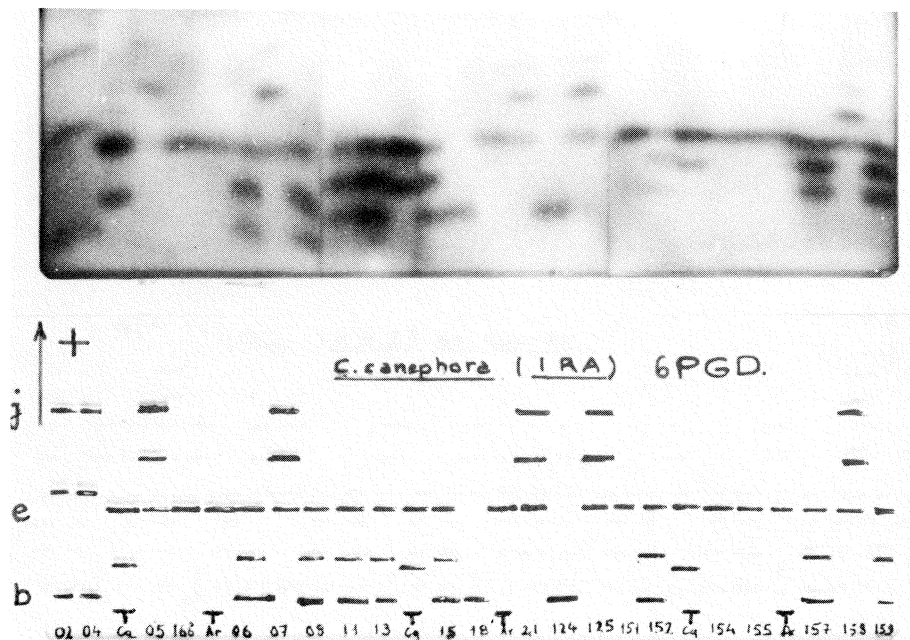


Fig. III - Série de zymogrammes 6Pgd, observés dans la population *C. canephora* Ira : deux types correspondants à des génotypes homozygotes, b et e, et trois types correspondants à des génotypes hétérozygotes, he, bj et ej ; l'homozygote de type j a été également observé dans les mêmes conditions.

La variation pour l'enzyme Phosphoglucose isomérase dénote une situation presque identique : présence de 3 allèles à un même locus. Dans ce cas, les allozymes sont aussi désignés par les lettres d, f et h en fonction de leur position, mais cette fois, chaque allozyme se présente sous la forme de 3 bandes inséparables et d'intensité égale. Cette figure a déjà été analysée chez d'autres organismes : NOLTMANN(1975) : Elle correspond dans certains organismes à une modification post-transcriptionnelle du produit du gène codant la Phosphoglucose isomérase. Il s'agirait d'"isozymes secondaires" suivant la classification de HARRIS et HOPKINSON (1976). Les génotypes homozygotes manifestent donc 3 bandes, et les hétérozygotes 5 ou 7 bandes (Figure IV). Sur 41 individus analysés, nous avons observé : 26 types (d,d) - 8 types (d,f) - 3 types (f,f) - 3 types (d,h) et 1 type (h,h).

Enfin, la variation pour l'enzyme Phosphoglucomutase manifeste deux types de protéines qui migrent en électrophorèse en deux zones différentes du gel. Cette situation indique probablement un déterminisme génétique qui fait intervenir deux loci : Pgm-1 et Pgm-2, avec pour chacun d'eux, une série allélique comportant deux allèles désignés par les lettres : (pgm-1)b et c, (Pgm-2)e et f. Les génotypes homozygotes présentent deux bandes, les hétérozygotes partiels, 3 bandes, et les hétérozygotes aux deux loci, 4 bandes (Figure V).

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

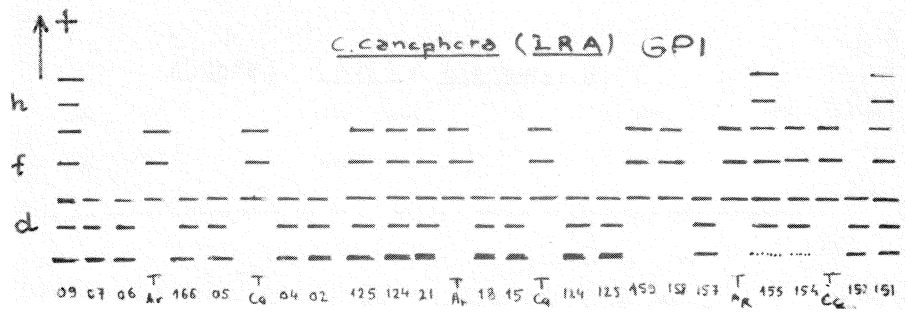


Fig. IV - Série de zymogrammes : Phosphoglucose isomérase observés dans la population *C. canephora* Ira : les types à 3 bandes :d (clônes 07 et autres) ou f (clône 158 et 159) manifestent deux des trois génotypes homozygotes présents ; les types à 5 et 7 bandes df clônes (125 et 124) dh (09 et autres)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

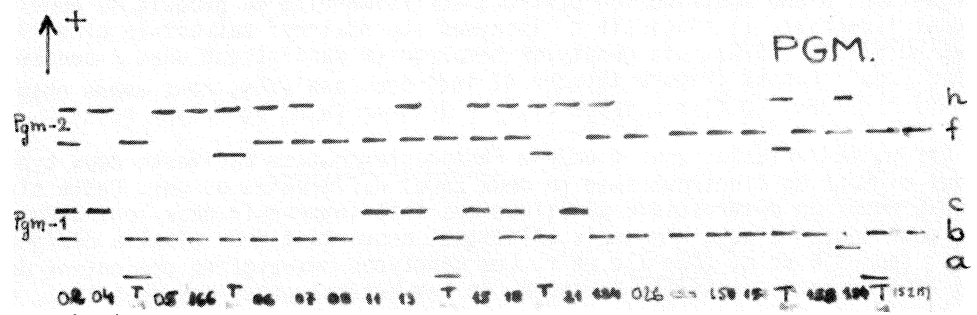
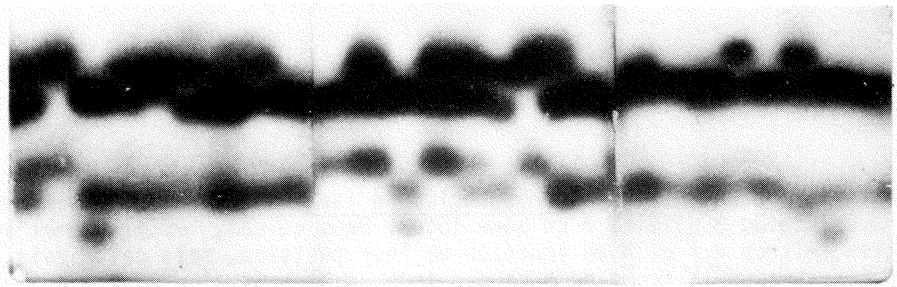


Fig. V - Série de zymogrammes : Phosphoglucomutase observés dans la population *C. canephora* Ira : les types à deux bandes bf, bh ou cf, ch correspondent à des génotypes homozygotes aux loci *pgm-1* et *pgm-2* ; Les types à 3 bandes sont hétérozygotes à l'un ou l'autre de ces loci ; Les types à 4 bandes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

Tableau II - Caractères analyses des huit zymogrammes

	Déterminisme			Nombre de bandes	
	non génétique	à plusieurs loci	pluri-allélique	à l'état homozygote	à l'état hétérozygote
1 Malate-déshydrogénase	0	0	1	3	5 - 7
2 Isocitrate déshydrogénase	1	0	1	3	4 - 7
3 6-Phosphoglucuronate déshydrogénase	0	0	1	1	3
4 Phosphoglucosmutases	0	1	1	2	3 - 4
5 Estérases α	0	1	1	2	3 - 4
5 Estérases β	0	0	1	1	2
6 Phosphatases acides	0	1	1	2	3 - 4
7 Leucine aminopeptidase	0	0	1	1	2
8 Phosphoglucose isomérase	1	0	1	3	5 - 9

Les fréquences allozymiques par population

Au niveau de l'étude de Polymorphisme, la présentation des résultats occupe deux parties : la présentation analytique des fréquences allozymiques par population, suivie d'une présentation synthétique d'indices calculés à partir des fréquences alléliques (l'Hétérozygotie moyenne par population ; la Distance Génétique par couple de population).

Tableau III - Disposition des résultats analytiques

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

Distribution de la variabilité enzymatique

A la suite des prospections de caféiers en Centrafrique (J. BERTHAUD et J.L. GUILLAUMET, 1978), au Kenya (J. BERTHAUD et al., 1980) et en Côte d'Ivoire (J. BERTHAUD c.v.), l'analyse de la variation enzymatique porte sur 18 populations sauvages. Les situations rencontrées sont diverses et fort instructives.

Les caractéristiques du tableau **IV**, c.à.d. l'Hétérozygotie moyenne par population et la Distance génétique par couple de population, intraspécifique, selon NEI (1972, 1974) contribuent à établir pour chacune des espèces les différents modèles de distribution de la variation qui lui sont propres.

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

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

Une hétérozygotie moyenne aussi faible correspond à l'observation d'un seul locus polymorphe (Isocitrate déshydrogénase) sur les 7 loci analysés chez cette espèce ; une distance génétique intraspécifique aussi forte entre deux populations correspond à un couple de populations ayant fixé des allèles différents aux 7 loci. Dans ce cas, nous avons affaire à une espèce qui subsiste sous forme d'isolats, c.à.d. de populations dispersées et appauvries, séparées depuis fort longtemps.

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

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

Une hétérozygotie moyenne aussi forte correspond à l'observation de l'état polymorphe dans la totalité des 7 loci étudiés ; une Distance génétique intraspécifique traduit le fait que les deux populations les plus éloignées possèdent en commun encore 13 des 22 allèles observés.

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

- (c) L'espèce C. liberica est caractérisée par une distance génétique intrapays faible :

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

et une distance interpays forte :

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

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

Dans l'espèce C. canephora, la distance génétique interpays est du même ordre que la distance génétique interpays déterminé pour l'espèce C. liberica :

$$D = 0,44$$

et les Hétérozygoties moyennes sont comparables :

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

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

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

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

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

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

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

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

(e) La variation dans l'espèce *C. eugenioïdes* est caractérisée par une hétérozygotie moyenne forte et une Distance génétique intraspecies forte.

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

Il y a donc intérêt à prospecter en détail l'aire de répartition de cette espèce. Les différentes valeurs des caractéristiques de la variation allozymique

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

Tableau IV - Caractéristiques de la variation allozymique

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

L'intérêt et les limites de l'analyse enzymatique

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

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

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

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

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

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

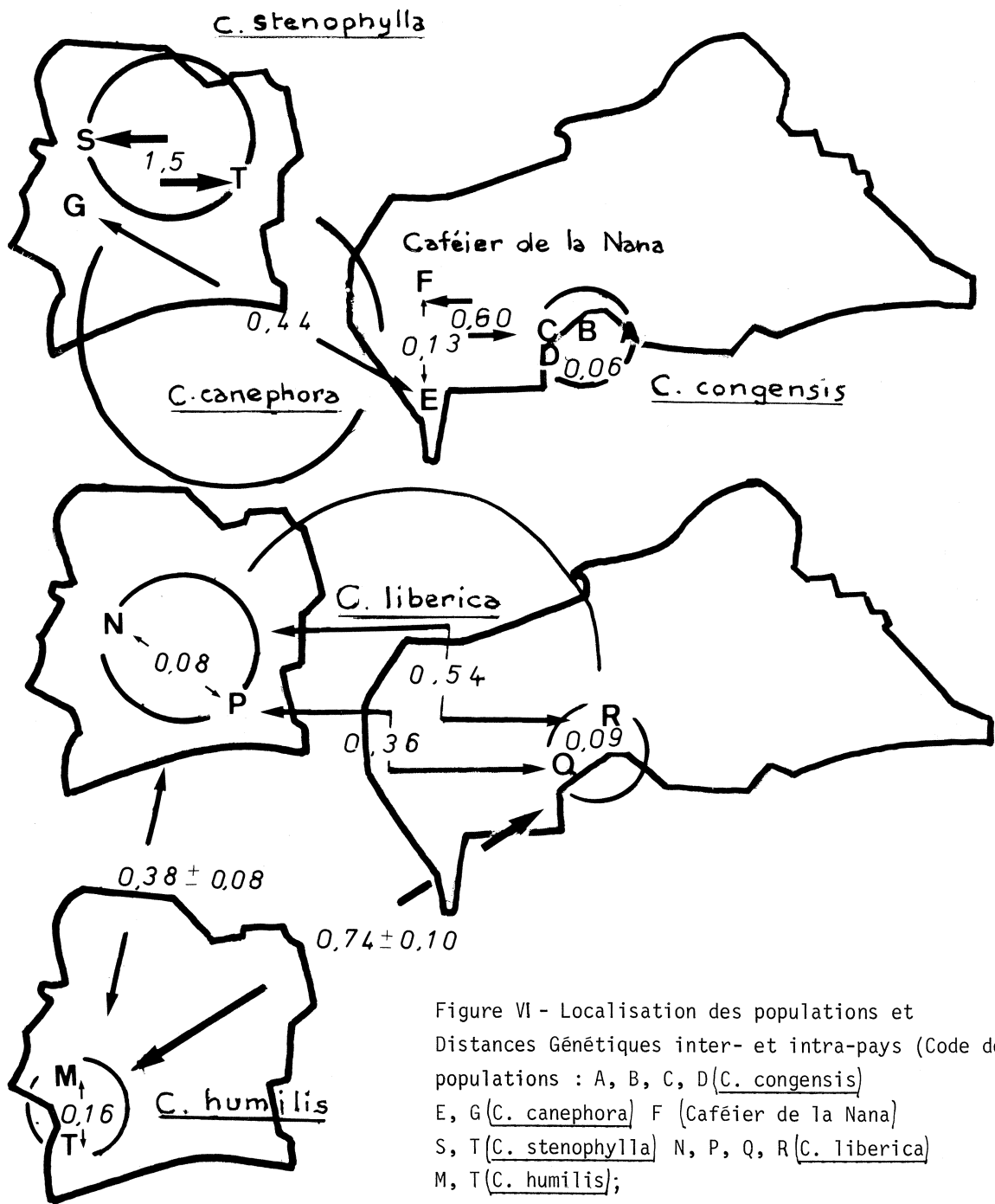


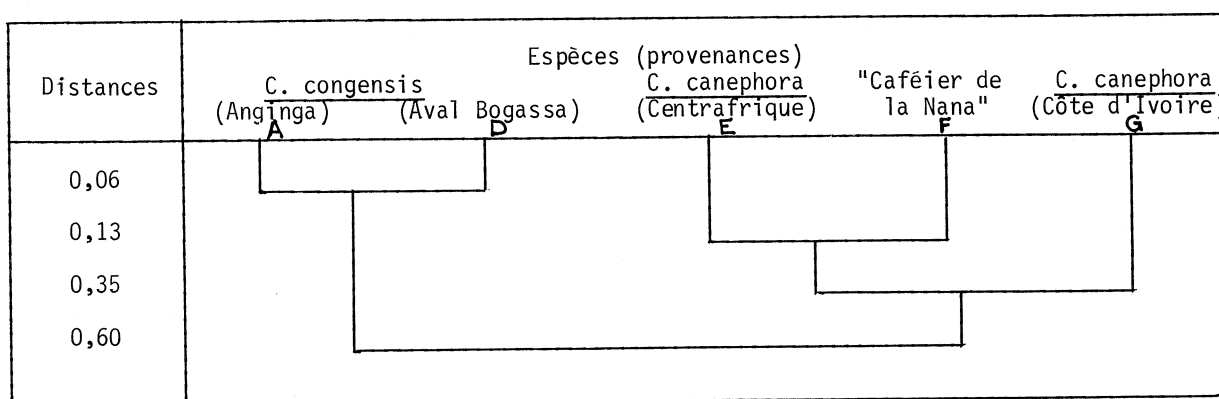
Figure VI - Localisation des populations et Distances Génétiques inter- et intra-pays (Code des populations : A, B, C, D (*C. congensis*) E, G (*C. canephora*) F (Caféier de la Nana) S, T (*C. stenophylla*) N, P, Q, R (*C. liberica*) M, T (*C. humilis*);

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

- (b) Le couple *C. canephora* - *C. congensis* fait exception : la Distance Génétique interspécies est très supérieure à la Distance Génétique interprovenance intraspécifique. *C. canephora* - *C. congensis* D = 0,61 ± 0,09, (*C. canephora* - Côte d'Ivoire et *C. canephora* - Centrafrique D = 0,44). Les deux espèces se distinguent bien en électrophorèse.
- (c) De même, le couple *C. congensis* - "Caféier de la Nana" D = 0,50 ± 0,05. Par contre, le couple *C. canephora* - "Caféier de la Nana" est inséparable par ces méthodes. D = 0,20. Seuls quelques génotypes qui portent le marqueur Phosphatase acide - 1 (b) de l'espèce *C. congensis* se singularise de cet ensemble *C. canephora* - "Caféier de la Nana".

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

Tableau V : Distances Génétiques interspécies



En conclusion, l'intérêt de l'analyse de la variation allozymique dans les populations sauvages de caféier réside dans cette détermination de la distribution géographique et phyllétique de la variation génétique, dans la reconnaissance des affinités entre espèces (voir aussi BERTHOU et TROUSLOT, 1979), et de la répartition des marqueurs dans les zones prospectées. Par exemple, les marqueurs 6 Phosphogluconate déshydrogénase (l) et Phosphatase acide (k) caractéristiques de *C. arabica* et peu représentés chez *C. eugenioides* se retrouvent essentiellement dans la zone de Taressia ; les limites de cette méthode se manifestent sur le plan génétique et sur le plan biochimique.

(a) génétique : les marqueurs sont d'importance réduite, en nombre et en signification évolutive ; (b) biochimique : le test de similarité électrophorétique peut être invalidé par un test de thermosensibilité. Par exemple, la Figure II montre que des zymogrammes *C. canephora*, *C. eugenioides*, *C. arabica* identiques à 20°C, se révèlent différents à 56°C, l'isozyme situé en position distale étant thermorésistant chez *C. canephora* et thermosensible chez *C. eugenioides* et *C. arabica*. Pour l'analyse des relations phyllétiques entre espèces, il est donc nécessaire d'envisager d'autres méthodes biochimiques.

2e partie : Analyse de l'ADN mitochondrial - premiers résultats

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

Les profils (b) et (c) ont été reproduits à deux reprises, pour un résultat strictement identique : (c) *C. arabica* provenant soit d'un mélange de deux clones

(Ethiopie 8 et 362) prélevé en collection à Man (Côte d'Ivoire), soit d'un mélange d'un plus grand nombre de clones d'Ethiopie cultivés en serres à Bondy (France) ; (b) C. eugenioïdes provenant d'un mélange de clones de l'Est Kenyan, prélevé soit en collection à Divo (Côte d'Ivoire), soit en serres à Montpellier (France). Le profil (a) correspond à un seul clone C. canephora 315 cultivé en serre à Bondy. L'isolement des mitochondries, l'extraction et l'hydrolyse de l'ADN mitochondrial sont réalisés suivant les procédés développés par VEDEL et QUETIER (1978).

Les profils manifestent des homologies :

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

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

Tableau VI - Nombre de fragments d'ADN mitochondrial et taux d'homologie avec C. arabica.

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

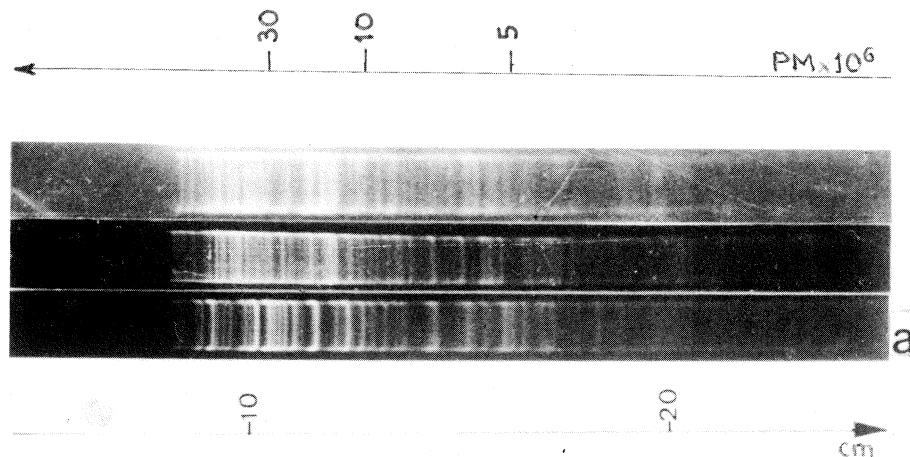


Figure VII - Electrophorèse en gel d'agarose des fragments d'ADN mitochondriaux obtenus à partir de feuilles (a) C. canephora (b) C. eugenioïdes (c) C. arabica, par l'enzyme de restriction Sal I.

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

Ce résultat étaye une hypothèse déjà ancienne qui fait intervenir une espèce diploïde proche de C. eugenioïdes à l'origine de la formation de l'espèce tétraploïde C. arabica, hypothèse récemment corroborée par l'étude du Polymorphisme enzymatique (BERTHOU et TROUSLOT, 1979). Comme l'ADN mitochondrial est un marqueur génétique non nucléaire, ce résultat permet de supposer en outre que C. arabica et C. eugenioïdes descendent d'un même ancêtre proche de C. eugenioïdes.

BIBLIOGRAPHIE

- BERTHAUD (J.) et GUILLAUMET (J.L.) (1978-1980) Rapport de prospection des caféiers sauvages en Centrafrique. Café, Cacao, Thé Vol. XXII et XXIV .
- BERTHOU (F.), TROUSLOT (P.) (1977). L'analyse du polymorphisme enzymatique dans le genre Coffea : adaptation d'une méthode d'électrophorèse en série ; premiers résultats. 8e Colloq. ASIC, Abidjan.
- BREWER (C.J.) (1971). An introduction to isozymes techniques. Acad. Press New York, 185 p.
- HARRIS (H.) et HOPKINSON (D.A.) (1976). Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. North Holland Publishing Company, Amsterdam.
- NOLTMANN (E.A.) (1975). The different origin of multiple molecular forms of phosphoglucose isomerase. Isozymes I. molecular structure. Markert CL.
- SCANDALIOS (J.G.) (1969). Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. Biochemical Genetics 3 : 37-79.
- SHAW (C.R.) et PRASAD (R.) (1970). Starch gel electrophoresis of enzymes, a compilation of recipes. Biochemical Genetics 4 : 297-320
- SMITH (I.) (1968). Electrophoretic techniques.
- SMITHIES (O.) (1955). Zone electrophoresis in starch gels. Group variations in the serum proteins of normal human adults. Biochemical Journal 61 : 629-641.
- TROUSLOT (P) et SECOND (G) (1980). Technique d'électrophorèse en gel d'amidon appliquée au Riz. Travaux et Documents O.R.S.T.O.M. n° 120.
- VEDEL (F.) et QUETIER (F.) (1978). Hydrolyse spécifique de l'ADN chloroplastique et de l'ADN mitochondrial des végétaux supérieurs par les enzymes de restriction. Physiol. vég. 16 (3) : 441-425.
- VEDEL (F.) et QUETIER (F.) (1978). Study of wheat phylogeny by EcoRI analysis of chloroplast and mitochondrial DNAs . Plant Sci. Letters 13 : 97-102.
- NEI (M) (1972). Genetic distance between populations. Amer. Nat. , vol. 106 , p. 283.
(1974) Genetics , vol. 76, p 379.

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

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

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

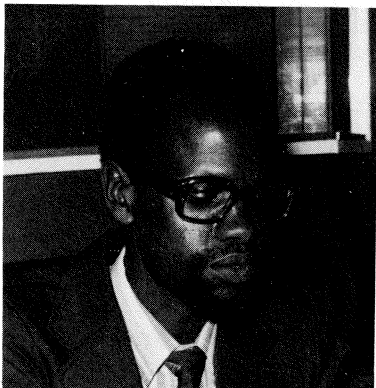
Locus et allèle	<i>C. humilis</i>		<i>C. liberica</i>				<i>C. stenophylla</i>	
	Taī (L)	Momy (M)	Ira (N)	Aboisso (P)	Bimbo (Q)	Pama (R)	Ira (S)	Assabli (T)
1. Malate déshydrogénase								
Mdh ^b	0,09	0,03	-	-	-	0,12	-	-
Mdh ^f	0,82	0,97	1,00	1,00	0,97	0,66	1,00	1,00
Mdh ^g	-	-	-	-	0,03	0,22	-	-
Mdh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

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

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

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

THE INHERITANCE OF CBD RESISTANCE IN ARABICA COFFEE



D.J. Walyaro

H. A. M. Van der VOSSEN, D. J. WALYARO

Coffee Research Foundation, Ruiru, Kenya

Coffee Berry Disease (CBD) is still the major problem for coffee production in Kenya. The experience of the last few years has taught us again that even very intensive spray programmes with fungicides cannot prevent considerable crop losses under excessively wet weather conditions. However, the breeding programme at Ruiru, which started some nine years ago, has made considerable progress and many genotypes which combine resistance to CBD and Leaf Rust with high yield and good quality are now being tested in field trials established in the major coffee districts. We expect to be able to start issuing disease resistant plant material to the Kenyan coffee growers by 1987.

Simultaneously with the breeding programme, studies were carried out to obtain information on the inheritance of the CBD resistance as found in such varieties like Rume Sudan, Hibrido de Timor, K7 and other important progenitors of our breeding programme. The continuous variation in resistance to CBD observed in genetically heterogeneous natural populations of *Coffea arabica*, such as found in Ethiopia, made Robinson (1974, 1976) and Van der Graaff (1978) to assume that the inheritance of CBD resistance should be of a polygenic nature. However, earlier studies in Kenya (Waller, 1971; Cook, 1975) showed that various macro- and micro-climatical factors cause considerable variation in CBD incidence even in uniformly susceptible coffee fields. Such large environmental variation would seriously bias any genetic interpretation of the CBD inheritance if based on field observations only.

On the other hand, in the CBD preselection test, which is based on disease symptoms developing on the hypocotyl stems of 6-week old seedlings after artificial inoculation with a spore suspension of the CBD pathogen, the two most important environmental factors for CBD infection, humidity and temperature, can be controlled to a very great extent. In actual fact, the results of this preselection test are very well correlated with mature plant resistance (Van der Vossen et al, 1976). Therefore, we believe that this CBD preselection test was the only reliable basis for our inheritance studies.

The preselection test was applied to: (1) F_2 progenies derived from a half-diallel between 11 varieties of arabica coffee which ranged from highly CBD resistant (Rume Sudan, Pretoria, Hibrido de Timor) and medium resistant (K7, Padang) to completely susceptible (SL 28, SL 34, Caturra, Erecta, Moka, Laurina) and (2) sets of P_1 , P_2 , F_1 , F_2 , B_{11} and B_{12} generations from crosses between the resistant varieties Rume Sudan, Hibrido de Timor, K7 and susceptible varieties SL 28, SL 34, N218 and Dilla.

The mean grade of infection per progeny (of 130 - 140 seedlings) of the diallel cross was used as data for an analysis of genetic variation. Estimates were obtained of general (GCA) and specific (SCA) combining ability and other genetic parameters such as heritability and the dominance relations among the parents. The mean grade of infection for the sets of parents and F_1 - B_{12} generations mentioned under (2) above were used for tests of non-allelic interaction and also for estimates of various genetic parameters. At the same time the frequency distributions of the infection grades of various generations were used for a qualitative analysis of the inheritance of the CBD resistance. Full details of these quantitative and qualitative genetic analyses have been presented in a recent publication by Van der Vossen and Walyaro (1980) in the journal *Euphytica*. We shall, therefore, restrict ourselves here to a review of the main conclusions derived from these studies.

The resistance to CBD is, at least in the studied arabica coffee material, controlled by only a few major genes with unequal (i.e. almost complete dominance to recessive) gene action. The significant non-allelic interaction present in crosses with the highly resistant variety Rume Sudan as one parent, which appeared to be of a duplicate nature, indicates the presence of at least two loci with resistance genes in this variety. Two loci with CBD resistance genes appeared also to be present in Pretoria, but in the varieties Hibrido de Timor and K7 only one gene for resistance could be detected with intermediate gene action for the former and recessive gene action for the latter variety.

Further information of the exact genotypes was obtained from the segregation pattern in the 10 F_2 families of a 5 x 5 half diallel between these four CBD resistant varieties and the susceptible SL 28 (or N39). The relative frequencies of seedlings over the 12 disease grades in the CBD preselection test for these 10 F_2 families and the 5 parental varieties are presented diagrammatically in Fig 4 of Van der Vossen & Walyaro (1980).

With two or more genes segregating, the distinction between genotypes became very difficult, since there was a considerable overlap in resistance classes. However, this half diallel enabled us to base the genetic analysis solely on the percentage truly susceptible (grades 9 - 12) seedlings. This was considered a more or less unbiased criterion.

In crosses between Rume Sudan or Pretoria and K7 no segregation into susceptible types was observed. The few susceptible ones noticed in the cross Rume Sudan x K7 or Pretoria x K7 are most likely abnormal seedlings such as also regularly appear even in pure varieties, a common phenomenon in arabica coffee (Mendes, 1954, Van der Vossen et al, 1976). This confirms that one locus in Rume Sudan as well as in Pretoria is homozygous for the resistance gene (KK) with recessive effect also present in K7. The high degree of dominance found in Rume Sudan, according to the quantitative genetic analysis, and the two-gene segregation pattern in the F_2 of the cross Rume Sudan x SL 28 indicates that this variety is also homozygous for a dominant resistance gene (R_1R_1). The genotype of Pretoria very closely resembles that of Rume Sudan as regards CBD resistance as is also shown by the absence of segregation into susceptible seedlings in the F_2 of the cross R. Sudan x Pretoria. The slightly higher mean grade of infection for Pretoria compared to Rume Sudan could be explained by assuming multiple

alleles on the R-locus (or very closely linked genes). The R_1 -allele of Rume Sudan would have a stronger effect than the R_2 -allele of Pretoria.

Hibrido de Timor as a pure variety is as resistant as Rume Sudan but the segregation pattern in the F_2 progeny in crosses with a susceptible variety indicates segregation of one gene with intermediate action. In crosses with other resistant varieties — R. Sudan, Pretoria and K7 — there is always segregation into susceptible seedlings which would mean that the resistance of Hibrido de Timor is controlled by a gene on a third locus (TT).

The proposed genotypic constitution for the four CBD resistant varieties is therefore as following (see also Table 8 in Van der Vossen and Walyaro, 1980).

Rume Sudan	R_1R_1	KK	tt
Pretoria	R_2R_2	KK	tt
Hibrido de Timor	rr	kk	TT
K7	rr	KK	tt
SL 28	rr	kk	tt

Although Coffea arabica is an allotetraploid with normal diploid meiotic behaviour, the affinity between homeologous chromosomes of the two genomes (Mendes & Bacchi, 1940; Berthaud, 1976) indicates that the amount of duplicated genetic material is still considerable. It is therefore likely that in Rume Sudan and Pretoria the dominant R-gene and recessive K-gene occur on comparable loci of two homeologous chromosomes. The results of the quantitative genetic analysis indicated also that the non-allelic interaction was of the duplicate type. Hibrido de Timor is believed to have originated from natural interspecific hybridization between arabica and robusta coffee (Bettencourt, 1973). The arabica parent was probably a CBD susceptible variety and the T-gene for CBD resistance came most likely from the robusta parent. The nature of its origin strengthens our earlier conclusion that the T-locus is quite distinct from the R- and K-loci found in pure arabica varieties.

As regards the type of resistance and its expected stability, we have in the past years collected hundreds of different isolates of the CBD pathogen. Some variation in aggressiveness was noticed in inoculation tests, but so far none of the isolates was found to be pathogenic on varieties carrying any of the earlier mentioned resistance genes. Similarly, Van der Graaff (1978) also failed to detect differential pathogenicity of CBD isolates collected in Ethiopia. Recent studies carried out at Ruiru (Masaba, 1979) indicate that the resistance to CBD is to an important extent based on the formation of barriers of suberized phelloderm in the pericarp of berries or the cortex of hypocotyl stems which effectively prevent the pathogen from further invading.

There are thus indications that the resistance to CBD as used in our breeding programmes is likely to be of a stable nature, although controlled by only a few major genes. The final proof will come many years after large areas will have been planted with CBD resistant genotypes of arabica coffee. However, one method of increasing the stability of the resistance is to accumulate as many resistance genes in one genotype as possible (Parlevliet & Zadoka, 1977). These inheritance studies show that it can be best achieved by combining the Rume Sudan type of resistance with that of Hibrido de Timor as this will accumulate resistance genes on three different loci.

We are trying to identify other CBD resistance genes, especially in genotypes originating from Ethiopia. So far we have found that the CBD

resistance in genotypes of our germplasm from Ethiopia is determined in the majority of cases by one (dominant) gene and in a few cases by two genes, but the resistance genes appear not different from those present in the CBD resistant varieties used in our breeding programme.

R e f e r e n c e s

- Berthaud, J (1976). Etude cytogenetique d'un haploide de Coffea arabica L. Cafe Cacao The 20: 91 - 96.
- Bettencourt, A J (1973). Consideracoes gerais sobre o Hibrido de Timor. Inst. Agron. Campinas Circular No. 23, 20p.
- Cook, R T A (1975). The effect of weather conditions on infection by coffee berry disease. Kenya Coffee 40(47): 190 - 197.
- Masaba, D M (1979). The mechanism of resistance to CBD in coffee. Varietal differences in wound-reaction after CBD infection on berries and hypocotyl stems. Unpubl. Report, Coffee Research Foundation, Kenya.
- Mendes, A J T (1954). Observacoes citologicas em Coffea XIX: Monosomicas. Bragantia 14: 137 - 140.
- Mendes, A J T & O Bacchi (1940). Observacoes citologicas em Coffea V: Uma Variedade haploide "di-haploide" de C. arabica. Inst. Agron. Campinas Bol. Tec. 77.
- Parlevliet, J E & J C Zadoks (1977). The integrated concept of disease resistance, a new view including horizontal and vertical resistance in plants. Euphytica 26: 5 - 12.
- Robinson, R A (1974). Terminal Report of the FAO coffee pathologists to the government of Ethiopia, pp 17. Rome: FAO AGO/74/443.
- Robinson, R A (1976). Plant Pathosystems. Advanced series in Agric. Sci. 3, Springer Verlag Berlin, New York, 164 p.
- Van der Graaff, N A (1978). Selection for resistance to coffee berry disease in arabica coffee in Ethiopia. Evaluation of selection methods. Neth. J. Pl. Path. 84: 205 - 215.
- Van der Vossen, H A M, R T A Cook & G N W Murakaru (1976). Breeding for resistance to coffee berry disease caused by Colletotrichum coffeanum Noack (sensu Hindorf) in Coffea arabica L. I Methods of preselection for resistance. Euphytica 25: 733 - 745.
- Van der Vossen, H A M & D J Walyaro (1980). Breeding for resistance to coffee berry disease in Coffea arabica L. II Inheritance of the resistance. Euphytica 29(3): in the press.
- Waller, J M (1971). The incidence of climatic conditions favourable to coffee berry disease in Kenya. Expl. Agric. 7: 303 - 314.

OBSERVATIONS, AVANT MISE EN CULTURE, DES DIVISIONS ANORMALES DES NOYAUX DE GRAINS DE POLLEN DE CAFÉIER INDUITS AU FROID INFLUENCE DU STADE DE DÉVELOPPEMENT LORS DE L'INDUCTION

C. LANAUD, J.-P. PARVAIS

Division de biologie cellulaire

Centre de recherches de l'IFCC en Côte d'Ivoire, 01 B.P. 1827, Abidjan 01

La première étape des méthodes aboutissant à l'androgénèse consiste à perturber le processus normal de différenciation de la microspore afin qu'elle engendre une série de divisions surnuméraires, amorce d'un développement ultérieur d'un cal ou d'un embryon.

Il a été démontré que la réussite de l'androgénèse dépend étroitement du stade de développement des microspores auquel les anthères sont mises en culture (SUNDERLAND 1974, DUNWELL 1976).

L'excision des anthères et leur mise en culture sont déjà susceptibles de perturber les processus normaux de différenciation des microspores ; d'autre part, le rendement de l'androgénèse peut être amélioré chez certaines espèces par un traitement des boutons floraux par le froid (NITSCH et NORREEL, 1973, PICARD et de BUYSER, 1975, CORDUAN et SPIX, 1975).

Nous avons cherché à savoir, dans le cas du caféier, si une telle induction de divisions surnuméraires était possible et décelable avant la mise en culture, et quels étaient les stades de développement des microspores les plus réceptifs à cette induction.

La connaissance de ces stades est très importante pour, d'une part, déterminer les meilleurs moments d'induction, afin d'avoir un rendement maximal, et, d'autre part, connaître précisément l'état initial des structures cellulaires qui seraient réorientées vers l'androgénèse.

MATERIEL ET METHODES

Les prélèvements de boutons floraux ont été faits sur des clones appartenant à trois espèces différentes :

- C. canephora : deux clones n° 107 et 410
- C. arabica : un clone
- C. excelsa : un clone

Les prélèvements se sont échelonnés de la fin de la méiose à 24 h après la première mitose pollinique. On a repéré les stades suivants bien distincts sur le plan morphologique :

- tétrades ouvertes (début de libération des microspores) ;
- fine exine des microspores encore jeunes ;
- microspores ayant une exine bien visible et un noyau central ;
- microspores présentant un noyau qui a migré sur le côté le long de la paroi ;
- microspores réalisant leur première mitose pollinique ; le cytoplasme a alors un aspect très granuleux, contrairement à celui des autres stades ;
- microspores à deux noyaux (1 végétatif + 1 reproducteur), 24 h après la première mitose pollinique.

Du fait de la synchronisation de la floraison chez le caféier, due à son déclenchement par la pluie, on a pu assez bien localiser ces stades dans le temps, en choisissant de plus des lots de boutons de taille homogène.

Pour chaque traitement, dix boutons ont été prélevés avec l'inflorescence et mis au froid à 4-5 °C pendant trois jours dans des boîtes de Pétri renfermant aussi un papier filtre humide. Puis on laisse évoluer ces boutons à 24 °C dans ces mêmes boîtes pendant quatre jours ; après ce laps de temps, ils sont fixés dans du Carnoy.

Les boutons témoins sont prélevés aux stades les plus précoces et à la première mitose pollinique, puis laissés à 24 °C pendant quatre jours sans un passage au froid avant d'être fixés.

Pour les observations, une anthère par bouton floral est prélevée. Pour chaque traitement, deux lames, comprenant chacune un ensemble de cinq anthères, sont montées après écrasement dans un carmin acétique additionné d'hématoxyline ferrique, puis chauffées rapidement. Sur les deux lames, examinées par deux observateurs différents, au moins cent cinquante grains de pollen vivants sont observés.

Les noyaux sont classés en deux catégories :

- noyaux dont le phénotype est semblable ou proche de celui du noyau végétatif : noté V,
- noyaux dont le phénotype est semblable ou proche de celui du noyau reproducteur : noté R.

Le nombre de noyaux de chaque catégorie est compté pour chaque grain de pollen.

On a pu recenser les catégories suivantes de grains de pollen d'après l'aspect et le nombre de noyaux présents :

- | | |
|------------|------------------------------------|
| - 1 V seul | - 1 V + 1 R |
| - 2 V | - 1 V + 2 R |
| - 3 V | - 1 R + 2 V |
| - 2 R | |
| - 3 R | - 1 R + x V (x variant de 3 à 10). |

Les pourcentages de chaque catégorie sont les moyennes des résultats obtenus par deux observateurs et correspondent donc à une observation d'au moins trois cents grains de pollen vivants par traitement.

Ces pourcentages sont donnés par rapport au nombre total de grains de pollen vivants observés.

Les pourcentages de grains de pollen morts sont notés pour chaque traitement.

Pour chaque clone étudié, les stades repérés se situaient à des heures différentes de la journée. Pour les stades "1 noyau central" et "1 noyau sur le côté", de durée relativement longue (plusieurs heures), deux ou trois prélèvements (espacés de 3 heures) ont souvent été effectués ; les résultats donnés sont alors la moyenne des observations faites pour ces deux ou trois prélèvements.

RESULTATS

1) Impact de l'induction par le froid sur la mortalité des microspores (voir fig. n° 1)

- On peut observer que lorsque l'induction au froid a été faite à des stades très précoces de développement, trois clones sur quatre montrent un taux élevé de mortalité, alors que les témoins présentent une valeur maximale de 16 % de grains de pollen morts (clone 107).
- Au stade "noyau central" le taux de mortalité observé est assez semblable pour tous les clones, et est encore relativement élevé.
- Après ce stade, les microspores semblent plus résistantes à un choc par le froid ; en effet, le taux de mortalité que l'on observe devient plus faible, sauf pour le clone 107 pour lequel il reste encore 50 à 60 % de microspores dégénérées aux deux derniers stades étudiés (division et 2 N).

Il faut noter que c'est aussi ce clone qui présente, en dehors de toute induction par le froid, le plus fort pourcentage de grains de pollen morts : à ce stade, alors que les témoins des clones 410, C. arabica et C. excelsa montrent des taux de mortalité respectifs de 6, 15 et 4 %, le clone 107 présente 33 % de grains de pollen morts.

2) Apparition de structures anormales

Sont considérées comme structures anormales toutes les microspores différentes du témoin : boutons isolés, dont l'évolution a lieu pendant quatre jours sans induction au froid. Dans ces conditions, pour les témoins prélevés aux stades les plus précoces, 99 % des grains de pollen vivants présentent deux noyaux : 1 V + 1 R, 1 % de grains à un seul noyau ayant été observé. Pour les témoins prélevés au stade de la division, la totalité des grains de pollen vivants ont 1 V + 1 R. On considérera comme anormales dans cette étude toutes les structures autres que 1V + 1R.

Les taux de formes anormales les plus élevés apparaissent préférentiellement lorsque l'induction a été faite soit à des stades précoces (peu de temps après le stade tétrade), soit au moment de la période de division (fig. 2).

Le clone 107 présente cependant un taux de divisions anormales encore assez élevé au stade "noyau central".

Différents types de microspores anormales sont visibles :

A/- Microspores à un seul noyau (fig. n° 3)

Cette catégorie de microspores est considérée comme anormale, puisque les témoins montrent la quasi-totalité de leurs microspores avec 1 V + 1 R (voir ci-dessus).

Ce type de structures se rencontre principalement lorsque l'induction a été faite à des stades précoces ("tétrades ouvertes" et "fine exine"). On les rencontre également avec un pourcentage non négligeable quand l'induction a été faite au moment de la division, et principalement chez le clone 410.

B/ - Microspores comportant plusieurs noyaux

Différentes formes anormales à plusieurs noyaux sont apparues :

a) Microspores à deux ou trois noyaux végétatifs (fig. 4 et 5)

Pour trois clones sur quatre, ces formes apparaissent préférentiellement à des stades précoces, ou au moment de la division. Le clone 107 se distingue des autres clones par une présence permanente de ces formes, quel que soit le stade d'induction avant le stade 2 N.

Dans tous les cas, ce sont des formes à 2V qui ont été en majorité observées.

b) Microspores présentant un noyau reproducteur et plusieurs noyaux végétatifs (fig. 4 et 5).

On peut remarquer que cette forme de microspores n'apparaît que lorsque l'induction a été faite aux stades les plus tardifs.

La forme la plus généralement observée est la forme 1 R + 2 V (voir photos A et B) ; elle a lieu quand l'induction a été faite au stade de la division (et juste après pour le clone 107). On peut l'observer chez les deux clones de C. canephora et chez C. excelsa. On ne l'a pas observée chez C. arabica.

Chez le clone 107, pour une induction faite au moment de la division, on a obtenu jusqu'à 2 % de microspores ayant un noyau reproducteur et de trois à neuf noyaux végétatifs (voir photo C)

c) Autres types anormaux apparus

Des formes à 1 V + 2 R ou 2 R ou 3 R ont pu être observées, mais avec des fréquences faibles, égales ou inférieures à 1 % chez C. canephora et C. excelsa. Chez C. arabica, un taux légèrement plus élevé (3%) a pu être observé au stade 2 N défini précédemment.

DISCUSSION - CONCLUSION

Une induction par le froid faite sur boutons floraux isolés, suivie de leur maintien pendant quatre jours à température ambiante, nous a permis d'observer, sans mise en culture, les premières divisions anormales.

La fragilité des microspores vis-à-vis d'un choc par le froid est généralement la plus élevée aux stades précoces, lorsque l'exine n'est pas encore formée. Un effet clone semble aussi exister (le clone 107 garde une grande fragilité à des stades plus tardifs).

Deux stades privilégiés permettent d'induire par le froid des structures anormales : d'une part un stade de développement très précoce de la microspore dont l'exine n'est pas encore visible, d'autre part le stade de la première mitose pollinique.

Des microspores, dont l'évolution a été fortement ralentie ou bloquée après le choc thermique, ont pu être observées. Un maintien prolongé à température ambiante aurait été nécessaire pour connaître leur devenir.

Des divisions anormales ont pu être observées : celles-ci on en général donné soit des microspores à deux ou trois noyaux végétatifs, deux le plus souvent, soit des formes à un noyau reproducteur associé à plusieurs noyaux végétatifs.

L'absence de microspores ayant 1 R + x V lorsque l'induction a été faite à des stades précoces peut s'expliquer soit par une perturbation en empêchant l'apparition, soit par un temps de séjour à température ambiante insuffisant pour en permettre la réalisation.

La présence de microspores ayant un assez grand nombre de noyaux végétatifs, parfois associés au noyau reproducteur (on en a observé jusqu'à neuf chez le clone 107) montre l'efficacité d'une induction faite au moment de la division pour amorcer une série de divisions surnuméraires.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier M. PERNES pour l'examen critique de ce travail et les conseils qu'il nous a donnés pour sa rédaction.

BIBLIOGRAPHIE

- CORDUAN (G.), SPIX (C.), 1975. - Haploid callus and regeneration of plants from anthers of *Digitalis purpurea* L. Planta (Heidelberg) 241 : 1 - 12.
- DUNWELL (J.M.), 1976 : A comparative study of environmental and developmental factors which influence embryo induction and growth in cultured anthers of *Nicotiana tabacum*. Anv. and Exp., 16 : 109-118.
- NITSCH (C.), NORREEL (B.), 1973. - Effet d'un choc thermique sur le pouvoir embryogène de pollen de *Datura innoxia* cultivé dans l'anthere ou isolé de l'anthere. C.R. Acad. Sc. (Paris) 276 : 303-306.
- PICARD (E.), BUYSER (J. de), 1975. - Nouveaux résultats concernant la culture d'anthers in vivo de blé tendre (*Triticum aestivum* L.). Effets d'un choc thermique et de la position de l'anthere dans l'épi. C.R. Acad. Sc. (Paris) 281, Série D, p. 127.
- SUNDERLAND (N.), 1974. - Anther culture as a mean of haploid induction in haploids in higher plants : advances and potential - University of Guelph Press, Guelph, K.J. Kasha (Ed.) : 91-122.

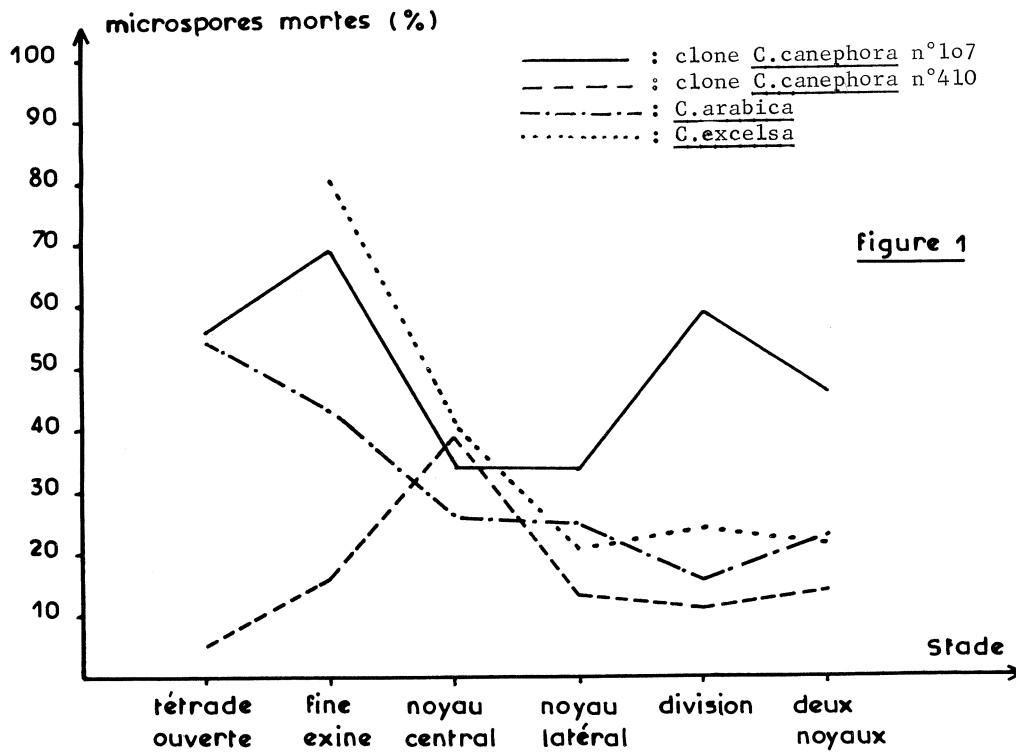


Fig. 1. - Létalité des microspores en fonction du stade d'induction

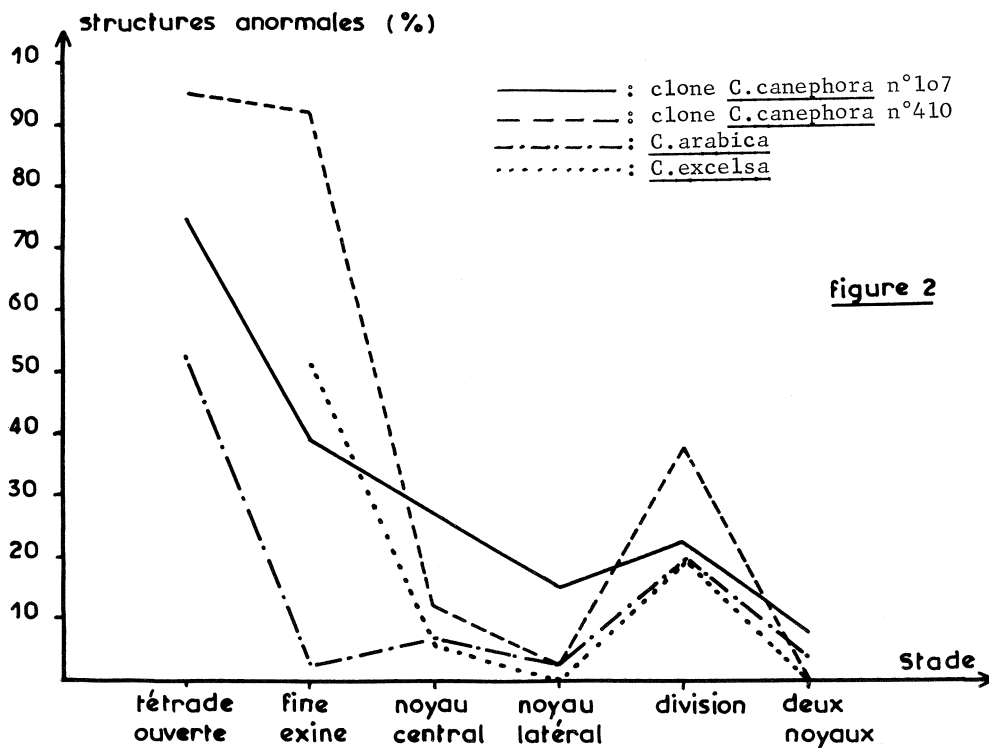


Fig. 2. - Fréquences des structures anormales pour chaque clone en fonction du stade d'induction

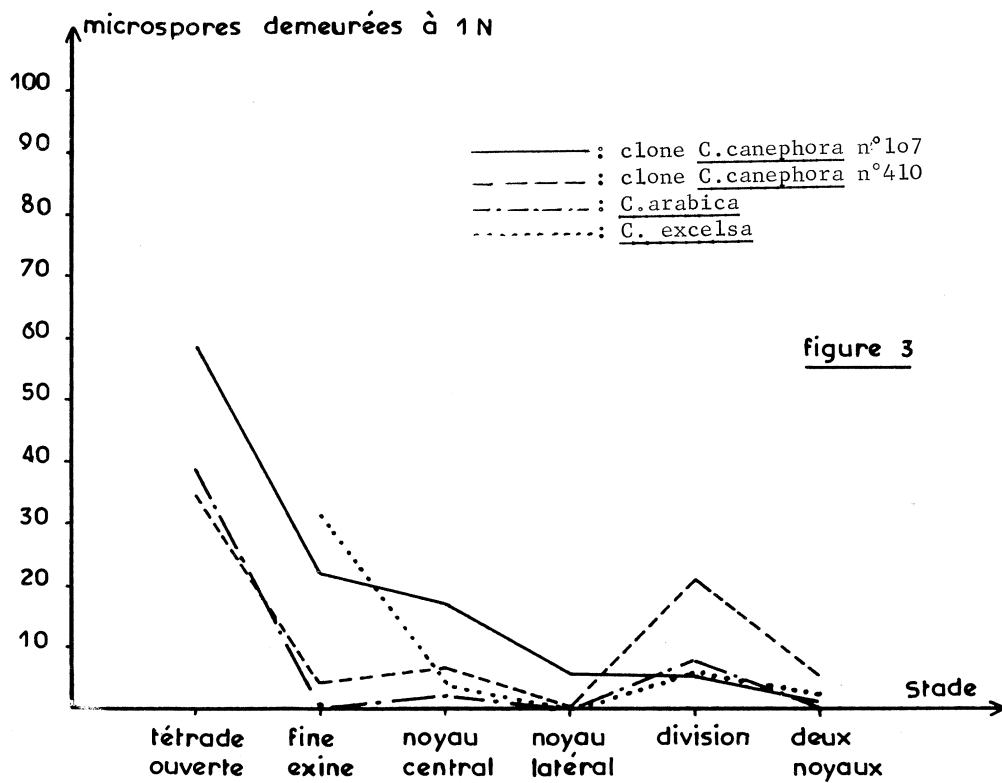
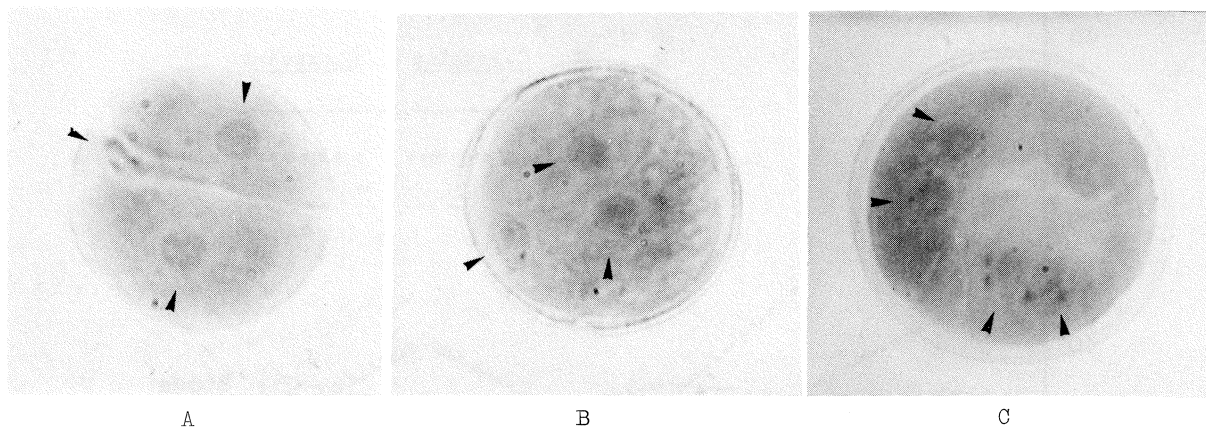


Fig. 3. - Fréquences des microspores demeurées à un noyau, en fonction du stade d'induction et pour les différents clones



Photos A et B. - Microspores présentant un noyau reproducteur et deux noyaux végétatifs

Photo C. - Microspore dans laquelle quatre noyaux végétatifs sont visibles

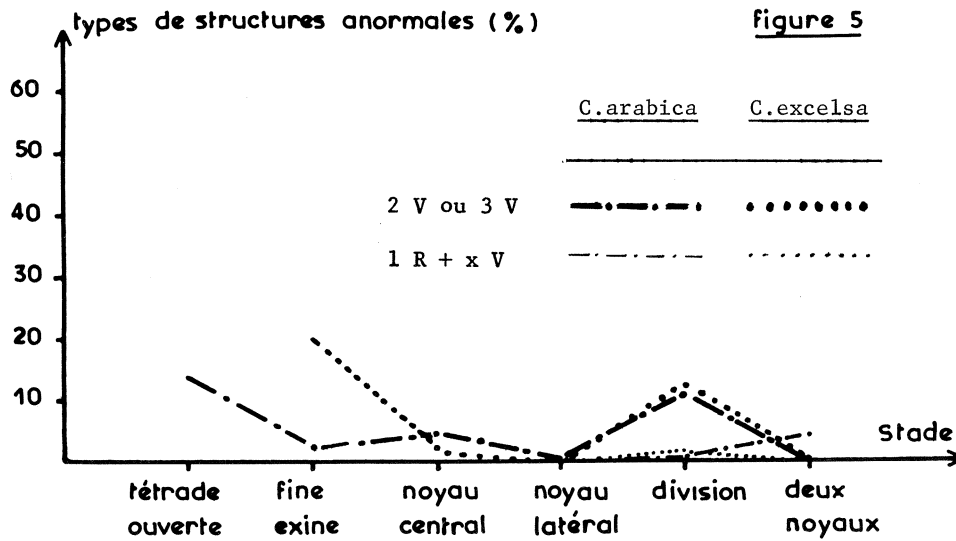
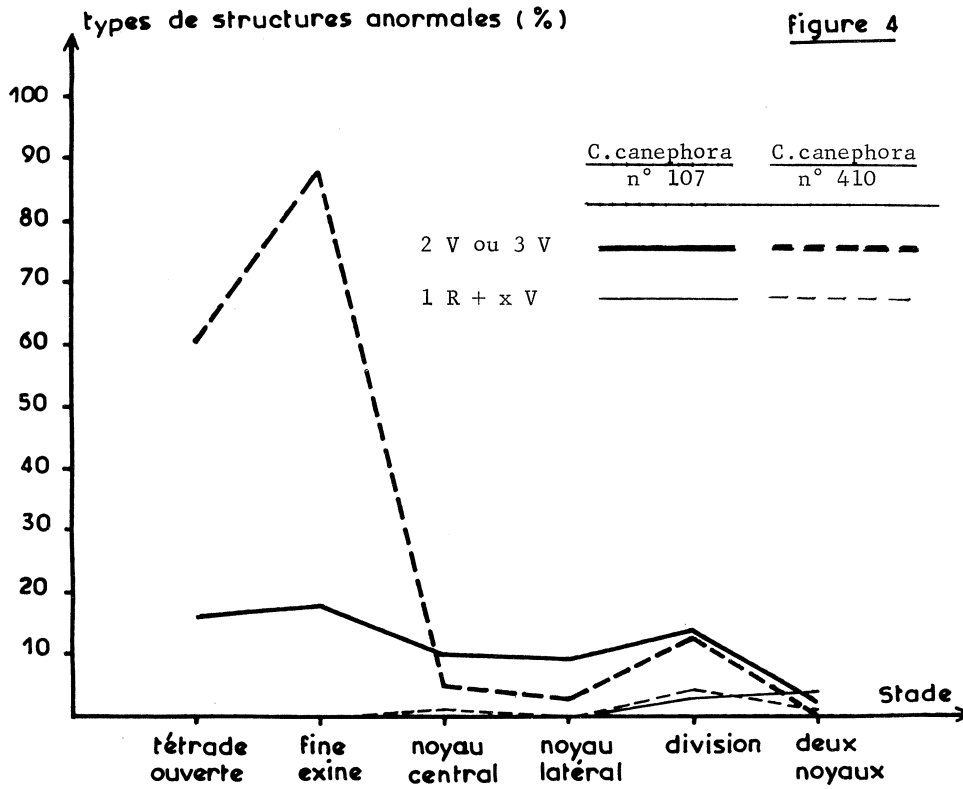


Fig 4 et 5. - Fréquences des microspores présentant, en fonction du stade d'induction, soit 2 V ou 3 V, soit 1 R + x V

HYBRIDES INTERSPÉCIFIQUES ENTRE *COFFEA CANEPHORA* PIERRE ET *C. LIBERICA* BULL. EX HIERN

Résultats préliminaires sur les hybrides F₁

J. LOUARN

Chargé de recherches de l'ORSTOM

B.P. 434, Man, Côte d'Ivoire

Un programme d'étude des relations génétiques et cytogénétiques des différents groupes d'espèces de *Coffea* diploïdes africains a été démarré en 1975 en Côte d'Ivoire. Il a pour objectif la recherche de voies originales d'amélioration du café produit dans les zones chaudes et humides de "basse altitude". Ce programme repose essentiellement sur 4 espèces présentant une variabilité génétique importante dans nos collections : *C. canephora*, *C. congensis*, *C. eugenioides* et *C. liberica*.

Des hybrides F₁ entre *C. canephora* et *C. liberica* ont été installés progressivement depuis 1977 en parcelles d'étude à la station ORSTOM de Man (Côte d'Ivoire). Nous possédons actuellement plus de 800 hybrides de ce type ; les plus âgés ont fleuri abondamment au début de l'année 1980. Ce sont les premiers résultats acquis sur cette combinaison que nous présentons. Les observations effectuées concernent la vigueur, la fertilité et le comportement méiotique.

1) Le matériel végétal

Le croisement entre les deux espèces a été réalisé pour associer les qualités agronomiques et la rusticité de *C. canephora* à quelques caractéristiques intéressantes de *C. liberica*. Il s'agit de la monocaulie et de la ramification plagiotrope prépondérantes, de la floraison sur vieux bois, d'une moindre teneur en caféine (0,5 à 1,9% de la matière sèche), de sa tolérance à la sécheresse.

Les géniteurs utilisés proviennent des collections de l'IFCC rassemblées à Abengourou et à Divo (Côte d'Ivoire). Ce sont pour la plupart des types Kouilou et Robusta pour *C. canephora* des types "gros indénié" originaires de Côte d'Ivoire ou croisés à divers degrés par des *C. excelsa* de provenance centrafricaine pour les libério-excelsoïdes.

Les résultats d'hybridation dépendent du sens du croisement. Les rendements sont beaucoup plus élevés lorsqu'on prend *C. liberica* comme parent femelle ; dans ce cas on obtient en moyenne 10 hybrides pour 100 fleurs pollinisées, avec un maximum de 51,5 %. Dans les croisements

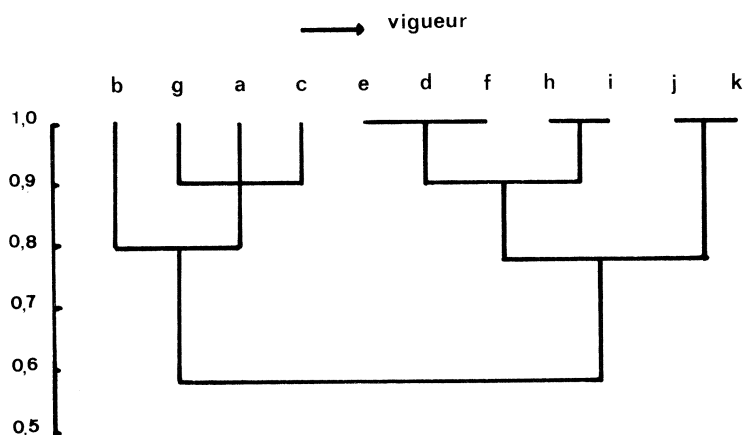


Figure 1 : Differentiation des descendances hybrides F1 entre *C. liberica* (05) et *C. canephora* (02) pour les caractères de vigueur.

a = 051201 x 02-IFA2PM	g = 02-IF149 x 051212
b = 051202 x 02-IF461	h = 051217 x 02-IF392
c = 051203 x 02-IF461	i = 051217 x 02-IFKM27
d = 051205 x 02-IF461	j = 051215 x 02-IFH57
e = 051205 x 02-IF197	k = 051216 x 02-IFH57
f = 051205 x 02-IFA2PM	

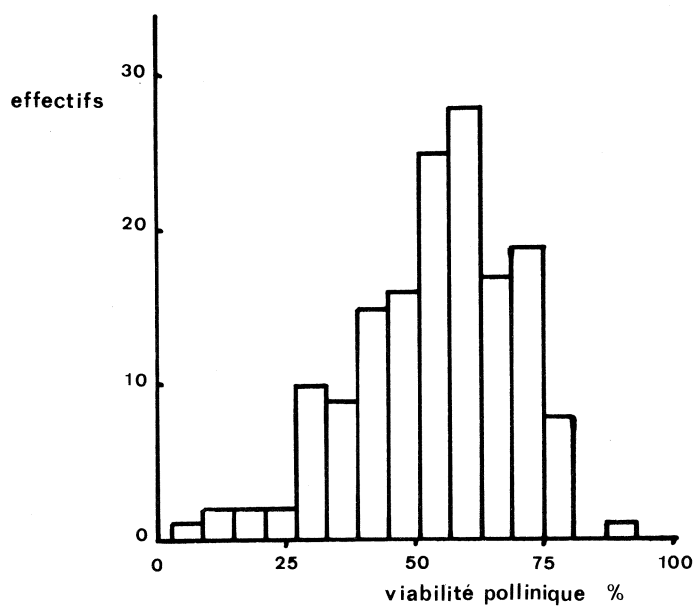


Figure 2 : Distribution des viabilités polliniques de 155 hybrides F1 (intervalle de classe 6 % ; moyenne VP = $53,6 \pm 15,2$ %).

réciproques le taux moyen de réussite est inférieur à 1 hybride pour 100 fleurs pollinisées, avec un maximum de 51,5 %. Dans les croisements réciproques le taux moyen de réussite est inférieur à 1 hybride pour 100 fleurs avec un maximum de 3,6 % (tableau 1). L'obtention de descendance lorsque *C. liberica* est pris comme parent femelle, paraît liée aux géniteurs eux mêmes : quelques souches se combinent avec n'importe quel mâle *C. canephora*, d'autres sont systématiquement stériles, d'autres encore donnent des résultats variant avec les parents mâles.

Tableau 1 : Résultats des hybridations entre *C. canephora* et *C. liberica*.

Croisements (♀ x ♂)	Hybrides	Combinaisons ≥ à 8 individus	Hybrides pour 100 fleurs	Rendement maximal Hyb./100 fleurs
<i>C. canephora</i> x <i>C. liberica</i>	60	3	0,6	3,6
<i>C. liberica</i> x <i>C. canephora</i>	882	29	10,0	51,5

2) La vigueur des hybrides F1

Les jeunes plantules hybrides sont généralement vigoureuses ; quelques rares combinaisons renferment cependant de fortes proportions d'individus anormaux, à croissance lente, à développement anarchique ou présentant une forte sensibilité à la verse. Ces anomalies semblent liées à des déterminismes génétiques simples.

Après l'installation au champ, on a constaté des différences considérables entre croisements dans l'expression de la vigueur. Des notations ont été effectuées au bout de 18 mois sur 11 descendance hybrides F1 constituées de 5 à 17 individus. Quatre caractères ont été retenus : la hauteur de la tige orthotrope, le diamètre au collet, le nombre de noeuds orthotropes ramifiés, la longueur moyenne des mêmes entre noeuds. Pour chacun des quatre caractères, les différences entre croisements sont très hautement significatives. La figure 1 représente un dendrogramme regroupant les descendance d'après leurs indices de proximité pour les caractères considérés. On constate que les descendance e, d et f, de vigueur équivalente sont issues d'un seul parent femelle *C. liberica* croisé par différents géniteurs *C. canephora* ; il en va de même pour les descendance h et i. A l'inverse, les descendance b, c et d qui se trouvent dans des groupes de vigueur distincts proviennent de différents parents femelles *C. liberica* croisés par le même géniteur *C. canephora*, tout comme les descendance a et f. Ces résultats suggèrent un effet parental *C. liberica* femelle prépondérant pour la vigueur.

3) La fertilité et le comportement méiotique des hybrides F1

a) La fertilité mâle

170 hybrides F1 ont fleuri en 1980. Nous avons relevé 10 arbres stériles présentant des fleurs atrophiées, 1 arbre mâle dont les étamines étaient dépourvues de pollen, et 4 arbres potentiellement mâles stériles mais dont la fertilité femelle n'est pas encore connue. Pour les 155 arbres restants, les viabilités polliniques ont été estimées sur 3 fleurs par arbre, en déterminant le pourcentage de grains de pollen à cytoplasme dense et coloré au carmin acétique. Elles sont comprises entre 8 et 88 %. Une analyse de variance hiérarchisée ne met pas en évidence d'effet "croisement" pour les 7 descendance étudiées ; les différences

entre pieds sont par contre très hautement significatives. Pour le caractère viabilité pollinique, la population d'hybrides F1 peut être considérée comme normale de moyenne 53,6 % et d'écart type 15,2 % (fig. 2).

b) La fertilité femelle

La production de café n'a pas encore pu être estimée ; toutefois une information préliminaire est fournie par le taux de caracolis. Sur une dizaine d'arbres appartenant à la combinaison (051219 x 02.IF181) de 200 à plus de 1000 fruits ont été récoltés. Les taux de grains caracolis, c'est-à-dire de grains provenant de fruits à une seule loge, sont élevés ; ils sont compris entre 47 et 77 %. Chez ces 10 arbres les forts taux de caracolis sont corrélés aux faibles valeurs de viabilité pollinique ($r = -0,792$) (fig. 3d). Ce résultat suggère que les viabilités des gamètes mâles et femelles ont le même déterminisme. Comparés à ceux des géniteurs *C. canephora* (20 à 40 %), ces taux de caracolis sont, pour la combinaison *C. liberica* x *C. canephora*, la marque d'une mauvaise fertilité.

Tableau 2 : Associations chromosomiques en métaphase I, régularité des disjonctions en anaphase I, viabilités polliniques et taux de caracolis dans une descendance hybride *C. liberica* (051219) x *C. canephora* (02.IF 181).

Souches	Métaphase I (*)			Anaphase I (*) montées de 11 chromosomes %	Viabilités polliniques %	Taux de caracolis %
	I	II	CMP à 11 II %			
52049	1,60	10,20	42	58	50	70
52050	1,12	10,44	52	55	60	54
52051	1,20	10,40	50	52	31	-
52053	1,08	10,46	60	71	66	47
52054	1,24	10,38	58	-	58	-
52055	1,74	10,13	44	57	55	77
52058	1,84	10,08	40	57	34	-
52061	1,28	10,36	48	-	51	-
52063	1,52	10,22	46	-	59	64
52068	2,16	9,92	34	42	34	-
52070	1,16	10,42	48	77	44	-
52071	2,48	9,76	28	43	20	-
52072	2,00	10,00	30	42	35	-
52073	1,44	10,28	40	56	52	-
52074	1,24	10,38	54	-	53	-
52079	2,12	9,94	28	-	42	-

(*) moyennes observées sur 50 CMP.

c) Le comportement méiotique

L'analyse du comportement méiotique effectuée sur les cellules mères du pollen (CMP) concerne 16 individus pris au hasard dans la combinaison hybride précédente (051219 x 02.IF181). Jusqu'à présent seuls les stades métaphase I et anaphase I sont étudiés. Les résultats sont présentés dans le tableau 2.

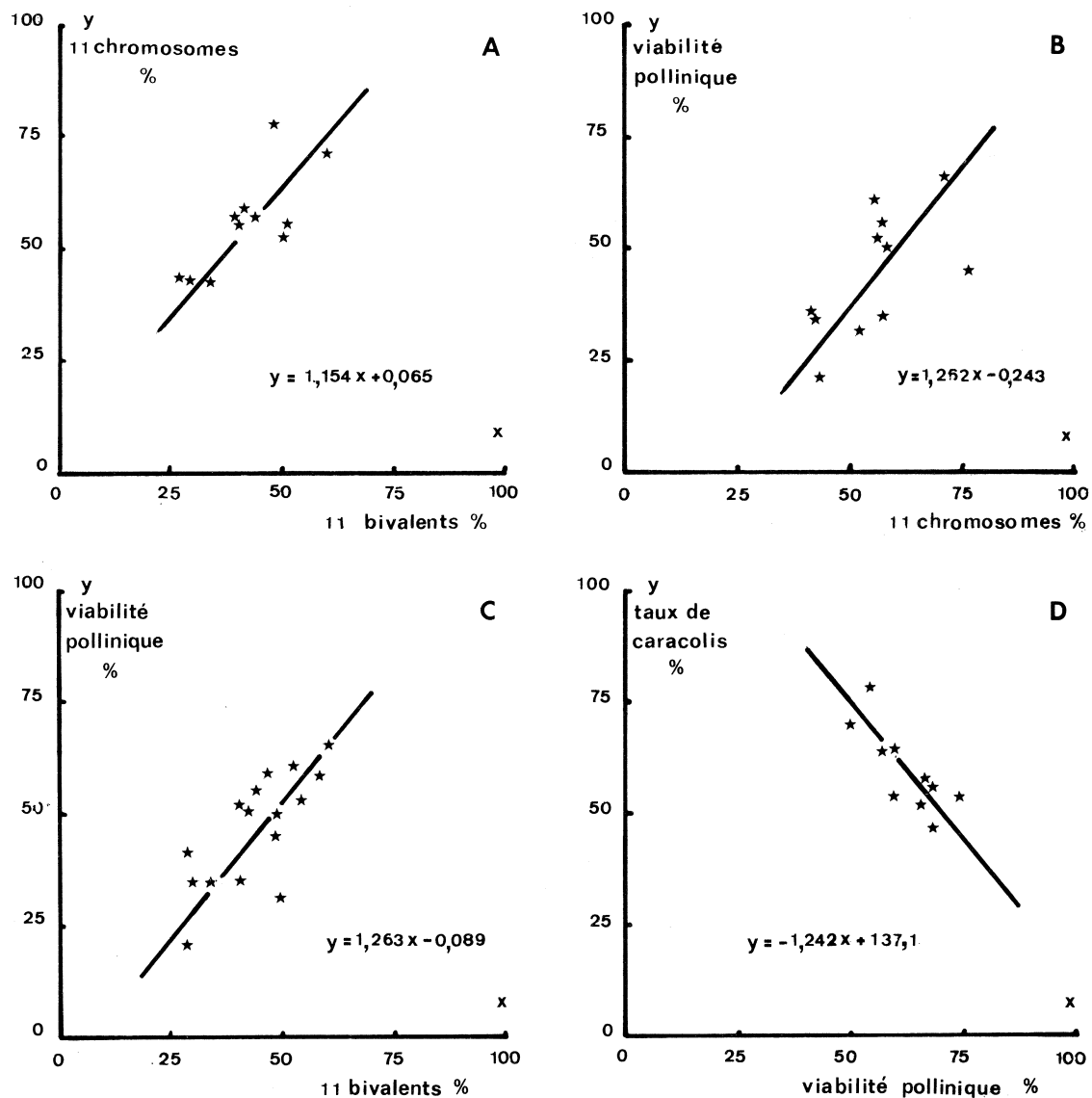


Figure 3 : Comportement meiotique, viabilité pollinique et taux de grains caracolis dans la descendance *C. liberica* (051219) x *C. canephora* (02-IF181) :

- A) Relation entre les montées de 11 chromosomes en anaphase I et les cellules à 11 bivalents en métaphase I ;
- B) Relation entre la viabilité pollinique et les montées à 11 chromosomes en anaphase I ;
- C) Relation entre la viabilité pollinique et les cellules à 11 bivalents en métaphase I ;
- D) Relation entre les taux de grains caracolis et la viabilité pollinique.

Selon les hybrides observés en métaphase I, 28 à 60 % des CMP renferment 11 bivalents ; on trouve en moyenne de 9,76 à 10,46 II par cellule, les bivalents en anneau variant de 2,38 à 4,70. A l'issue des disjonctions en anaphase I, les montées de 11 chromosomes aux pôles des CMP chez 11 hybrides sont comprises entre 42 et 71 % ; les montées de 10 sont ensuite les plus fréquentes - 30 % en moyenne - ; les montées de 12 ne représentent que 5 % du total. De 1 à 7 % des chromosomes restent sur le plan équatorial ; ils sont clivés pour la plupart. 3 cellules sur 100 montrent un pont d'inversion.

La variation continue des pourcentages de cellules à 11 bivalents des hybrides F1 provenant d'un même croisement suggère un contrôle polygénique de la régularité des associations chromosomiques. Cette variation pourrait résulter de la forte hétérozygotie des parents allogames. Les cellules renfermant 11 bivalents en métaphase I, les montées de 11 chromosomes en anaphase I et les viabilités polliniques sont corrélées (tableau 3, fig. 3a, 3b, 3c). Les viabilités polliniques et la proportion de cellules à 11 bivalents ayant des valeurs du même ordre de grandeur (moyennes respectives de 46,5 et 43,9 %), il apparaît que la viabilité des gamètes mâles est essentiellement déterminée par la régularité des associations chromosomiques en métaphase I. Il en serait de même pour les gamètes femelles.

Tableau 3 : Corrélations entre le comportement méiotique et la viabilité pollinique.

	Métaphase I 11 bivalents	Viabilité pollinique
Anaphase I 11 chromosomes	0,758 (++)	0,607 (+)
Viabilité pollinique	0,718 (++)	

coefficients de corrélation significatifs au seuil 0,95 (+) au seuil 0,99 (++)

4) Discussion - Conclusion

Résumons les premiers résultats acquis ici sur les hybrides F1 entre *C. canephora* et *C. liberica*. Les descendance hybrides de première génération entre ces deux espèces sont beaucoup plus aisées à obtenir en prenant *C. liberica* comme parent femelle ; les taux de réussite sont cependant très variables avec les géniteurs utilisés. Entre descendance hybrides il y a des différences de vigueur liées surtout au parent *C. liberica*. On ne retrouve pas ces différences au niveau des viabilités polliniques moyennes ; la population hybride F1 dans son ensemble présente une distribution normale pour ce caractère. Pour une même descendance, les viabilités des gamètes mâles et femelles sont liées à la régularité des associations chromosomiques en métaphase I. Le taux élevé de grains caracolés trouvé chez les premiers hybrides indique une fertilité moyenne limitée.

Peu d'hybrides F1 entre *C. canephora* et de liberio-excelsoïdes ont été étudiés jusqu'à ce jour. D'après la littérature une vingtaine d'hybrides au total issus de croisements contrôlés ont été obtenus au Brésil (CARVALHO et MONACO, 1968), en Inde (CHINNAPPA, 1970), à Madagascar par VIANNEY LIAUD et en Centrafrique par DUBLIN. Quelques hybrides naturels trouvés dans des descendance de *C. canephora* en Indonésie ont fait l'objet d'essais de comportement (CRAMER, 1957 ; LELIVELD, 1940, cité par SYBENGA, 1960). L'étude cytogénétique de 6 hybrides *C. canephora* (♀) x *C. liberica* ♂ a été entreprise par CHINNAPPA (1970). Cet auteur trouve des niveaux d'associations chromosomiques (9,93 à 10,66 II) et de viabilité pollinique (20 à 57 %) du même ordre de grandeur que ceux rapportés ici, mais il ne met pas en évidence de liaison entre les 2 caractères. La présence occasionnelle de multivalents serait l'indice d'une hybridité de structure entre les deux génomes pouvant expliquer ce comportement. Ces différences avec les résultats rapportés ici pourraient être reliées à un effet maternel *C. canephora* et à l'origine des géniteurs utilisés dans ces ensembles très polymorphes que constituent les libéro-excelsoïdes et *C. canephora*.

Nous avons vu que le taux de grains caracolis trouvé chez les premiers hybrides F1 indique une fertilité moyenne limitée. Cependant à des viabilités polliniques de 86 % (soit la moyenne + 2 fois l'écart type de la population hybride F1) correspondraient des taux de caracolis du même ordre de grandeur que ceux rencontrés dans l'espèce cultivée *C. canephora*. Une sélection paraît donc possible au niveau des descendances vigoureuses. Les différentes contraintes qu'impliquent la diffusion d'individus répondant aux normes de qualité et de productivité désirées rendent pourtant aléatoire une telle voie limitée à quelques milliers d'individus. La diversification génétique en cours des combinaisons hybrides F1, réalisée par l'emploi de géniteurs spontanés *C. liberica* récemment prospectés en Côte d'Ivoire et en Centrafrique (BERTHAUD *et al.*, 1977), permettra de savoir si ces différentes origines ont des comportements similaires vis-à-vis de *C. canephora*. Quoiqu'il en soit, pour les hybrides étudiés ici, l'exploitation de la combinaison *C. liberica* x *C. canephora* nécessite une étape de restauration de la fertilité. Elle est actuellement tentée :

- au niveau de la première génération hybride par duplication chromosomique. Les premiers résultats concernant cette voie semblent peu favorables puisque les amphidiploïdes artificiels ont un comportement méiotique proche de celui des autotétraploïdes de *C. canephora*. Il est caractérisé par des fréquences élevées de multivalents (jusqu'à 6 par CMP) et d'univalents (jusqu'à 8 par CMP) qui conduisent à une forte proportion de disjonctions déséquilibrées en anaphase I (tableau 4) ;
- au niveau de la deuxième génération hybride par l'obtention de descendances issues de croisements entre hybrides F1 ou de back-cross par l'une ou l'autre des espèces parentes, descendances qui entreront prochainement en floraison.

Tableau 4 : Associations chromosomiques en métaphase I et montées de 11 chromosomes en Anaphase I chez des autotréploïdes de *C. canephora* et un hybride F1 *C. liberica* x *C. canephora* tétraploïde ($4n = 4x = 44$ chromosomes).

Matériel végétal	Nombre de CMP	Métaphase I				Anaphase I (1) montées de 22 chromosomes %
		I	II	III	IV	
<i>C. canephora</i> 4n C520A5	30	2,07	14,41	1,13	2,43	40
<i>C. canephora</i> 4n variation de 5 pieds	100 par pied	1,25	12,48	0,60	2,56	M. GRASSIAS (2)
		1,98	14,86	0,95	3,83	
Hybride F1 4n 52500T	50	4,70	13,24	1,54	2,05	22

(1) Moyennes observées sur 50 CMP ; (2) M. GRASSIAS, communication personnelle.

La fréquence élevée des cellules renfermant 11 bivalents en métaphase I chez les hybrides F1 diploïdes et les nombreux multivalents rencontrés chez les amphidiploïdes artificiels démontrent une bonne homologie entre les chromosomes des espèces *C. liberica* et *C. canephora* ainsi que leur appartenance à un même génome de base. La viabilité des gamètes mâles et femelles liée à la régularité des associations en métaphase I, et le niveau de fertilité atteint par les hybrides F1 indiquent une faible différenciation des deux espèces considérées et l'absence de remaniements chromosomiques majeurs entre elles. On ne peut que constater une grande analogie de comportement entre les hybrides *C. liberica* x *C. canephora* étudiés ici et les hybrides F1 entre *C. canephora* et *C. eugenioides* que nous avons suivi à Madagascar (LOUARN, 1976). Il ne s'agit donc pas d'une situation originale au sein des caféiers africains diploïdes.

Bibliographie

- BERTHAUD (J.), GUILLAUMET (J.L.), LE PIERRES (D.), LOURD (M.), 1977.- Les prospections de caféiers sauvages et leur mise en collection. VIII^e Colloque Scientifique International sur le Café, Abidjan, 28 nov.-3 déc. ASIC (Paris), 1979, pp. 365-372.
- CARVALHO (A.), MONACO (L.C.), 1968.- Relaciones genéticas de especies seleccionadas de *Coffea*. Café (Lima), IX, n° 4, 19 p.
- CHINNAPPA (C.C.), 1970.- Interspecific hybrids of *Coffea canephora* and *C. liberica*. Genetica (La Haye), XLI, pp. 141-146.
- CRAMER (P.J.S.), 1957.- Review of literature of coffee research in Indonesia. Turrialba (Costa Rica), Interamerican Institute of Agricultural Sciences, 262 p. (Miscellaneous publ. n° 15).
- LOUARN (J.), 1976.- Hybrides interspécifiques entre *Coffea canephora* Pierre et *C. eugenioides* Moore. Café Cacao Thé (Paris), vol. XX, n° 1, pp. 33-52.
- SYBENGA (J.), 1960.- Genetics and cytology of coffee. Bibliographia Genetica (Gravenhage), XIX, pp. 217-316.

LES HYBRIDES INTERSPÉCIFIQUES HEXAPLOÏDES *COFFEA ARABICA* X *C. CANEPHORA* : Influence du milieu et de la structure génétique sur les potentialités agronomiques

D. LE PIERRÈS, F. ANTHONY

Action conjointe IFCC-ORSTOM

B.P. 808, Divo, Côte d'Ivoire

Le croisement entre les deux espèces cultivées *C. arabica* ($2n = 44$ chromosomes) et *C. canephora* ($2n = 22$) conduit à des hybrides triploïdes vigoureux et stériles. On peut cependant obtenir des combinaisons hybrides fertiles, soit au niveau tétraploïde (CRAMER 1957, MONACO et CARVALHO 1975, CAPOT 1972), soit au niveau hexaploïde (OROZCO 1975, BERTHAUD 1977). Nos hybrides hexaploïdes de départ sont issus du doublement chromosomique des triploïdes selon la technique de BERTHOU (1975). Ils présentent des caractéristiques de qualité proche de *C. arabica* ainsi qu'un mauvais comportement en basse altitude (vigueur déficiente, architecture défavorable, faible production).

Quels sont les facteurs responsables du comportement des hybrides hexaploïdes : la préférence écologique du parent *C. arabica* pour l'altitude ? L'homozygotie de la structure hexaploïde induite par duplication chromosomique ? Les interactions géniques à ce niveau élevé de ploïdie ?

Nous avons testé ces différentes hypothèses, d'une part en comparant le comportement d'hybrides hexaploïdes de départ cultivés en altitude et en basse altitude, d'autre part en étudiant l'évolution de la structure génétique des descendances hexaploïdes de première génération. Nous présenterons les premières informations acquises au cours de ces expérimentations.

MATERIEL ET METHODES

Nous mentionnons dans le tableau I les différents types de matériel végétal étudié et les lieux d'essai. Dans ces lieux d'essai les conditions écologiques sont les suivantes :

- au Mont Tonkoui : altitude 1100m, pluviométrie 1800mm, une longue saison sèche de 5 mois ;
- à la Station ORSTOM de Man : altitude 300m, pluviométrie 1800mm, température moyenne 25°C, une longue saison sèche ;
- à la Station IFCC de Divo : altitude 200m, pluviométrie 1400mm, température moyenne 26°C, deux saisons sèches bien marquées.

Nomenclature	Généalogie	Lieux d'essai
Parents	<i>C. arabica</i> x <i>C. canephora</i> (2n = 44) (2n = 22)	
Hybrides F ₁	↓ F ₁ (2n = 33)	Man/Divo
Hybrides H ₀	↓ Hybrides hexaploïdes (génération de départ 2 n = 66)	Man Mont Tonkoui
Hybrides H ₁	↓ Hybrides hexaploïdes (1ère génération)	Man Divo

Tableau I : Obtention des hybrides hexaploïdes.

Deux types d'hybrides hexaploïdes seront examinés : d'une part les hexaploïdes de départ H₀ cultivés en altitude et en basse altitude à Man, d'autre part les hexaploïdes de première génération H₁ implantés en pépinière et au champ à Man et à Divo. Les hybrides H₀, âgés de 2 ans sont constitués de 75 combinaisons issues de 22 origines de *C. arabica* dont la variété "Caturra", et de 19 souches de *C. canephora*. Les hybrides H₁ proviennent des H₀ par autofécondation, fécondation libre ou croisement contrôlé.

Nos études portent sur l'analyse des caractères suivants :

- le déficit de fertilité femelle estimé par le taux de graines caracolis et le taux de loges vides. Le premier exprime une stérilité ovulaire et/ou une stérilité zygotique précoce, alors que le second traduit une faillite plus tardive du développement de l'albumen qui peut être d'ordre génétique et/ou physiologique ;
- le mode de reproduction, jugé d'après les taux de réussite de la pollinisation libre et de l'autopollinisation ;
- les caractères de vigueur (diamètre au collet, hauteur, vitesse de croissance), et l'architecture (longueur des entre-nœuds, longueur des rameaux plagiotropes) ;
- les caractéristiques technologiques et de production : le rendement marchand, le poids de 100 grains à 10% d'humidité, et la production par arbre de cerises fraîches (C.F.).

RESULTATS

I. LES HYBRIDES HEXAPLOIDES H₀

1. Effets de l'altitude sur la fertilité femelle

Le tableau II résume les pourcentages moyens de caracolis et de loges vides de *C. arabica*, des hexaploïdes et de l'Arabusta en altitude et en basse altitude.

	% de caracolis		% de loges vides	
	Altitude	Basse altitude	Altitude	Basse altitude
<i>C. arabica</i>	10	14	6	11
Hexaploïdes H ₀	36	56	16	31
Arabusta	-	55	-	16

Tableau II : Variation des paramètres de la fertilité femelle avec les conditions de milieu.

On constate que l'effet de l'altitude sur le comportement des hexaploïdes se traduit, comme chez *C. arabica*, par une diminution du taux de caracolis et de loges vides. On remarque aussi qu'en basse altitude les hexaploïdes ont le même taux de caracolis que l'Arabusta (56%), mais un taux de loges vides très supérieur (31%) ; ce qui démontre bien leur mauvaise adaptation physiologique. Par contre le taux de loges vides des hexaploïdes est amélioré avec l'altitude, et atteint le même niveau que celui des arabusta de basse altitude (16%). La fertilité femelle des hexaploïdes est donc nettement améliorée avec l'altitude, et donne une proportion de fruits normaux supérieure à celle des Arabusta de basse altitude.

Quand on compare les paramètres de la fertilité femelle de différentes combinaisons génétiques hexaploïdes au Mont Tonkoui, on remarque de faibles variations intracombinaisons et intercombinaisons (tableau III).

Combinaison	Nombre d'arbres	% de caracolis	% de loges vides
(8 x 86) H	29	34 ± 9	20 ± 10
(17 x 86) H	15	38 ± 9	14 ± 10
(10 x 60) H	16	34 ± 10	15 ± 10
(14 x 30) H	14	38 ± 7	13 ± 8
(59 x 471)H	11	35 ± 6	16 ± 11

Tableau III : Caractéristiques de la fertilité femelle dans 5 combinaisons hexaploïdes de départ.

Ces résultats confirment le haut niveau de fertilité ovulaire et la bonne adaptation physiologique à l'altitude de la population des hybrides hexaploïdes H₀ étudiés.

2. Effets génétiques sur les caractères végétatifs et de production

L'observation des caractères de croissance orthotrope et de développement des rameaux porte sur une population de 300 hybrides H₀ âgés de 2 ans et cultivés au Mont Tonkoui. Ils manifestent un comportement similaire à de jeunes *C. arabica*. Il existe des différences intercombinaisons très hautement significatives et de faibles coefficients de variation intracombinaisons.

L'analyse en composantes principales de ces mêmes caractères auxquels nous avons adjoint la production, mesurés chez 8 combinaisons hybrides de 7 individus de la population d'hexaploïdes H₀, est représentée dans la figure I. Les deux premiers axes expriment 58,9% de la variation totale.

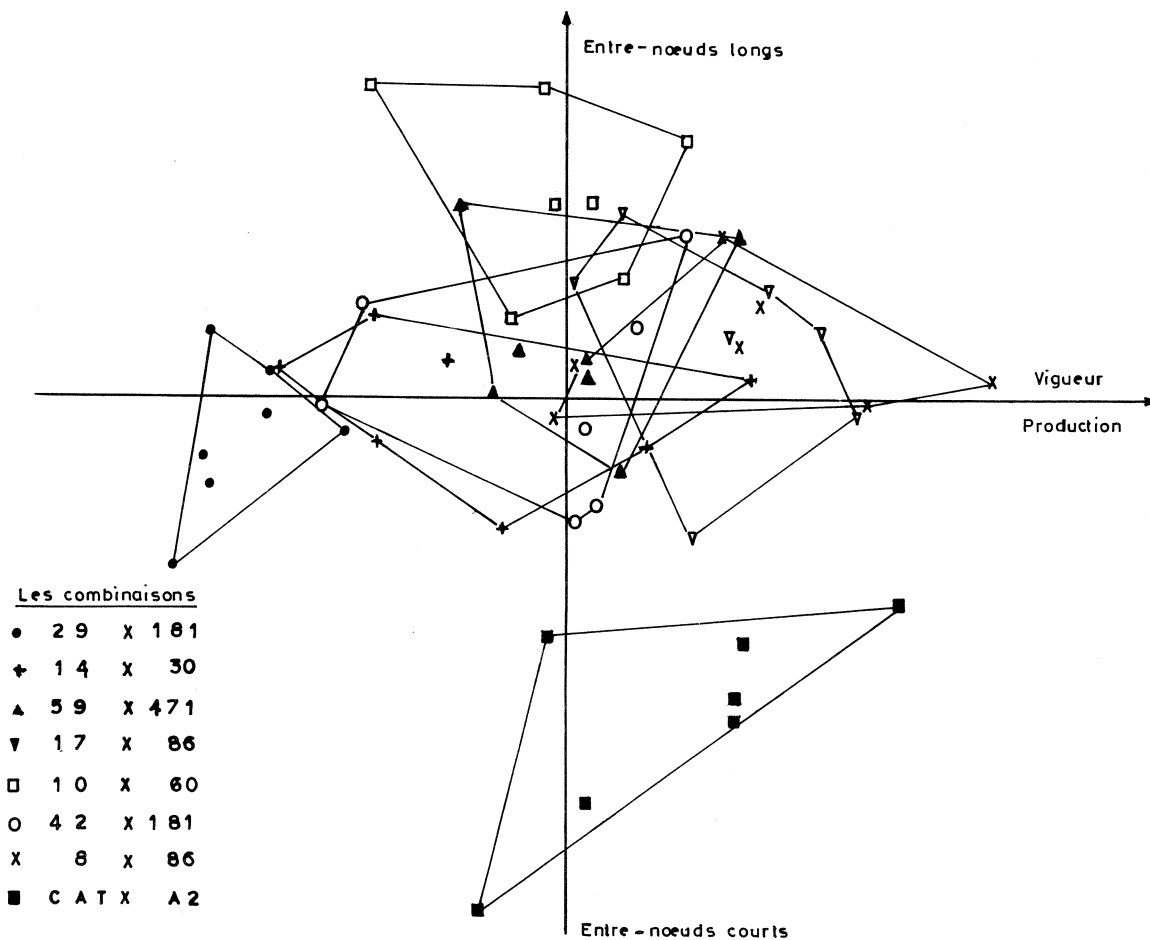


Figure I : Analyse en composantes principales - Représentation graphique des combinaisons génétiques dans le plan des axes 1 et 2.

Le premier axe définit principalement les caractères de vigueur végétative associés à la forte production. Le deuxième axe représente des caractères de développement : entre-noeuds et rameaux plagiotropes longs. L'analyse de la variance des données d'après leurs nouvelles coordonnées sur ces deux axes donne, comme auparavant, un effet combinaison très hautement significatif. On remarque la position particulière de la combinaison "Cat x A2" issue du parent *C. arabica* "Caturra": elle exprime de façon uniforme son caractère dominant "entre-noeuds courts".

3. Caractéristiques technologiques et de production

Le rendement moyen en café marchand par rapport aux cerises fraîches de 27 arbres est de 10,7%, avec une étendue de variation de 7,7 à 14,1%. Le poids de 100 grains de 61 génotypes bons producteurs varie de 10,3 à 22 g, et la moyenne est de 16,9 g. La première production a été analysée sur 290 génotypes : 11% des caféiers ont donné plus de 2 kg de cerises fraîches (CF), et 3% d'entre eux plus de 3 kg CF. Le meilleur arbre a produit à sa première récolte 3,2 kg de cerises fraîches, avec un rendement en café marchand de 12,7% et un poids de 100 grains de 22 g. Il est nécessaire de confirmer ces résultats encourageants sur plusieurs années de production. On remarque que certaines combinaisons sont plus aptes que d'autres à fournir des pieds hauts producteurs. Elles font intervenir en particulier deux souches de *C. canephora* non sélectionnées pour leur production (IF 86 et IF 200), et deux origines de *C. arabica* (Ar 8 et Ar 10). 84% des descendants du géniteur *C. canephora* haut producteur IF 107 n'ont rien produit. Il apparaît donc aléatoire de faire un choix à priori dans les souches parentales pour réaliser des hybrides hexaploïdes.

4. Le mode de reproduction

Nous avons étudié les caractères de reproduction sur 84 génotypes H_0 . Les taux de nouaison en fécondation libre varient de 21 à 88%, et sont en moyenne de 60%, ce qui confirme leur bon comportement en altitude. Les taux de nouaison en autofécondation contrôlée sous manchon sont en moyenne de 30%, avec une étendue de variation de 4 à 77%. Ces arbres présentent donc à des degrés divers, le caractère autofertile hérité de *C. arabica*. En conséquence, dans une descendance issue de fécondation libre d'un hybride hexaploïde, il n'y a en moyenne que 50% d'individus issus d'autofécondation. Nous avons confirmé ce résultat pour un hexaploïde H_0 isolé dans une parcelle de *C. arabica* : dans sa descendance libre, on a dénombré autant d'hexaploïdes issus de l'autofécondation, que d'hybrides pentaploïdes venant du croisement avec *C. arabica*.

II. LES HYBRIDES HEXAPLOIDES H_1

On a comparé le comportement en basse altitude des descendance hexaploïdes H_1 obtenues suivant différentes modalités : en autofécondation en croisements contrôlés, et en fécondation libre.

1. Observation au stade jeune en pépinière

Pour 26 descendance de 25 individus provenant de 6 géniteurs H_0 , on a testé les effets "combinaisons de départ et types de descendance" d'après des caractères de croissance mesurés à 5 et 9 mois.

Avant 5 mois, on détecte quelques anomalies de la forme des feuilles et le blocage de la croissance sur environ 10 % des effectifs. A 5 mois, on constate une grande hétérogénéité de croissance qui s'estompe à 9 mois : les coefficients de variation intradescendance passent ainsi de 50 à 20%. A ces deux dates, l'analyse de la variance révèle des différences **significatives** interdescendance, mais le classement des moyennes ne permet pas de séparer nettement les descendance en fonction de leur mode d'obtention. On distingue une combinaison particulière constituée d'individus à l'aspect trapu provenant du croisement avec un géniteur mâle H_0 porteur du gène "Caturra" de *C. arabica*. Ce gène, dont nous avons déjà parlé, est dominant en hybridation interspécifique car il affecte uniformément les 25 hybrides de la combinaison.

A 15 mois, nous avons observé une grande hétérogénéité parmi les 1400 hexaploïdes H_1 issus de fécondation libre : on retrouve à la fois des individus vigoureux ou chétifs ou morts. Le pourcentage d'hexaploïdes H_1 ramifiés varie selon les descendance de 46 à 86%, alors qu'une descendance témoin de *C. arabica* de même âge est ramifiée à 100%.

L'étude de la variation de la taille des hybrides hexaploïdes H_1 ramifiés suivant un modèle hiérarchisé met en évidence des différences significatives entre les combinaisons H_0 et entre leurs descendance. D'après l'estimation des variances génétiques, on montre que l'effet génétique est deux fois plus grand entre les combinaisons H_0 qu'à l'intérieur de ces combinaisons.

La hauteur des hexaploïdes ramifiés est légèrement plus grande que celle des *C. arabica*, et les coefficients de variation sont proches.

2. Comportement au champ des H_1 à Divo

Nous avons planté, sans possibilité de sélection en pépinière, 4500 hybrides hexaploïdes H_1 âgés de 6 mois et issus de 80 hybrides H_0 en fécondation libre. Après une année au champ, plus de la moitié de l'effectif de départ avait un développement anormal ou était mort. Leur mauvaise adaptation se caractérise par la vigueur dépressive, peu de plagiotropes, des axes et rameaux souples, des floraisons étoilées et très fréquentes, une production nulle. Après deux ans, nous n'avons retenu qu'une vingtaine d'arbres à comportement végétatif et reproducteur normal.

La mortalité est importante dans les hybrides H_1 issus d'autofécondation (de 28 à 53%) et assez forte pour les croisements (de 11 à 33%).

Nous présentons dans le tableau IV simultanément les moyennes et les écarts types du diamètre au collet mesurés sur des hybrides H_1 issus d'autofécondations et de croisements, âgés de 18 mois.

La comparaison des variances des "types de descendance" venant du même géniteur par le test de BARTLETT, montre que les descendance sont aussi homogènes en autofécondation qu'en croisement.

Hybrides H ₀	Hybrides H ₁	
	Descendances d'autofécondation	Descendances de croisement
H ₂₇	16,9 ± 3,7*	18,9 ± 4,6*
H ₁₆₆	15,8 ± 5,4	20,2 ± 4,7
H ₁₉₈	17,5 ± 4,8	23,2 ± 4,1
H ₂₀₆	17,4 ± 3,8	20,8 ± 4,5
H ₂₀₄	18,1 ± 4,9	17,6 ± 4,3

(*) écart type de la descendance

Tableau IV : Diamètre au collet des hybrides H₁ (en cm).

Les descendances d'autofécondation sont un peu plus dépressives que celles issues de croisements. Elles sont de toute façon beaucoup moins vigoureuses qu'une combinaison particulière Arabusta 8 x 181T prise pour témoin.

CONCLUSION

Les résultats des observations effectuées sur les différents hybrides hexaploïdes *C. arabica* x *C. canephora* ont permis de dégager les informations suivantes :

- 1°) Le comportement et le fonctionnement biologique des hybrides de départ H₀ sont fortement influencés par les conditions pédoclimatiques. Ces caféiers ont une bonne adaptation aux zones de culture de *C. arabica*, mais ne conviennent pas, tout au moins dans leur formule actuelle, à des plantations de basse altitude.
- 2°) Les difficultés de sélection tiennent au fait qu'une prédiction de la valeur des hexaploïdes H₀ en fonction de celle des parents n'est pas possible, et que la sélection précoce n'est pas opérante. La sélection n'est efficace qu'après les observations individuelles pendant plusieurs années au champ.
- 3°) Dans les conditions de basse altitude la vigueur des hexaploïdes de la génération suivante H₁ est limitée par rapport à celle attendue de véritables hybrides F₁. Cependant ces hybrides sont plus vigoureux que les lignées obtenues en autofécondation.

Chez les hybrides hexaploïdes constitués par l'addition d'un génome complet de *C. arabica* et de *C. canephora* existe une structure génétique favorable à l'expression de la vigueur hybride, mais les interactions géniques à ce niveau de ploïdie sont complexes. Pour les hybrides H₀ de départ obtenus par duplication chromosomique et leurs descendances issues d'autofécondation qui sont homozygotes, il n'y a que des effets

d'additivité et d'épistasie cis. Dans les hexaploïdes H₁ issus de croisements entre H₀, s'y ajoutent les effets d'épistasie trans.

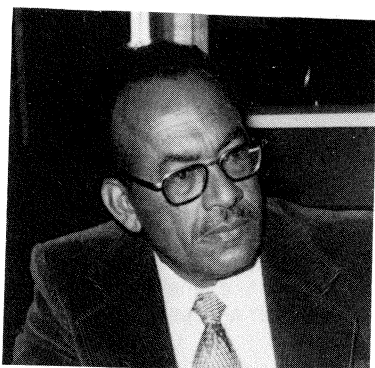
La variabilité des hybrides hexaploïdes H₀ et H₁ dépend essentiellement d'aptitudes spécifiques à la combinaison des géniteurs représentant la diversité des espèces parentales. Ces hexaploïdes H₀ et H₁ possèdent une variabilité cachée importante ; celle-ci s'extériorisera par croisement en provoquant des recombinaisons au niveau de la deuxième génération (F₂) et des suivantes. C'est dans ces générations successives qu'il y a le plus de chance de sélectionner des individus élités utilisables en caféiculture.

Une autre source d'amélioration des hexaploïdes est fournie par l'emploi des géniteurs de *C. arabica* sélectionnés pour leur adaptation à la basse altitude. Il est également possible de diversifier les types hexaploïdes obtenus en remplaçant dans cet hybride interspécifique l'espèce *C. canephora* par d'autres espèces diploïdes. Déjà les premiers hybrides hexaploïdes faisant intervenir *C. liberica* et *C. parrieri* semblent intéressants.

BIBLIOGRAPHIE

- BERTHAUD (J.) - 1977 - L'hybridation interspécifique entre *Coffea arabica* L. et *Coffea canephora* Pierre. Obtention et comparaison des hybrides triploïdes, Arabusta et hexaploïdes. Thèse de 3ème cycle, ORSAY, 51 p.. Café, Cacao, Thé (Paris), Vol XXII, n° 1, janv.-mars 1978, pp. 3-12, n° 2, avril-juin 1978, pp. 87-109.
- BERTHAUD (J.), 1977 - Caractéristiques comparées des hybrides interspécifiques tétraploïdes et hexaploïdes *Coffea arabica* L. x *C. canephora* Pierre. In : 8ème Colloque Scientifique International sur le Café, ASIC, Abidjan, pp. 393-397.
- BERTHOU (F.), 1975 - Méthode d'obtention de polyploïdes dans le genre *Coffea* par traitements localisés de bourgeons à la colchicine. Café, Cacao, Thé (Paris), vol. 19, n° 3, pp. 197-202.
- CAPOT (J.), 1972 - L'amélioration du caféier en Côte d'Ivoire. Les hybrides Arabusta. Café, Cacao, Thé (Paris), vol. XVI, n° 1, pp. 3-18.
- CAPOT (J.), 1975 - Obtention et perspectives d'un nouvel hybride de caféier en Côte d'Ivoire : l'Arabusta. In : 7è Colloque Scientifique International sur le Café, ASIC, Hambourg, pp. 449-457.
- CRAMER (P.J.S.), 1957 - Review of literature of coffee research in Indonesia. Turrialba (Costa Rica), Interamerican Institute of Agricultural Sciences, 262 p. (Miscellaneous publ. n° 15).
- MONACO (L.C.), CARVALHO (A.), 1975 - Coffee breeding for leaf rust resistance. In : 7è Colloque Scientifique International sur le Café, ASIC, Hambourg, pp. 437-445.
- OROZCO (F.J.), CASSALETT (C.), 1975 - La fertilidad y el diametro de los granos de polen en un híbrido interespecifico de café. Cenicafé (Chinchina) vol. 26, n° 1, pp 38-48.

MULTIPLICATION VÉGÉTATIVE *IN VITRO* DE L'ARABUSTA



P. DUBLIN

Directeur de recherches ORSTOM

Laboratoire de culture *in vitro*, GERDAT,

B.P. 5035, 34032 Montpellier cedex

INTRODUCTION

Comme vous avez pu le constater, plusieurs des communications concernant le chapitre Amélioration des Plantes, sont consacrées à l'emploi des techniques de culture de tissus *in vitro*.

Cette nouvelle orientation des recherches chez les caféiers cultivés, est très intéressante. En effet, jusqu'à une date récente, les recherches sur la culture de tissus végétaux avaient été limitées presque uniquement aux plantes des pays tempérés.

Depuis quelques temps, ces types de recherche ont été étendus aux plantes tropicales, et à l'heure actuelle il existe plusieurs exemples pratiques de l'utilisation des techniques de culture *in vitro* dans l'amélioration génétique des plantes tropicales utiles.

Les cultures de tissus peuvent présenter différents aspects, différentes formes, en fonction des organes mis en culture et en fonction du type de développement imposé à ceux-ci. Parmi ces différentes formes, la multiplication végétative *in vitro* est sans aucun doute, la plus répandue et celle qui a le plus contribué au développement que connaît aujourd'hui, l'emploi de ces techniques.

Chez le caféier, la multiplication végétative *in vitro* constitue un des thèmes principaux de recherche sur la culture de tissus de ces végétaux.

On doit à STARITSKY d'avoir pour ainsi dire ouvert à la voie à la multiplication végétative *in vitro* du caféier, par sa découverte de plusieurs cas d'embryogénèse somatique chez *C. canaphora* en 1970.

Depuis, plusieurs auteurs HARN, SONDAHL, ont, avec des succès différents expérimenté les techniques de culture *in vitro* dans la multiplication végétative des caféiers.

La plupart de ces travaux ont été effectués sur Arabica, espèce autogame dont la reproduction conforme par graines peut facilement être obtenue.

Le travail qui vous sera présenté a été réalisé principalement sur le caféier Arabusta. C'est un caféier hybride F₁ de C. arabica et de C. canephora, créé par CAPOT en Côte d'Ivoire et dont la génèse vous a déjà été présentée au cours des conférences ASIC antérieures.

Pour des raisons génétiques, démontrées par ailleurs expérimentalement, ce caféier hybride ne peut être reproduit de façon conforme que par voie végétative. Toute multiplication par graines conduit, à un éclatement génétique, débouchant alors sur des populations très hétérogènes et non exploitables au plan économique.

Au terme de sa sélection, tout caféier adulte, tête de clone nouvellement sélectionnée ne fournit qu'un nombre réduit de boutures orthotropes utilisables pour la reproduction végétative.

A l'heure actuelle, il faut donc un temps considérable entre le moment où la tête de clone Arabusta est sélectionnée et celui où le taux de multiplication en condition horticole aura atteint un niveau suffisant pour que ce nouveau clone puisse passer en grande culture.

En conséquence, toute technique qui permettra d'augmenter, dès le début, le taux de multiplication conforme d'un caféier tête de clone et accélérer ainsi l'installation des jardins de bois de bouturage, présente un intérêt réel pour l'amélioration génétique de ces plantes.

Les recherches que nous avons entreprises, en vue de la mise au point d'une technique de multiplication végétative in vitro de l'Arabusta et autres caféiers répondent à cette préoccupation.

Ces recherches ont été orientées dans deux directions :

- . La première orientation comporte l'induction de bourgeons et de tiges néoformés, suivi d'un bouturage in vitro.
- . La deuxième orientation comprend l'obtention d'embryons somatiques et le développement de ceux-ci en plantules organisées.

Le matériel végétal utilisé pour ces recherches comprenait :

- les clones sélectionnés, cultivés en serre à Montpellier, en Côte d'Ivoire
- Les plantules cultivées en tubes, en conditions stériles, sur Agar et sur Vermiculite.

BOUTURAGE DIRECT IN VITRO

En raison du dimorphisme végétatif des caféiers cultivés, les boutures chlorophylliennes des ramifications orthotropes sont les seules utilisables au plan pratique.

Les bourgeons orthotropes de ces boutures très fragiles sont cependant bien protégés par les stipules.

Plusieurs tentatives de culture in vitro de noeuds de ces tiges orthotropes ont été faites dans le but de promouvoir le développement des bourgeons orthotropes restés latents, et d'obtenir des tiges orthotropes débarrassées de tout germe, utilisables en bouturage in vitro.

Ces essais ont été faits sur substrats divers (Agar, Vermiculite, pont de papier filtre). Des essais de culture de bourgeons isolés ont également été faits.

Dans tous les cas, les résultats ont été décevants, sur milieu Agar on assiste dans les quelques jours qui suivent la mise en place des explants à une pullulation de bactéries qui conduit à une mort plus ou moins rapide des explants.

L'emploi, de produits anti-oxydants (Cystéine, DIECA, DTT) pour combattre l'action des phénols (toujours abondants chez les Canephora et Arabusta) ; d'antibiotiques et de bactéricides pour détruire les bactéries, n'ont pas amélioré de façon satisfaisante les résultats.

L'obtention in vitro de tiges à partir de bourgeons orthotropes déjà existants, s'étant révélée difficile et d'une rentabilité insuffisante, les recherches furent alors orientées vers l'induction de tiges néoformées, à partir de fragments d'entre-nœuds débarrassés de leurs stipules et donc plus faciles à désinfecter que les fragments de nœuds.

INDUCTION DE BOURGEONS NEOFORMES

Les explants constitués de fragments d'entre-nœud orthotrope jeune de 1 cm de long sont placés verticalement dans le milieu, l'extrémité radical plongeant dans le milieu.

La désinfection des explants est faite par trempage (30 minutes) dans une solution à 10 % d'hypochlorite de Ca (220°) additionnée de quelques gouttes de Tween 80, 3 rinçages à l'eau stérile.

Quatre milieux minéraux de base ont été expérimentés : deux comprenant les macro-éléments de MURASHIGE et SKOOG, deux autres basés sur les éléments de milieu N 30 K et N 45 K de MARGARA.

Dans tous les cas, le pH a été ajusté à 5,6 avant addition de l'Agar, les milieux ont été autoclavés à 115° pendant 20 minutes.

Pour combattre les brunissements qui apparaissent aux extrémités des explants et qui sont dus à l'oxydation des phénols, on a utilisé des actions combinées de froid, obscurité et anti-oxydants (20-30 g de Cystéine dans les milieux de culture).

DIECA : Diethyl dithio Carbamate
D.T.T. : Dithiothreitol

MILIEUX N 30K et N 45K de J. MARGARA (1978)
mg/l

CONSTITUANTS	N 30K	N 45K
NH ₄ NO ₃	480	720
Ca (NO ₃) ₂ 4 H ₂ O	590	944
K NO ₃	1313	1818
Mg SO ₄ 7 H ₂ O	246	246
KH ₂ PO ₄	136	136
K Cl	74,5	372,5

COMPOSITION MINERALE (en meq/l) des MILIEUX DE MURASHIGE et MARGARA

Dénomination du milieu	N TOTAL	NO ₃ ⁻	H ₂ PO ₄ ⁻	SO ₄ ⁻	Cl ⁻	K+	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	NH ₄ ⁺⁺
MS	60,05	39,43	1,25	3	6	20,06	6	3	20,62
N 30 K	30	24	1	2	1	15	5	2	6
N 45 K	45	36	1	2	5	24	8	2	9

Par rapport au milieu MS, les milieux 30 K et 45 K de MARGARA, sont caractérisés par :

- . une teneur en azote total plus faible
- . un rapport NH_4/N égal à 1/5 donc plus faible que MS (1/3)
- . un rapport K/Ca égal à 3, également plus faible que pour MS.

MILIEU DE MURASHIGE et SK00G (1962)

CONSTITUANTS	mg/l	mol/l
$\text{NH}_4 \text{NO}_3$	1650	20,6 m mol
KNO_3	1900	18,8 m mol
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	440	2,99 m mol
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	370	1,50 m mol
KH_2PO_4	170	1,25 m mol
H_3BO_3	6,2	100 μ mol
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	22,3	100 μ mol
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	8,6	29,9 μ mol
KI	0,83	5,0 μ mol
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,25	1,03 μ mol
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,025	0,100 μ mol
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,025	0,105 μ mol
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	27,8	100 μ mol
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	37,3	100 μ mol

Pendant toute la durée des expériences, les explants recevaient un éclairage de 4000 lux, suivant un régime 12 h/nuit et 12 h/jour, les températures des salles de culture ont été de $26^{\circ} \pm 1^{\circ}$ pour une et $28^{\circ} \pm 1^{\circ}$ pour l'autre.

Dans ces conditions, on a testé successivement l'action :

- . du Saccharose
- . des Macro-éléments Minéraux
- . des Auxines (A.I.A. - A.I.P. - A.N.A.)
- . des Cytokinines (Kinétine, Adénine, B.A.P., I.P.A.)
- . de divers constituants organiques (glycine, Glutamine, Extrait de Malt)

Le complexe vitaminique de MOREL, le plus souvent utilisé a quelquefois été remplacé par un mélange de Inositol (100 mg/l) et de Thiamine (4 mg/l).

Les contrôles sont effectués au bout de 6 semaines et on note le nombre d'explants ayant fourni au moins 1 bourgeon, le nombre et le développement des bourgeons par explant.

Les résultats obtenus ont été groupés dans les tableaux I à V.

Les bourgeons néoformés in vitro se développent rapidement et 2-3 mois après la mise en culture des explants, les tiges issues de bourgeons néoformés atteignent un développement suffisant pour être prélevées et découpées en boutures.

Ces boutures sont mises, en conditions aseptiques, successivement :

- 1) sur milieu d'induction de racines
 - 2) sur milieu de développement des racines
- et enfin,
sur terreau en conditions ordinaires de culture où la bouture enracinée se développe en plantule.

Le milieu de base d'induction de racines est composé de la solution d'éléments minéraux de MURASHIGE et SKOOG, diluée de moitié, et additionnée de Vitamines de MOREL, de Kinétine 1,0 mg/l de Saccharose 10 g/l et d'une Auxine.

Tableau 1
ACTION COMPAREE DE QUATRE MILIEUX (MACRO-ELEMENTS) SUR LE TAUX DE
NEOFORMATION DE BOURGEONS CHEZ LES CAFEIRS CULTIVES.

Milieus de base : (micro) MS, Fe E D T A, Vitamine de MOREL - Extrait de Malt
B A P 1,0 mg/l- Saccharose 30 g/l 400 mg/l

MILIEUX	Nombre initial Explants	Explants vivants	Explants avec bourgeons	Taux de néoformation en %	Origine génétique
45 K	24	13	1	7,7	R O B U S T A
30 K	24	24	8	33,3	
MS/2	24	18	4	22,2	
MS	24	23	7	30,4	
TOTAL	96	78	20	25,8	
45 K	24	13	2	15,4	A R A B I C A
30 K	24	20	11	55,0	
MS/2	24	24	12	50,0	
MS	24	16	4	25,0	
TOTAL	96	73	29	39,7	
45 K	24	22	7	31,8	L I B E R I C A
30 K	24	24	5	20,8	
MS/2	24	23	4	17,3	
MS	24	23	5	21,7	
TOTAL	96	92	21	23,0	
45 K	24	20	8	40,0	A R A B U S T A
30 K	24	22	14	63,6	
MS/2	24	22	12	54,5	
MS	24	23	10	44,4	
TOTAL	96	87	44	50,5	

TABLEAU RECAPITULATIF

ACTION COMPAREE DE QUATRE MILIEUX (MACRO-ELEMENTS) sur le TAUX DE
NEOFORMATION CHEZ LES CAFEIERS CULTIVES

MILIEUX	Nombre initial explants	Explants vivants	Explants avec bourgeons	Taux de néoformation en %
45 K	96	68	18	26,4
30 K	96	90	38	42,2
MS/2	96	87	32	36,7
MS	96	85	26	30,5

TABLEAU II

ACTION DE LA TENEUR EN SACCHAROSE SUR LA NEOFORMATION DE BOURGEONS
chez l'ARABUSTA

TRAITEMENT	Nombre initial explants	Nombre explants vivants	Nombre explants avec bourgeons	Taux de néoformation en %
MB + SAC 10 g/l	48	32	2	6,2
MB + SAC 30 g/l	48	38	14	36,8
MB + SAC 50 g/l	48	36	30	83,3
MB + SAC 100 g/l	48	24	5	20,8

Milieu de Base : Macro N 30 K

ms
FE E D T A
Vitamines de MOREL
Glycine 2 mg/l
Extrait de Malt 400 mg/l
B A P 1,0 mg/l

Tableau III

ACTION DE DIVERSES CYTOKININES ET AUXINES
Utilisées séparément et en combinaison sur les néoformations
de bourgeons chez l'ARABUSTA

TRAITEMENTS	Nombre initial explants	Explants vivants	Explants avec bourgeons	Taux de néoformation en %
MB + BAP 1,0 mg/l	24	18	8	44,4
MB + IPA 1,0 mg/l	24	14	8	57,1
MB + KIN 1,0 mg/l	24	14	3	21,4
MB + AIB 1,0 mg/l	24	15	3	20,0
MB + AIA 1,0 mg/l	24	20	6	30,0
MB + BAP 1,0 mg/l + AIB 1,0 mg/l	24	19	2	10,5
MB + BAP 1,0 mg/l + AIA 1,0 mg/l	24	18	2	11,1

Milieu de base : Macro N 30 K
Micro MS
Fe E D T A
Vitamines de MOREL
Glycine 2,0 mg/l
Extrait de Mait 400 mg/l
Saccharose 30 m/l

Tableau IV

ACTION DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE B A P EN PRESENCE
de Macro-Eléments divers, sur la Néof ormation de bourgeons chez l'ARABUSTA

TRAITEMENTS	Nombre initial explants	Explants vivants	Explants avec néoformation	Taux de néoformation en %
MB ₁	24	22	2	9,0
MB ₁ +BAP 1,0	24	16	15	93,7
MB ₁ +BAP 5,0	24	22	18	81,8
MB ₁ +BAP 10,0	24	20	13	65,0
TOTAL	72	56	46	79,3
MB ₂ +BAP 1,0	24	20	14	70,0
MB ₂ +BAP 5,0	24	22	20	90,9
MB ₂ +BAP 10,0	24	22	16	72,7
TOTAL	72	69	50	78,1
MB ₃ +BAP 1,0	24	20	10	50,0
MB ₃ +BAP 5,0	24	24	20	83,3
MB ₃ +BAP 10,0	24	12	10	83,3
TOTAL	72	56	40	71,4

MB₁ = MS ms Fe E D T A Vitamine de Morel Glycine 2,0 Ext. Malt400
Sacc.30
MB₂ = 30 K ms Fe E D T A Vitamine de Morel Glycine 2,0 Ext. Malt400
Sacc.30
MB₃ = 45 K ms Fe E D T A Vitamine de Morel Glycine 2,0 Ext. Malt400
Sacc.30

Tableau V

ACTION DE SUBSTANCES ORGANIQUES DIVERSES
sur la Néof ormation de bourgeons chez l'ARABUSTA

TRAITEMENTS	Nombre initial explants	Explants vivants	Explants avec bourgeons	Taux de néof ormation en %
Milieu de base	48	32	14	43,7
MB+extrait de Malt 400 mg/l	48	38	26	68,4
MB + Glycine 2mg/l	48	38	8	21,0
MB+extrait de Malt 1000 mg/l	48	26	22	84,6
MB + Glutamine 100mg/l	48	22	16	72,7
MB + Adénine 40mg/l	48	36	32	88,8

Milieu de Base : Macro N 30 K
 Micro MS
 Fe E D T A
 Vitamines de MOREL
 Saccharose 30 g/l
 B A P 1,0 mg/l

Trois Auxines de rhizogénèse A.I.A., A.I.B. et A.N.A. ont été essayées à des concentrations variant entre 0,1 mg/l et 5 mg/l. On constate, pour toutes ses Auxines et en particulier pour l'A.N.A. que, au-delà de 2 mg/l, il y a apparition de signes évidents de toxicité se traduisant par une diminution du taux d'enracinement, doublée de tuméfaction exagérée des racines. L'A.N.A., comparativement aux deux autres auxines A.I.A. et A.I.B. conduit à des racines plus tuméfiées, de coloration ivoire et dont l'émission est toujours précédée par la formation d'un cal plus ou moins développé.

Les résultats les plus satisfaisants en ce qui concerne le taux d'enracinement, l'abondance et l'aspect des racines ont été obtenus avec un mélange de A.N.A. et A.I.B. dans la proportion de :

- . A.I.A. 1,5 mg/l
- . A.I.B. 0,5 mg/l

Dès que les boutures ont émis des racines de quelques millimètres de long, elles sont alors transférées sur milieu de développement des racines dont la composition identique à celle du milieu d'induction de racines mais où les auxines de rhizogénèse précédentes ont été supprimées.

Le substrat du milieu de développement racinaire peut être de l'Agar ou mieux encore de la Vermiculite.

Au bout de 8-10 semaines de séjour sur milieu de développement racinaire les boutures alors sont transférées sur terreau ordinaire où elles poursuivent leur développement en plantule.

Quelques mois après ce transfert en conditions ordinaires de culture, la jeune plantule a acquis un développement suffisant pour affronter les aléas d'une mise en plein champ.

Il est à remarquer que la souche d'origine qui a fourni les premières tiges néoformées, peut continuer à fournir de nouvelles tiges pendant un temps pratiquement illimité à condition de renouveler de temps à autre le milieu de culture.

Après chaque prélèvement de tiges, de nouvelles autres apparaissent, il se forme alors une véritable souche qui rappelle celles des jardins de production de bois de bouturage.

Les données qui précèdent démontrent la possibilité d'obtenir chez l'Arabusta des bourgeons néoformés in vitro.

Ces expériences ont été réalisées sur tiges orthotropes, mais il est vraisemblable que d'autres organes, feuille, pédoncule florale, pourront également être utilisés pour obtenir des bourgeons néoformés, et accroître d'autant le coefficient de multiplication offert par cette technique.

Ces techniques d'induction de bourgeons in vitro pourront également être utilisées lors des doublements chromosomiques.

Les potentialités de néoformation de bourgeons chez le *G. coffea* varient selon les espèces, élevées chez l'Arabica et l'hybride Arabusta, cette aptitude à la néoformation est plutôt faible chez les caféiers du groupe des libéroïdes, aussi toutes recherches basées sur l'obtention in vitro de tiges orthotropes à partir de bourgeons préexistants présentent également un réel intérêt.

EMBRYOGENESE SOMATIQUE

La deuxième voie examinée dans la recherche d'une technique de multiplication végétative in vitro des caféiers, fût celle de l'EMBRYOGENESE SOMATIQUE.

Contrairement à la néoformation qui n'avait jamais fait l'objet de recherches chez le *G. coffea*, l'embryogénèse somatique chez ces végétaux est connue depuis 1970.

Nos recherches sur l'embryogénèse somatique ont été effectuées principalement chez l'hybride Arabusta, mais aussi chez le *C. canephora*.

Ici, les explants sont constitués par des fragments de 1 cm de long, d'entre-nœud orthotrope jeune et chlorophyllien de clones connus d'Arabusta, tantôt entiers, tantôt fendus par le milieu et placés horizontalement dans le milieu de culture.

Le milieu de base, pour ces recherches sur l'embryogénèse somatique était constitué par la solution minérale de MURASHIGE et SKOOG, additionnée des vitamines de MOREL. Quatre auxines, A.I.A., A.I.B., A.N.A., 2 D.D., deux cytokinines : Kinétine et Benzyl-Adénine ont été testées à des concentrations variant entre 0,05 mg/l et 2 mg/l. Les explants ont pendant toute la durée de l'expérience été maintenus à un éclaircissement de 4000 lux suivant un régime de 12 h/nuit et 12 h/jour, la température des salles de culture étant de $26^{\circ} \pm 1^{\circ}$ et $28^{\circ} \pm 1^{\circ}$.

Dans le processus d'obtention de plantules de caféiers par embryogénèse somatique, nous avons distingué trois phases :

1) une phase d'induction de callus, celle-ci se déroule à la lumière, pendant 4 à 6 semaines, sur un milieu constitué par :

- . Milieu de base MS
- . Saccharose 30-40 g/l
- . Auxine (0,5 à 1 mg/l)

2) Une phase de différenciation des embryoides, celle-ci se déroule à la lumière, sur un milieu composé de :

- . Milieu de base MS entier ou dilué de moitié
- . Saccharose 20 g/l
- . B.A.P. 1 mg/l

sa durée est de 8-10 semaines.

3) La 3^e phase est celle de développement des embryons en plantules. Sa durée est d'environ 10 semaines. Le milieu de développement des embryons est composé de la solution des éléments minéraux de MURASHIGE et SKOOG, diluée de moitié et additionnée de :

- . Vitamines de MOREL
- . A.I.A. 0,5 mg/l
- . Kinétine 0,1 mg/l
- . Saccharose 10 mg/l

Cette troisième phase peut être précédée par un passage en milieu liquide, agité. Ce qui accélère la dissociation et le développement des embryons au moment de leur repiquage sur milieu solide de développement.

Au cours de cette phase 3, l'embryon somatique qui comportait une zone racinaire surmontée de deux petites feuilles cotylédonnaires, se développe, les feuilles cotylédonnaires s'élargissent et s'étalent, la zone racinaire différencie une ou plusieurs racines pivotantes et on distingue dans la plantule ainsi constituée :

- Les feuilles cotylédonnaires
- La zone hypocotyle
- La ou les racines pivotantes

Au bout de 8 à 12 semaines en phase 3, les embryons somatiques atteignent un développement suffisant pour être repiqués sur terreau en condition ordinaire de culture.

A ce stade la plantule somatique rappelle parfaitement une plantule sexuée, mais dont la partie hypocotylaire serait anormalement courte.

En phase d'induction, les explants produisent des cals dont les vitesses de croissance, structure et potentialités embryogènes varient selon les auxines utilisées et les niveaux de concentration de celles-ci.

L'acide Naphtalique Acétique (A.N.A.) conduit à des cals translucides, hyperhydriques à croissance rapide, mais dont les taux de survie sont toujours faibles. Ces cals prennent une coloration grisâtre qui évolue rapidement vers le marron.

En présence de 2.4.D., et aux concentrations 0,1 mg/l les cals deviennent très rapidement friables et cotonneux. L'A.I.A. et l'A.I.B. conduisent à des cals dont les vitesses de prolifération sont inférieures à celles des cals développés sur A.N.A. ou 2.4.D.

Ces cals issus de milieu à base de A.I.A. ou A.I.B. sont tantôt granuleux avec de nombreuses protubérances, tantôt friables et d'un blanc presque argenté.

Pour les concentrations d'A.I.A. ou d'A.I.B. supérieures à 2 mg/l il y a apparition de racines dans 50 % des explants mis en culture.

Les potentialités embryogénèse de ces cals sont variables selon les auxines utilisées (tableaux VII et VIII).

Parmi les quatre auxines testées en phase d'induction, c'est l'A.I.A. qui donne les meilleurs résultats tant par le taux d'embryogénèse, que par la régularité de développement des embryons.

Cette supériorité de l'A.I.A. se manifeste dans le développement morphologique des embryons. Les embryons issus d'explants induits en phase 1 sur l'A.I.A. sont toujours bien constitués avec zone racinaire et zone cotylédonnaire, bien proportionnées.

Les embryons issus d'explants induits sur A.N.A. ont quelquefois un développement disproportionné, avec zone racinaire très importante tandis que les cotylédons ont disparu ou sont réduits à de simples protubérances.

Les premières manifestations d'un processus d'embryogénèse somatique ont généralement eu lieu au bout de 3-4 mois de mise en culture pour les explants issus d'hypocotyle de jeunes plantules, et au bout de 5-6 mois pour les explants issus de tiges orthotropes de caféier adulte.

Il s'agit alors de protubérance de formes globulaires, d'une coloration très blanche, contrastant fortement avec la coloration marron des cals d'où elles émergent.

Dans certains cas, les premières manifestations d'embryogénèse somatique peuvent être très précoces et se produire au bout de 8 semaines de mise en culture.

Ces cas précoces sont toujours associés à un processus de néoformation antérieur.

Tableau VII

TAUX D'EMBRYOGENESE SOMATIQUE CHEZ L'ARABUSTA, sur Milieu de base MB₂ additionné de différentes AUXINES

TRAITEMENTS	Nombre explants	Explants avec embryons	Taux embryogénèse en %	TOTAL		
				Explants	Explants avec embryons	Taux %
MB ₂ + 24 D 0,05	24	4	16,6	72	4	5,5
MB ₂ + 24 D 0,01	24	0	0			
MB ₂ + 24 D 0,5	24	0	0			
MP ₂ + ANA 0,5	24	0	0	72	1	1,4
MB ₂ + ANA 1,0	24	0	0			
MB ₂ + ANA 2,0	24	1	4,1			
MB ₂ + AIB 0,5	24	7	29,1	72	12	16,6
MB ₂ + AIB 1,0	24	5	20,8			
MB ₂ + AIB 2,0	24	0	0			
MB ₂ + AIA 0,5	24	7	29,1	72	21	29,1
MB ₂ + AIA 1,0	24	6	25,0			
MB ₂ + AIA 2,0	24	8	33,3			

Milieu de Base : MS ms Fe E D T A Vitamine de MOREL Cystéine 20 mg/l
Kinétine 0,1 mg/l Saccharose 30g/l

Tableau VIII

TAUX D'EMBRYOGENESE SOMATIQUE CHEZ L'ARABUSTA
sur Milieu de base MB4 additionné de différentes Auxines et
sur Explants préalablement induits en néoformation

TRAITEMENTS	Nombre explants	Explants avec embryons	Taux d'embryo- genese en %	TOTAL		
				Explants	Explants avec embryons	Taux %
MB ₄ + AIA 0,5	24	13	54,1	72	27	37,5
MB ₄ + AIA 1,0	24	10	41,6			
MB ₄ + AIA 2,0	24	4	16,6			
MB ₄ + ANA 0,5	23	1	4,3	69	2	2,9
MB ₄ + ANA 1,0	24	1	4,1			
MB ₄ + ANA 2,0	22	0	0			
MB ₄ + AIB 0,5	22	1	4,5	72	15	20,8
MB ₄ + AIB 1,0	24	6	25,0			
MB ₄ + AIB 2,0	24	8	33,3			
MB ₄ + 24 D 0,005	23	11	47,8	60	19	31,6
MB ₄ + 24 D 0,01	20	4	20,0			
MB ₄ + 24 D 0,1	17	4	23,5			

Milieu de Base : MS, micro Heller
Inositol 100 mg/l
Kinetine 1,0 mg/l

- Thiamine 4 mg/l
- Cystéine 20 mg/l
- Saccharose 30 g/l

Les embryoïdes apparaissent donc sur calcs de coloration, de structure et de développement divers, sur cal grisâtre spongieux, sur cal compact et marron, sur cal friable et légèrement chlorophyllien, sur cal spongieux friable à haute fréquence embryonique. De nombreux cas d'embryoïdes ont été observés sur cal d'explants préalablement induits en néoformation. Ces embryoïdes apparaissent à la base des explants, quelquefois au sein même du milieu de culture.

Laissés sur milieu de différenciation à base de B.A.P., les premiers embryons formés donnent naissance directement à de nouveaux embryons fils, ceux-ci apparaissent toujours au niveau de la zone racinaire. Ce processus d'auto-multiplication conduit rapidement à un nombre impressionnant d'embryons somatiques à partir d'un même explant

En règle générale, l'embryogénèse somatique est souvent liée à un processus de vieillissement des calcs doublé d'une diminution et d'un arrêt de la synthèse auxinique. Ce schéma se retrouve également dans certains cas d'embryogénèse somatique chez l'Arabusta, ce sont les cas d'embryogénèse sur calcs marrons, vieux et d'aspect plus ou moins nécrotiques.

Quelques cas de calcs spongieux, très fortement embryogènes, correspondant aux types HSFE de SONDAHL ont été trouvés ici aussi. Ces types à haute potentialité embryogénétique sont moins fréquents que les autres calcs embryogènes, et leur délai d'apparition est beaucoup plus long.

Chez l'Arabusta, l'embryogénèse somatique apparaît comme un phénomène particulièrement facile à déclencher. Il est souvent lié au tissu de cal en voie de vieillissement ou au tissu de cal préalablement induit en néoformation. Dans ce cas, l'embryogénèse apparaît, comme compétitive du processus de rhizogénèse.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Comparativement aux techniques de bouturage in vitro (à partir de tiges issues de bourgeons néoformés ou préexistants) l'embryogénèse somatique offre un coefficient de multiplication beaucoup plus élevé.

Ici, l'embryogénèse somatique a été obtenue à partir de fragments de tige, mais il existe toute une série d'organes, feuilles, pédoncules floraux, ovaires, étamines qui pourront être utilisés comme source d'embryon somatique et augmenter encore le coefficient de multiplication offert par ce procédé.

En culture de tissus, le passage par cal indifférencié conduit assez souvent à des modifications plus ou moins importantes du génome de départ, celles-ci sont généralement fonction des substances de croissance incorporées au milieu de culture et de la durée de la phase : cal indifférencié.

Dans la perspective d'une utilisation des embryons somatiques pour une reproduction conforme, une embryogénèse précoce obtenue sur un milieu à base d'A.I.A. devrait offrir davantage de garantie de conformité qu'une embryogénèse retardée en présence de milieux à base d'A.N.A. ou de 2.4.D.

Dans le cas contraire où cette embryogénèse somatique est envisagée comme moyen d'élargissement de la base génétique, pour la recherche de génotypes nouveaux, (variants résistants aux maladies ou à faible teneur en caféine) une prolongation de la phase cal indifférencié est souhaitable.

Bien qu'il n'existe pas de liaisons évidentes entre : embryogénèse somatique et androgénèse ou gynogénèse in vitro, il est vraisemblable qu'une connaissance approfondie de l'embryogénèse somatique chez les caféiers, pourra aider à l'obtention d'haploïdes chez ces végétaux par culture in vitro de leur gamétophyte mâle ou femelle.

La multiplication végétative in vitro des caféiers cultivés (par embryogénèse somatique ou bouturage) permettra :

- d'accélérer la diffusion de clones nouvellement sélectionnés,
- d'installer et de multiplier des micro-collections de géotypes sélectionnés et éviter ainsi les risques de perte de matériel végétal de valeur,
- de faciliter les échanges de matériel végétal, tout en supprimant les risques d'introduction de maladies ou d'insectes,

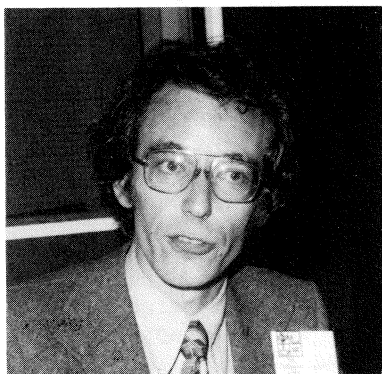
A plusieurs égards donc, la multiplication végétative in vitro des caféiers constitue d'ores et déjà un moyen utile et efficace pour l'amélioration génétique de ces plantes.

B I B L I O G R A P H I E

-
- CAPOT (J.) - L'amélioration du caféier en Côte d'Ivoire.
Les hybrides "Arabusta" Café - Cacao - Thé (Paris),
vol. XVI, n° 1, janv.-mars 1972, p. 3-17
- HERMAN (E.B.) - Clonal propagation of *C. arabica* L. from callus culture
HAAS (G.J.) Hortscience (St Joseph, Mich.), vol. 10, n° 6, déc.1975,
p. 588-589
- MARGARA (J.) - La multiplication végétative de la betterave (*Beta
vulgaris* L) en culture in vitro. C.R. Acad. Sci. (Paris)
t. 285 série D, 1977, p. 1041-1044
- MURASHIGE (T) - A revised medium for rapid growth on bio-assays with
SKOOG (F.) tobacco tissue cultures.
Physiol. Plantar (Copenhagen), 15, 1962, p. 473-497
- MURASHIGE (T) - Plant propagation through tissue cultures.
Ann. Rev. Plant Physiol. (Palo Alto), 25, 1974,
p. 135-166
- MONACO (L.C.) - Applications of tissue culture in the improvement of
SONDAHL (M.R.) coffee. In Plant Cell Tissue and Organ Culture.
CARVALHO (A.) J. Reinert et Y.P. J. Bajaj, Springer Verlag (Berlin),
CROCOMO (O.J.) 1977, p. 109-129
SHARP (W.R.)

- SONDAHL (M.R.)
SHARP (W.R.)
- High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica*. *Z. Pflanzenphysiol* (Stuttgart), vol. 81-5, 1977, p. 395-408
- STARITSKY (G.)
- Embryoid formation in callus culture tissue of coffee. *Acta Bot. Neerl.* (Leiden), vol. 19, n° 4, 1970, p. 509-514

CLONAL PROPAGATION OF *COFFEA ARABICA* L. BY NODAL CULTURE



J. B. M. CUSTERS

Institute for Horticultural Plant Breeding, Wageningen,

The Netherlands

Introduction

As long as in *Coffea arabica* fairly homozygous genotypes were selected for the establishment of plantations, propagation could easily be done through selfed seed. Recent breeding work developed CBD resistant genotypes, which, however, are of a hybrid nature (VAN DER VOSSSEN et al., 1976; VAN DER VOSSSEN and WALYARO, 1980). Since the species is tetraploid, it will take many cycles of selfpollination and selection to generate homozygous cultivars from these hybrids. Therefore, for a rapid introduction of these hybrids, asexual propagation may be considered. Conventional in vivo methods to achieve this, however, permit only slow increases in clonal plants, because the amount of suitable orthotropic shoot cuttings is restricted and root formation is rather difficult (SONDAHL and SHARP, 1979). As regards in vitro techniques, the possibility of somatic embryo formation from callus of *C. canephora* was already published in 1970 (STARITSKY, 1970). Thereafter, this morphogenetic potential was also found in other coffee species and the procedure to induce it was improved (HERMAN and HAAS, 1975; SONDAHL and SHARP, 1977 and 1979). This system was recommended for clonal propagation, but it appears that it has not been used for this so far. There is also no information on the occurrence of mutations in plants arising from somatic embryos, though mutations are generally expected in such plants (see MURASHIGE, 1974). These considerations prompted us to examine clonal propagation through in vitro enhancement of axillary shoot formation, which is the most reliable way of ensuring genetically uniform new plants. We studied the consecutive steps through which such a procedure of propagation normally proceeds, viz. the establishment of the aseptic culture, the continuous production of new shoots, the root formation, and the transfer of the tissue culture plants into soil.

Materials and Methods

Establishment of the aseptic culture.—Orthotropic shoot tips and both orthotropic and plagiotropic nodes without leaves excised from 0.5–2 years old greenhouse-grown *C. arabica* seedlings (seeds from clone 110/2/80, Department of Tropical Crop Science, Agricultural University, Wageningen) were surface sterilized in 1% sodium hypochlorite for 20 min and then 3 times rinsed with sterile water. In some experiments the explants were also soaked in an antioxidant solution, cysteine hydrochloride and ascorbic acid (20–100 mg per liter water), to prevent brown discoloration of the explants obviously caused by phenolic oxidation (see MONAGO et al., 1977). These

chemicals were given before and after disinfection.

The basic medium consisted of macro-elements, micro-elements, and vitamins according to Linsmaier and Skoog (1965), casein hydrolysate 500 mg/l, sucrose 20 g/l, Difco Bacto agar 7.5 g/l, and indoleacetic acid (IAA) 0.1 mg/l. Benzyladenine (BA), kinetin, and isopentenyladenine (2iP) were added at various concentrations. Other medium components examined for their effects on diminution of tissue browning were the afore-mentioned antioxidants (10 and 50 mg/l) and activated charcoal (Merck, 10 and 20 g/l). The pH of the medium was adjusted to 5.8. Aliquots of 10 ml medium were dispensed into 16 x 1.9 cm glass tubes, plugged with cotton and autoclaved at 121°C for 15 min.

After incubation the culture tubes were sealed with parafilm and usually maintained under 16 h Philips TL 34 light (approx. 1,700 lux) at 24.8 ± 0.8°C and 8 h darkness at 23.0 ± 0.7°C. In one experiment culturing in continuous darkness to reduce tissue browning was examined.

Continuous production of new shoots.—Nodes with leaves excised from in vitro stock plants were cultured on the same basic medium and under the same conditions as above. The size of the stock plants, the position of the node in the stock plant, and the concentration of the cytokinins BA and kinetin were tested for their effects on axillary shoot development. To determine the influence of leaves on the node, nodal explants with and without leaves were incubated.

Root information.—The shoot cuttings used in the rooting experiments contained 3 or 4 pairs of leaves. The effects of IAA, indolebutyric acid (IBA), and naphthaleneacetic acid (NAA) at various concentrations on rooting were determined using basic medium without cytokinin. Other experiments concerned effects of auxin application time and of continuous darkness at the beginning of the rooting phase.

Transfer into soil.—Shoots with elongating roots were removed from the tubes, gently washed free of nutrient medium, and immersed for about three hours in tap water to decrease the concentration of nutrients, especially sucrose, in the agar film surrounding the roots. They were subsequently planted in an unsterilized horticultural soil and placed under a plastic cover. Temporary ventilation started two days after transfer into soil and the plastic cover was removed after about one week.

Results

Establishment of the aseptic culture.—Culturing orthotropic node explants at different BA concentrations showed that the percentage of explants with axillary shoot development and the number of shoots produced increased with the BA concentration (Table 1). BA 10 mg/l gave the best results. Kinetin and 2iP could not match the results of BA 10 mg/l. In all the cytokinin treatments only the buds already existing in the original explant developed, whereas secondary axillary shoot development hardly occurred (Fig. 1).

The orthotropic shoot tips and the nodal explants from plagiotropic branches reacted in a similar way as the orthotropic nodes. Just expanding shoot tips proved very sensitive to disinfection and mostly died. All the shoots arising from the different explants exhibited an orthotropic growth.

The establishment of the culture was strongly hampered by contamination and brown discoloration (see note in Table 1). The frequency of contamination increased with the age of the nodes (Table 2). The different means used to diminish the brown discoloration were unsuccessful. The experiments on this were discontinued after the observation that a great part of the browning cultures contained traces of an initial contamination.

Continuous production of new shoots.—As no secondary axillary shoot development occurred during the initial culture, we tried to stimulate it. We isolated the nodes with their accessory leaves from seven weeks old in vitro plants and subcultured them on basic medium with BA 10 mg/l. These explants, however, showed a decreasing vitality, formed a brown callus and only thin, poorly growing shoots (Fig. 2). To improve this we tried various modifications of the medium composition and the culture conditions, including the factors to decrease the detrimental effects of phenolic oxidation, but without any positive effect. A solution to the problem was found in prolonging the culture of the stock plants. When they were about two months of age, they started a strong shooting and then developed a new pair of large leaves every three weeks (Fig. 3). Nodes with such large leaves, when used for a next cycle of multiplication, remained vital and developed well growing shoots (Fig. 4). Table 3 gives the multiplication rate of such nodes as affected by their position in the

in vitro stock plant. Only the shoot tip (position 0) and the lowermost nodes exhibited a decrease in yield of new shoots and nodes. Comparison of various concentrations of BA and kinetin revealed that BA 10 mg/l again was a good treatment. The presence of the leaves on the nodal explants was found to be a prerequisite for satisfactory results (Fig. 5).

Root formation.-Comparison of various concentrations of IAA, IBA, and NAA in a rooting experiment under the standard culture conditions showed that a high concentration of NAA was necessary to induce sufficient root formation (Table 4). The roots formed at this concentration of NAA, however, were short and thick, and scarcely grew. Shortening the period of culture on medium with NAA 5 mg/l followed by subculturing on medium without auxin drastically reduced the percentage of root formation (Table 5). Much better rooting was obtained by culturing in continuous darkness during the first three weeks of the rooting phase (Table 6). Under this condition a concentration of 0.2 mg/l of NAA proved to be high enough for root induction. This concentration of NAA did not inhibit root growth (Fig. 6). As a disadvantage of the dark treatment, however, we found a rather high rate of leaf abscission, sometimes even affecting the apices of the plantlets. This phenomenon seemed less serious when shoot cuttings from strongly shooting plants were used for rooting.

Transfer into soil.-The transplantation of the rooted plantlets and their hardening off presented no difficulties of infection and desiccation. Almost 100 per cent of the plantlets survived. After transfer to a greenhouse they developed normally and started branching from about the seventh node.

Discussion

An explanation of the development of orthotropic-looking shoots from the plagiotropic nodes of the in vivo stock plants may be that the state of young axillary meristems is still indefinite. Apparently, the meristems isolated at this stage from the plant remain devoid of the factors, which normally induce their plagiotropic development. This situation, which resembles that of the apex of a coffee embryo, presumably results in an orthotropic development. It should be noted, however, that these orthotropic-looking shoots were not rooted and then transferred into soil immediately after their appearance from the plagiotropic nodes. All these shoots were used as stock plants to provide nodes for continuous shoot multiplication. Because of the ability of the plagiotropic nodes to produce orthotropic-looking shoots, one selected plant may provide a fairly unlimited amount of starting material. This increases the chance of attaining an aseptic tissue culture of the plant in question. Consequently, the contamination and the brown discoloration during the establishment of the aseptic culture become a less serious problem. Treatments generally recommended to diminish the inhibitory action of the oxidation of phenolics (MONACO et al., 1977) did not solve the problems of low vitality, brown callus and the like during the stage of continuous production of new shoots. Failure of such treatments is not uncommon. Waiting until vigorous shoot growth of the in vitro stock plants occurred, solved these problems. Presumably, the nodes then produced are less sensitive to the inhibitory action of phenolic oxidation. Since the vigorous shoot growth caused a general improvement of the vitality of the cultures and at the same time increased the number of nodes, it was possible to reach a multiplication coefficient of almost 13 every six months. The influence of the dark treatment on rooting is probably also mediated by the endogenous phenols. These substances interfere with IAA oxidase and their production and conversion is affected by the action of light (see LEOPOLD and KRIEDEMANN, 1975).

References

- Herman, E.B. and G.J. Haas, 1975. Clonal propagation of Coffea arabica L. from callus culture. Hort Science 10, 588-589.
- Leopold, A.C. and P.E. Kriedemann, 1975. Plant Growth and Development, Mc Graw-Hill Book Comp., 2nd ed., 545 pp.
- Linsmaier, E.M. and F. Skoog, 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiologia Pl. 18, 100-127.
- Monaco, L.C., M.R. Söndahl, A. Carvalho, O.J. Crocomo, and W.R. Sharp, 1977. Applications of tissue culture in the improvement of coffee. In: Reinert, J. and Y.P.S. Bajaj (eds.), Plant Cell, Tissue, and Organ Culture, Springer-Verlag, pp. 109-129.
- Murashige, T., 1974. Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Plant Physiol. 25, 135-166.
- Söndahl, M.R. and W.R. Sharp, 1977. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of Coffea arabica L. Z. Pflanzenphysiol. 81, 395-408.
- Söndahl, M.R. and W.R. Sharp, 1979. Research in Coffea spp. and applications of tissue culture methods. In: Sharp, W.R. et al. (eds.), Plant Cell and Tissue Culture - Principles and Applications, Ohio State Univ. Press, Columbus, pp. 527-584.
- Staritsky, G., 1970. Embryoid formation in callus tissues of coffee. Acta Bot. Neerl. 19, 509-514.
- Vossen, H.A.M. van der, R.T.A. Cook, and G.W. Murakaru, 1976. Breeding for resistance to coffee berry disease caused by Colletotrichum coffeanum Noack (sensu Hindorf) in Coffea arabica L. I. Methods of preselection for resistance. Euphytica 25, 733-745.
- Vossen, H.A.M. van der and D.J. Walyaro, 1980. The inheritance of CBD resistance in Arabica coffee. Proc. 9th ASIC Int. Colloq. on Coffee, June 16-20, 1980, London (submitted).

Table 1. The effect of the concentration of BA on axillary shoot development on explants from young orthotropic nodes of *Coffea arabica* in vivo plants. The explants, 27 per treatment, contained only one axil. Data were collected after 7 weeks of culture.

BA mg/l	Percentage of explants with shoot development*	Mean number of shoots per shoot forming explant
0	0	-
0.4	6	1.0
2	39	2.5
10	57	2.8

*Contaminated and brown discoloured cultures, in total 21 and 15% respectively, were discarded. The number of explants left per treatment ranged from 17 to 21.

Table 2. Percentage of contamination in cultures of explants from orthotropic nodes of *Coffea arabica* in vivo plants as affected by the position of the node in the plant. Mean values of 3 experiments having 13, 14, and 16 explants per treatment.

Position of the node	Percentage of contamination
1	17
2	27
3	56

Table 3. Shoot formation on basic medium with BA 10 mg/l of the successive nodal explants from in vitro stock plants with 9 visible pairs of leaves. Per position 22 explants. Data collected after 5½ months of culture. Mean values designated by the same letter are not significantly different from each other at P = 0.05.

Original position of the node	Percentage of explants with shoot development	Mean number of	
		shoots per explant	new nodes per explant
0*	100	1.8 a	7.9 b
1	100	2.6 b	11.9 c
2	91	2.6 b	10.9 c
3	95	2.9 b	11.8 c
4	91	3.0 b	12.0 c
5	100	3.3 b	13.1 c
6	90	3.3 b	12.6 c
7	64	2.4 ab	9.1 bc
8	55	1.5 a	5.7 ab
9	48	1.3 a	4.5 a

*shoot tip

Table 4. Percentage of root formation of in vitro shoot cuttings of Coffea arabica as affected by IAA, IBA, and NAA concentration. Data collected after 7 weeks of culture. Per treatment 16 cuttings.

Auxin	Concentration (mg/l)		
	0.2	1	5
IAA	0	0	6
IBA	0	13	38
NAA	25	63	88

Table 5. The effects of NAA 5 mg/l treatments of different duration on the percentage of root formation of in vitro shoot cuttings of Coffea arabica. Per treatment 24 or 25 cuttings.

Duration of the application of NAA 5 mg/l (days).	Percentage of root formation	
	after 4 weeks	after 7 weeks
0	4	4
5	8	8
10	48	48
15	52	58
continuously	32	72

Table 6. Percentage of root formation of in vitro shoot cuttings of Coffea arabica as affected by NAA concentration and light condition during the first three weeks of the rooting phase. Per treatment 19 or 20 cuttings.

NAA mg/l	Percentage of root formation after					
	3.5 weeks		7 weeks		14 weeks	
	L*	D	L	D	L	D
0	0	0	0	0	0	0
0.04	0	5	0	30	10	35
0.2	5	60	11	90	11	90
1	60	55	70	84	70	89
5	47	0	89	50	89	75

*L: 16 h light per day
D: continuous darkness

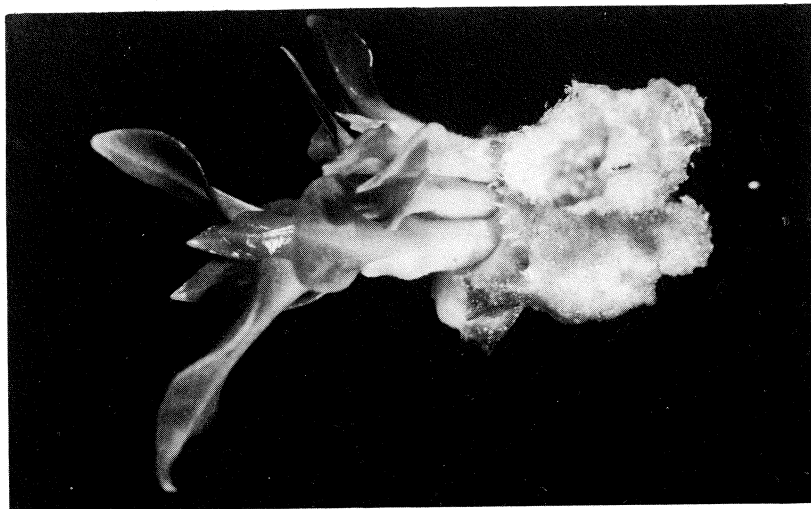


Figure 1. Axillary shoot development on an orthotropic node from a Coffea arabica in vivo plant after 7 weeks of culture on basic medium with BA 10 mg/l. The explant consisted of only one axil (3.2 x).



Figure 2. Nodal explants excised from 7 weeks old Coffea arabica in vitro plantlets after 9 weeks of culture on basic medium with BA 10 mg/l. Each explant consisted of the entire node and the accessory pair of leaves (3.2x)

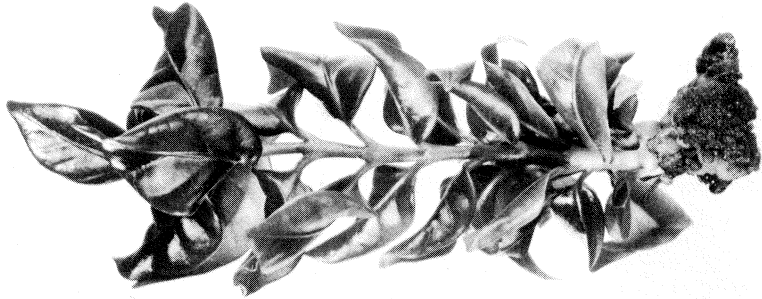


Figure 3. A 5 months old tissue culture plant of Coffea arabica showing strong shooting (1.6 x).



Figure 4. Nodal explant excised from a vigorously growing *Coffea arabica* in vitro plant after 8 weeks of culture on basic medium with BA 10 mg/l (2.7 x).



Figure 5. Nodal explants of *Coffea arabica* with (left) and without (right) the accessory leaves after 8 weeks of culture on basic medium with BA 10 mg/l. The explants were excised from vigorously growing in vitro plantlets (2.2x)



Figure 6. Root formation of *Coffea arabica* shoot cuttings after 8 weeks of culture on basic medium with NAA 0.2 (left), 1 (middle), and 5 mg/l (right). The cultures were kept in darkness during the first 3 weeks after incubation (0.8 x).

THE SYNCHRONISED MASS PROPAGATION OF *COFFEA CANEPHORA* IN VITRO

Dr G. STARITSKY, G. A. M. Van HASSELT

Department of Tropical Crop Science, Agricultural University,

P.O. Box 341,

6700 AH Wageningen

The Netherlands

1. INTRODUCTION

The multiplication of selected plant material plays an important part in the improvement of crops. Especially in woody crops and forest trees propagation problems could be a limitation to the screening, the introduction and the distribution of improved clones. Tissue culture methods have already proved their value and are applied on an industrial scale in the propagation of herbaceous ornamentals. In vitro propagation of woody species is more difficult and in general still in an experimental stage. However, *Coffea* spp. seem to be an exception and various ways of in vitro propagation have been successful. In fig. 1 a schematic representation is given of the different propagation methods. CUSTERS (1979) and DUBLIN (1980) presented the results of their experiments on the in vitro propagation of *Coffea arabica* and of 'Arabusta' coffee during this colloquium. The work of SÖNDAHL & SHARP (1977) on the induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* and the review of SÖNDAHL et al. (1980) also should be mentioned here.

2. SYNCHRONISED MASS PRODUCTION OF SOMATIC EMBRYOS IN SUSPENSION CULTURES

In this paper attention is paid to the synchronised mass production of somatic embryos of *Coffea canephora* in liquid medium. Initially callus tissue derived from explants of orthotropic shoots (figs. 2) and cultured for 6-8 weeks on solid medium was used to start the suspension cultures. After transfer to liquid medium the first wave of 500-1000 embryoids appears after 8-10 weeks of incubation. The first formed embryoids are remarkable equally in size (fig. 3), apparently they develop synchronously. Later a second generation and following generations of embryoids are formed (fig. 4). The embryoids multiply partly by "budding" (fig. 5), partly by new formation from cell aggregates in the medium. Duplication of the number of embryoids takes about one month. Through careful and timely transfer during which the cell suspension is separated from the embryoid fraction the synchronised production of embryoids could be maintained (fig. 6). Up to this stage the growth and development of the cultures is favoured by darkness.

Fully grown embryoids of the size of zygotic embryos develop in the light into small green plantlets (fig. 7). Transplanted directly from the sterile environment into the soil 40-60% of the plantlets survive and develop 1-2 leaf pairs and a new taproot in one month

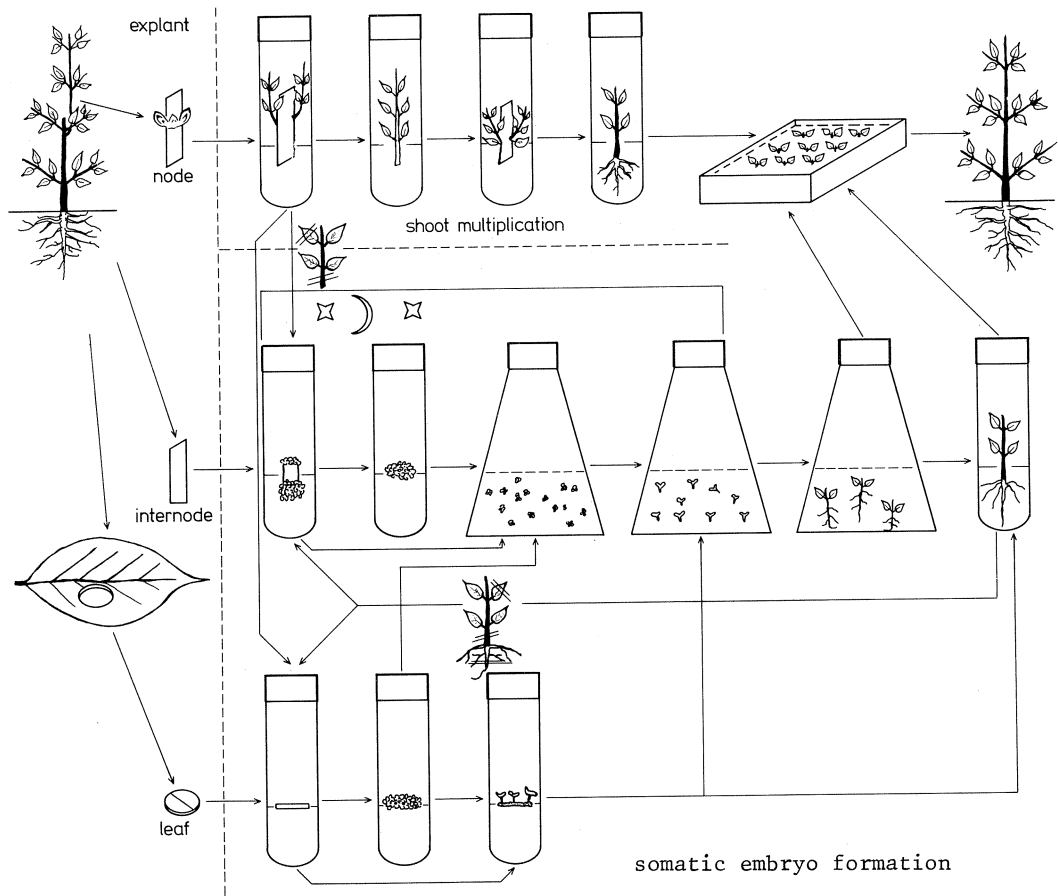


Fig.1 Schematic representation of the different ways of in vitro propagation of *Coffea* spp.

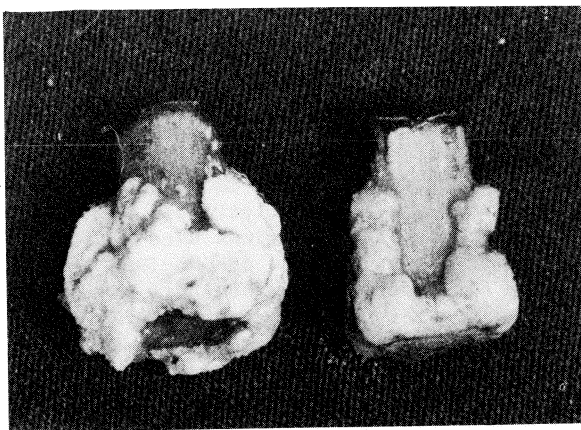


Fig. 2 Callus development on stem explants after an incubation period of 17 days.



Fig. 3 First generation of embryoids in a suspension culture.



Fig. 4 Continuous culture of embryoids. First generation on top, second generation of globular embryoids in the background, partly in clusters.



Fig. 5 Three-cotyledon embryoid budding at the root end.

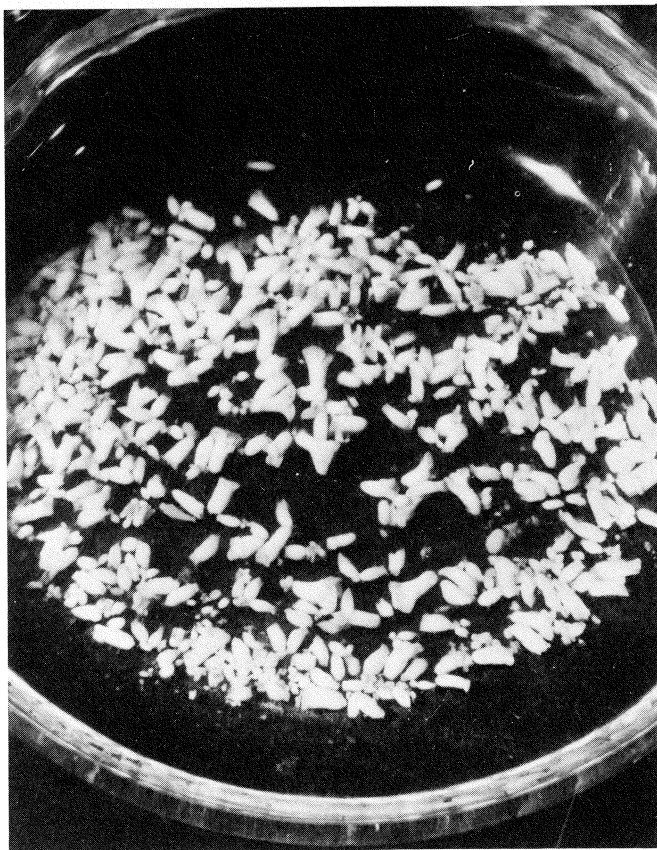


Fig. 6 Synchronisation in subcultured embryoids.

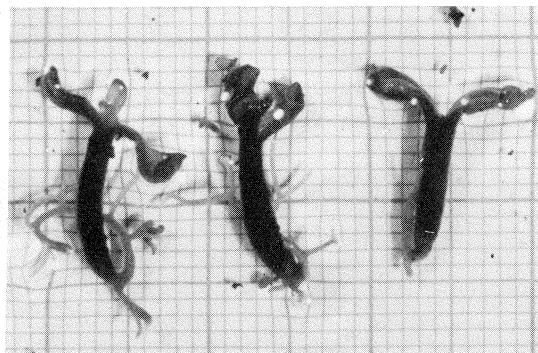


Fig. 7 Plantlets ready for transplantation into the soil.

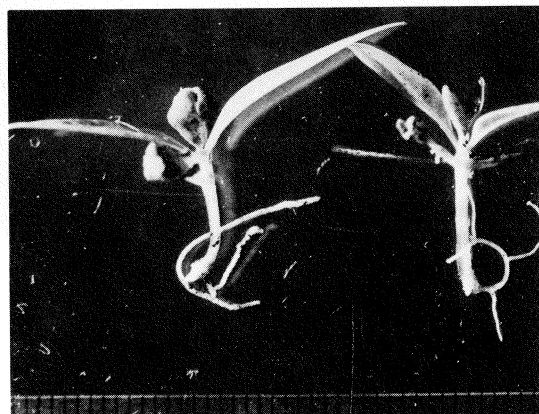


Fig. 8 Plantlets one month after transplantation. Development of a new taproot.

(figs. 8, 9). Although the growing conditions in the greenhouses of Wageningen (latitude 52°) are far from optimum, the oldest tissue culture trees flowered $2\frac{1}{2}$ year after transplantation. (figs. 10, 11). Embryoids and plantlets transferred to solid medium without growth regulators survive for almost 100% and develop fast in rooted plants.

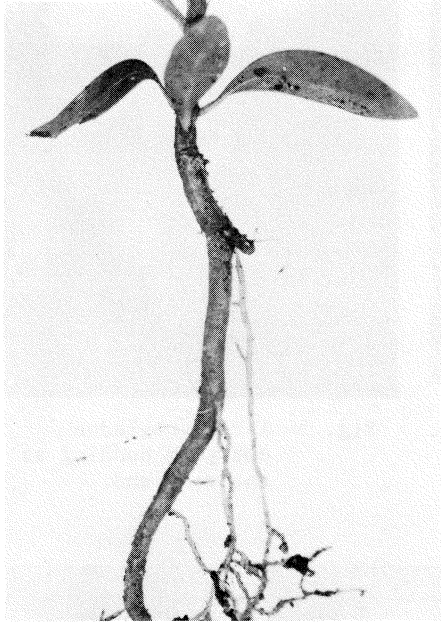


Fig. 9 New taproot of a four months old plant.



Fig. 10 Plants 16 months old (diameter containers 22 cm).



Fig. 11 Flowering after $2\frac{1}{2}$ year of growth.

3. THE NUTRIENT MEDIUM

Embryogenesis in *Coffea* tissue cultures occurs on a variety of nutrient media, apparently their composition is of minor importance in the process. A modification of the medium of SÖNDAHL & SHARP (1977) is generally used in later experiments. The basal medium contains MS (Murashige & Skoog) inorganic salts half strength (with the exception of KNO_3 which is

raised to the original concentration by the addition of 1000 mg/l in the medium), 10 mg/l thiamin, 50 mg/l L-cysteine- HCl, 100 mg/l meso-inositol, 100 mg/l casein hydrolysate, 20-30 g/l saccharose and in the solid media 5 g/l agar (OXOID 1). As growth regulators are frequently used BA and IBA in concentrations of 5 mg/l + 1 mg/l and 1 mg/l + 5 mg/l. In general high concentrations of BA stimulate early initiation and development of embryoids, whereas high concentrations of IBA initially stimulate callus formation and delay embryoid development. In the latter case eventually a larger number of embryoids is formed than at high BA concentrations. However, much depends on the nature and origin of the explants. For instance, there is a great difference in the reaction of stem and leaf explants or *C. canephora* and *C. arabica* material.

4. PROBLEM OF PHENOLIC OXIDATION

One of the problems in the in vitro culture of *Coffea* and other woody species is the exudation of phenolic compounds from the explants into the medium. The oxidation products, mostly brown in colour are toxic to plant tissues. Choice of material, omission of alcohol sterilisation, reduction of the sterilisation time in sodium hypochlorite solution, and other technical measures completely solved the problem in later experiments.

5. SHORTENING OF THE CALLUS INTERPHASE

In clonal propagation the existence of a callus interphase in the multiplication process is regarded as undesirable because of the risk of mutants in the progeny. Genetic variability already may find its origin in the parent tissue (e.g. endomitotic polyploids) from which the callus intermediate in the regeneration process arises. In this connection NASSUTH et al.(1980) investigated the histogenesis of callus in *Coffea canephora* stem explants. Quite unexpected they discovered proembryo-like structures in callus tissue of 14 days incubated stem explants. Possibly the isolation of single cells from their neighbours is favourable for embryoid initiation after which further development is temporarily suppressed.

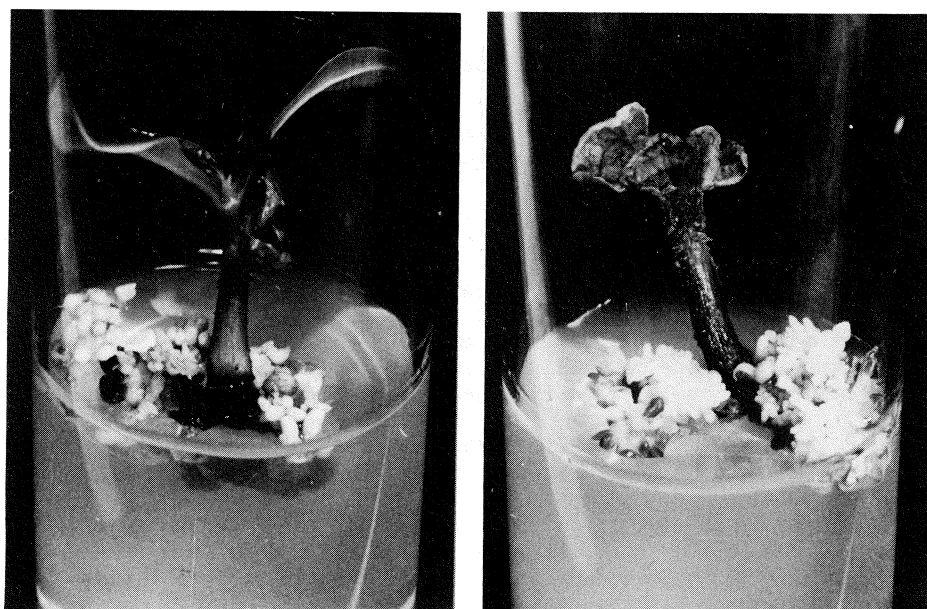


Fig. 12 New formation of embryoid clusters on plantlets transferred to basal medium containing 5 mg/l BA + 1 mg/l IBA. Take note of the clusters formed on bend up root tips at the surface of the medium.

The factors responsible for the inhibition of embryoid development are not present in plantlets or shoots from in vitro cultures. Transferred to basal medium with 5 mg/l BA + 1 mg/l IBA they, or explants of them immediately start with the production of embryoids, mostly without a callus interphase. White globular embryoids are already visible after four weeks and clusters of fully grown embryoids (fig. 12) are produced within eight weeks, about half of the time needed in previous experiments. In the latter experiments the development of somatic embryos is faster than of zygotic embryos in the seed (MOENS 1964).

The clusters of embryoids can be transferred to liquid medium in which they multiply fast, predominantly by "budding". Alternation of the plantlet or shoot phase with the embryoid phase in the propagation process could considerably increase the multiplication rate and reduce the callus interphase to a minimum.

6. GENETIC UNIFORMITY

The first group of suspension culture plantlets of *C. canephora* clone SA 158 was derived from a several times subcultured one year old callus strain. The plantlets developed into outwardly uniform trees, only one had from the beginning darker and more ovate leaves and appeared to be a tetraploid.

In later experiments with *C. canephora* clone BP 3902 in which the callus interphase has been shorter only diploids are produced.

7. DISCUSSION AND CONCLUSIONS

During the development of the described in vitro multiplication method for *Coffea canephora* several problems have been solved, for example the problem of phenolic oxidation. Synchronisation in the mass production of embryoids and plantlets is achieved by the application of liquid media.

Screening of the genetic and phenotypic uniformity of the in vitro progeny is difficult in Wageningen because of the limited space in the greenhouses where only a restricted number of trees can be kept in culture for observations. To investigate definitely the genetic uniformity and the absence of phenotypic aberrations large numbers of in vitro trees should be cultured under field conditions in the tropics.

In further experiments more attention will be paid to the study of somatic embryogenesis in vitro, to the quantitative aspects of the multiplication process and to nursery problems with in vitro plantlets.

The promising results of the in vitro propagation experiments with *Coffea* spp. might stimulate and encourage research with other woody species.

REFERENCES

- CUSTERS, J.B.M. (1979): Vegetative propagation of *Coffea arabica* L. by serial buds in vitro. Newsletter Int. Ass. Plant Tissue Culture 28: 21-22.
- DUBLIN, P. (1980): Induction de bourgeons néoformés et embryogenèse somatique - Deux voies de multiplication végétative in vitro des caféiers cultivés. Café Cacao Thé 24:121-130.
- MOENS, P. (1964): Développement de l'ovule et embryogenèse chez *Coffea canephora* Pierre. La Cellule 65: 129-147.
- NASSUTH, A., T.M. WORMER, F. BOUMAN & G. STARITSKY (1980): The histogenesis of callus in *Coffea canephora* stem explants and the discovery of early embryoid initiation. Acta Bot. Neerl. 29: 49-54.
- SONDAHL, M.R., D.A. EVANS & W.R. SHARP (1980): Coffee cell culture - Growth and somatic embryogenesis. Newsletter Int. Ass. Plant Tissue Culture 30: 2-7.
- SONDAHL, M.R. & W.R. SHARP (1977): High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. Z. Pflanzenphysiol. 81: 395-408.

CRITÈRES DE SÉLECTION POUR L'AMÉLIORATION DES HYBRIDES ARABUSTA EN CÔTE D'IVOIRE

P. DUCEAU

Division de génétique

Centre de recherches de l'IFCC en Côte d'Ivoire

01 B.P. 1827, Abidjan 01

Les hybrides Arabusta, présentés à l'occasion du septième colloque de l'ASIC, à Hambourg, en 1975, sont obtenus par pollinisations dirigées et par repérage en pépinière d'hybrides naturels, aisément reconnaissables à leur morphologie, issus du semis de graines récoltées sur des clones sélectionnés de C. canephora tétraploïdes, installés dans des parcelles de culture mixte Coffea canephora tétraploïde et Coffea arabica.

Le nombre élevé de familles hybrides synthétisées, l'importance numérique de la population d'hybrides naturels imposent une sélection rapide.

Nécessairement végétative pour les Arabusta, eu égard à leur instabilité génétique, cette sélection repose sur cinq critères : productivité, rusticité, caractéristiques chimiques et physiques, fertilité, résistance à la verse.

Les géniteurs : Coffea canephora tétraploïde et Coffea arabica, supportent le même crible, pondéré en fonction de leur structure génétique et de leur adaptabilité aux conditions écoclimatiques de la zone caféière ivoirienne.

Pratiquement, la sélection s'opère dans des parcelles de collection, d'hybridation, de présélection et, pour affiner l'analyse du comportement des Arabusta d'élite, dans des essais clonaux de triage et de confirmation, expérimentation statistiquement interprétable, souvent accompagnée d'essais de phytotechnie concernant la densité de plantation, la technique de conduite, l'irrigation, l'entretien et la fumure.

Nous présenterons successivement les différents critères de sélection en explicitant la méthodologie utilisée pour leur estimation et leur importance relative selon le type de matériel. Quelques résultats pratiques illustreront ces considérations.

PRODUCTIVITE

La productivité est évaluée par l'analyse des récoltes effectuées plusieurs années durant dans les différents types de parcelles. L'échantillonnage fait à l'occasion de la récolte permet de déterminer avec précision le rendement en café marchand des sujets mis en étude, leurs caractéristiques technologiques.

Des observations qualitatives permettent d'apprécier le comportement des arbustes lors des floraisons ; précocité et alternance entrent également en ligne de compte.

Pour le parent Arabica, l'estimation de la productivité est quasi impossible ; en effet, celle-ci est faussée par les conditions inappropriées de la Basse Côte d'Ivoire à la culture de l'Arabica ; on note en particulier un nombre important de floraisons inefficaces.

C'est donc essentiellement grâce à la littérature que nous opérons, au sein du "pool" Arabica dont nous disposons, le tri des géniteurs pour ce critère dont l'héritabilité est connue.

Chez Coffea canephora tétraploïde, la productivité revêt une importance particulière. Les autotétraploïdes obtenus par traitement à la colchicine de graines, de plantules ou de rejets orthotropes de C. canephora supportent une sélection sévère suivant le schéma classique : observation, mise en essais comparatifs clonaux des meilleurs sujets.

Notons que la fertilité, liée à la productivité, a permis dès le jeune âge un tri des candidats têtes de clone.

On dispose actuellement de clones produisant plus de deux tonnes de café marchand à l'hectare par an et dont l'entrée en rapport a lieu deux ans et demi après la plantation. Le rendement à l'usinage (café marchand/cerises fraîches) est de 1/6 ; la granulométrie est très intéressante : 96 % de grade I (refus au crible de 16/64" ou 6,35 mm) ; la teneur en caféine et les qualités organoleptiques sont celles du C. canephora.

Pour l'Arabusta, la productivité décidera du choix final des clones pouvant être vulgarisés. La variabilité est évidemment très importante, fertilité et résistance à la verse permettent un "dégrossissage" précoce des candidats à mettre en essai.

On remarque qu'à l'occasion de floraisons induites par des pluies faibles, l'Arabusta semble réagir avec plus de rapidité que le Robusta, ce qui entraîne un gaspillage de fleurs.

L'entrée en production se fait à deux ans et demi.

En ce qui concerne l'alternance, le comportement est identique à celui du Robusta ; la sélection élimine au fil des ans les sujets présentant ce défaut.

L'étalement des floraisons ne se produit qu'en cas de pluies mal distribuées, comme pour Coffea canephora.

RUSTICITE

La rusticité est estimée par la réaction des arbustes aux aléas phytopathologiques et entomologiques, par leur résistance à la sécheresse.

- Aléas phytopathologiques

Le comportement de l'Arabica à l'égard de la rouille orangée due à

Hemileia vastatrix est connu ; Coffea canephora, tolérant ou résistant, transmet ses caractères à l'Arabusta. Le matériel tétraploïde employé dans les hybridations est résistant à la race II présente en Côte d'Ivoire.

Hemileia coffeicola, agent de la rouille farineuse, n'a pas été rencontré sur Arabusta à ce jour.

- Aléas entomologiques

Le comportement de l'Arabusta vis-à-vis du scolyte des rameaux, Xyleborus morstatti est satisfaisant.

La technique de culture de l'hybride étant proche de celle du Robusta (multicaulie, égourmandages suivis), elle garantit, sauf en cas de pluies très mal distribuées, des floraisons groupées qui réduisent la lutte contre le scolyte du grain, Hypothenemus hampeii, à un traitement systématique effectué en deux passages, le premier ayant lieu trois mois après la floraison principale, le second quatre semaines plus tard.

- Résistance à la sécheresse

La résistance à la sécheresse est satisfaisante chez l'Arabusta ; on note en particulier que son établissement est meilleur que celui du Robusta en zone marginale. L'adaptation aux conditions éco-climatiques de la zone caféicole ivoirienne est très bonne. En ce qui concerne l'Arabica, les études entreprises conjointement avec l'ORSTOM permettent d'ores et déjà d'utiliser en hybridation des plantes sélectionnées dans des croisements entre origines éthiopiennes, qui sont mieux adaptées à la basse Côte d'Ivoire que leurs parents.

CARACTERISTIQUES CHIMIQUE ET PHYSIQUES

L'abaissement de la teneur en caféine des Arabusta est une de nos préoccupations. Des études ont prouvé que la transmission héréditaire de ce caractère relève d'un déterminisme polygénique et que la teneur en caféine est vraisemblablement en liaison avec la productivité.

Actuellement, la teneur moyenne, en % de la matière sèche, du mélange Arabusta vulgarisé est de 1,96, celle des clones C. canephora est de 2,79 ; nous escomptons abaisser progressivement celle de l'Arabusta à 1,6 par le choix des géniteurs pour ce critère. Les Arabica sont bien connus et l'effort porte principalement sur la sélection de C. canephora tétraploïdes présentant à la fois une bonne productivité et une teneur en caféine de l'ordre de 1,8 à 2 % M.S.

Sur le plan physique, le mélange clonal Arabusta sélectionné présente 85 % de grade I, le poids de 100 fèves est de 21 g.

FERTILITE

La fertilité est un facteur déterminant de la productivité ; on entend par fertilité l'aptitude d'un ovule à former une graine ; elle est mesurée par les paramètres P1 et P2, qui représentent respectivement le taux d'apparition d'un jeune endosperme et le taux d'apparition d'un grain, comme le montre le schéma (fig. 1). Ces paramètres sont à rapprocher des taux de caracolis et de flottants.

La technique est simple : après découpage d'un échantillon d'environ 250 cerises prélevé quelque quatre mois avant maturité sur un certain nombre de noeuds fructifères d'un arbre donné, la lecture révèle, théoriquement, car les "cerises" de

types "F" tombent peu de temps après la floraison, six types de cerises qui permettent de déterminer P1 et P2.

Ceux-ci sont souvent corrigés par la dérivation "r", qui illustre probablement les raisons physiologiques provoquant la chute des fruits.

Le traitement des données sur calculateur tient compte de ce phénomène et corrige P2, qui est affecté dans environ 30 % des cas par la dérivation. Le calcul nous donne par ailleurs le nombre réel des types "D" et "E", qui se rencontrent en quantités non négligeables, surtout pour le type "D", chez les hybrides et dont l'estimation est souvent faussée dans l'échantillon en raison de leur chute précoce plus ou moins importante.

Une personne entraînée à ce travail peut traiter sans difficulté six échantillons par jour ; le temps de calcul est négligeable.

Chez l'Arabusta, la fertilité est le critère de sélection prédominant. En effet, si les espèces naturelles C. arabica et C. canephora ont des fertilités satisfaisantes et assez stables dans l'espèce, il n'en est pas de même pour le Canephora tétraploïde, dont les anomalies sont transmises à l'hybride. On peut estimer que dans le passage di-tétra, la baisse de fertilité est de 25 % pour le P1, 12 % pour le P2, ce qui entraîne une chute du taux d'utilisation des ovules, égal à $P1 \times P2 \times r$, de l'ordre de 45 %. La restauration de la fertilité s'obtient par générations successives de C. canephora tétraploïdes, dénommées TF0, TF1, TF2, etc ..., ces tétraploïdes engendrent les hybrides dits de première, deuxième, troisième vague, etc

La figure 2 illustre synthétiquement l'évolution de la fertilité chez l'Arabusta.

Pour en simplifier la lecture, il n'est pas tenu compte de la dispersion des P1 et P2 d'une structure donnée.

Pour l'Arabusta, cette dispersion est très importante : on peut estimer que P1 varie de 0,1 à 0,8 et P2 de 0,6 à 0,96. Les points "V1", "V2", "V3" et "V4" représentent les élites triés dans le matériel de chaque vague ; les rendements obtenus (1,4 t/ha pour la première vague) ou attendus (V2, V3, V4) illustrent la productivité des mélanges clonaux vulgarisés et à venir.

Le mélange actuellement distribué produit 1,5 à 1,6 t de café marchand/ha et comporte sept clones de première vague auxquels viennent s'ajouter trois clones de deuxième vague ; nous escomptons respecter l'échéancier d'obtention suivant : V2-1985 ; V3-V4-1990.

RESISTANCE A LA VERSE

Les Arabusta sont très vigoureux et souvent sensibles à la verse, phénomène qui affecte peu les Canephora.

Soucieux de vulgariser des arbustes cultivables suivant des normes proches de celles que nous recommandons pour le Robusta (multicaulie, régénération quinquennale après un premier cycle de sept ans), nous avons été amenés à détailler ce problème.

Le fléchissement par flambage des tiges est déterminé par la force critique ; son expression fait intervenir le module de Young et la forme des sections transversales et longitudinales des tiges.

Le module de Young est constant pour un arbre donné, il s'exprime en kg/cm². La mesure s'effectue sur la partie aoûtée, et quasi rectiligne, d'un rameau primaire sain ; cinq à huit branches permettent d'obtenir sur l'ensemble des résul-

tats un écart-type de 5000 ou moins, ce qui est suffisant pour séparer les sujets ; on traite sans difficulté six arbres par jour.

Nous donnons à titre indicatif les chiffres moyens suivants :

<u>Coffea canephora</u>	: 65 000
<u>C. canephora</u> tétraploïde	: 40 000
<u>C. arabica</u> éthiopien	: 50 000
<u>C. arabica</u> Caturra	: 20 000
<u>C. arabica</u> San-Bernardo	: 40 000

Les Arabusta ont en moyenne un module de 37 000 kg/cm² et subissent la verse environ deux ans avant le Robusta, soit quatre à cinq ans après la plantation. Le mélange clonal actuel a un module de 46 000.

La forme des tiges (longueur des entre-nœuds, conicité) intervient également dans la force critique, mais de façon moins importante que le module.

Les traitements agronomiques (fumure, taille) influent sur la force critique en modifiant la forme des tiges. L'écimage en multicaulie permet d'assurer une résistance à la verse satisfaisante et nous le préconisons pour les hybrides actuellement vulgarisés.

L'architecture de l'arbre intervient quelquefois ; c'est le cas des hybrides obtenus avec le cultivar San-Bernardo qui demeurent trapus ; les hybridations avec Caturra ont été assez décevantes en raison de la mauvaise rigidité des tiges.

L'amélioration porte essentiellement sur le choix de parents (surtout chez Coffea arabica, car la variabilité semble faible chez les C. canephora tétraploïdes) à fort module et la sélection dans les descendance hybrides de sujets présentant des modules d'au moins 45 000 kg/cm².

/ CONCLUSION /

La sélection opérée chez les hybrides Arabusta repose sur cinq critères : productivité, rusticité, teneur en caféine, fertilité, résistance à la verse.

Leurs parents (Coffea canephora tétraploïde et Coffea arabica) supportent le même crible, pondéré en fonction de leur structure. La productivité inclut les observations relatives au comportement des candidats têtes de clone lors des floraisons, leur précocité, l'alternance qu'ils peuvent présenter. La rusticité est estimée par la résistance à la sécheresse, la réaction aux aléas entomologiques et phytopathologiques. La teneur en caféine est prise en considération. La fertilité ovulaire est mesurée par les paramètres P1 et P2. La résistance à la verse, qui inclut module de Young et force critique, définit la durée du cycle de culture.

Les techniques d'estimation de la fertilité et de la résistance à la verse permettent le repérage rapide des sujets qui seront soumis aux épreuves clones de triage et de confirmation.

B I B L I O G R A P H I E

- J. CAPOT. - Obtention et perspectives d'un nouvel hybride de caféier en Côte d'Ivoire : l'Arabusta. ASIC, 7ème Colloque, Hambourg, 1975, p. 449-457.
- A. CHARRIER, J. BERTHAUD. - Variation de la teneur en caféine dans le genre Coffea. Café Cacao Thé (Paris), vol XIX, n° 4, 1975, p. 251-264.
- Ph. de REFFYE. - Le contrôle de la fructification et de ses anomalies chez les Coffea arabica, robusta et leurs hybrides Arabusta. ASIC, 7ème Colloque, Hambourg, 1975, p. 459-482. Café Cacao Thé (Paris), vol. XVIII, n° 4, 1974, p. 237-254.
- Ph. de REFFYE, P. DUCEAU. - Amélioration de la résistance à la verse du caféier à l'aide de la théorie de la résistance des matériaux. ASIC, 8ème Colloque, Abidjan, 1977, p. 439-445.

FORMATION DES CERISES

TYPES MORPHOLOGIQUES DE CERISES

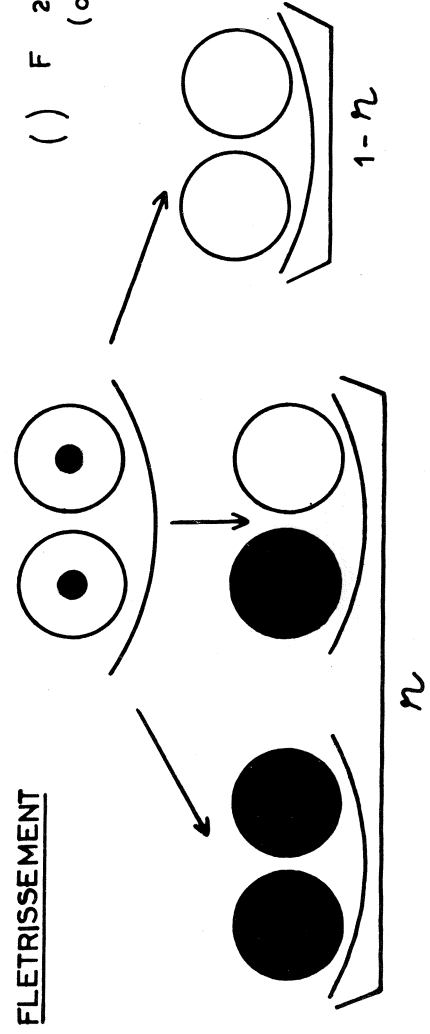
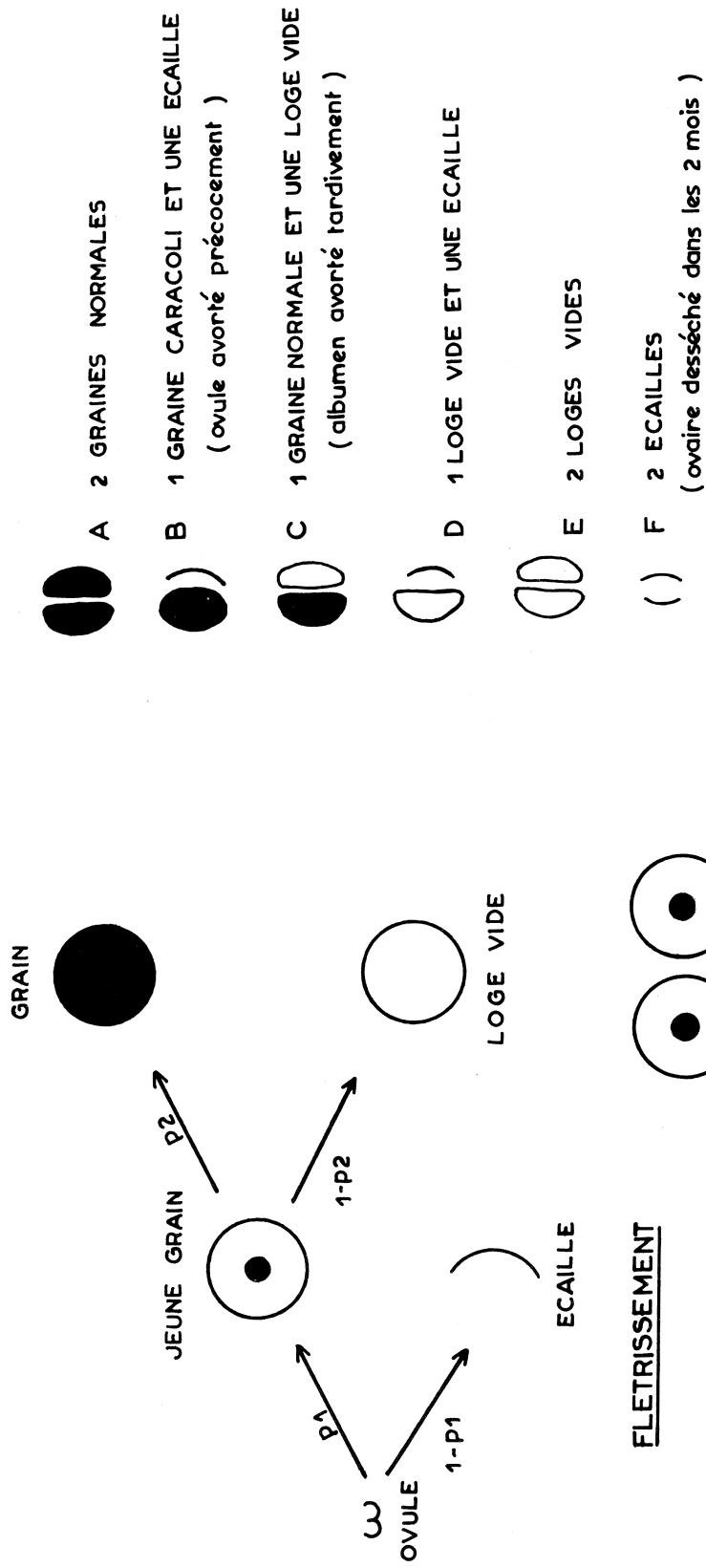


Figure 1.

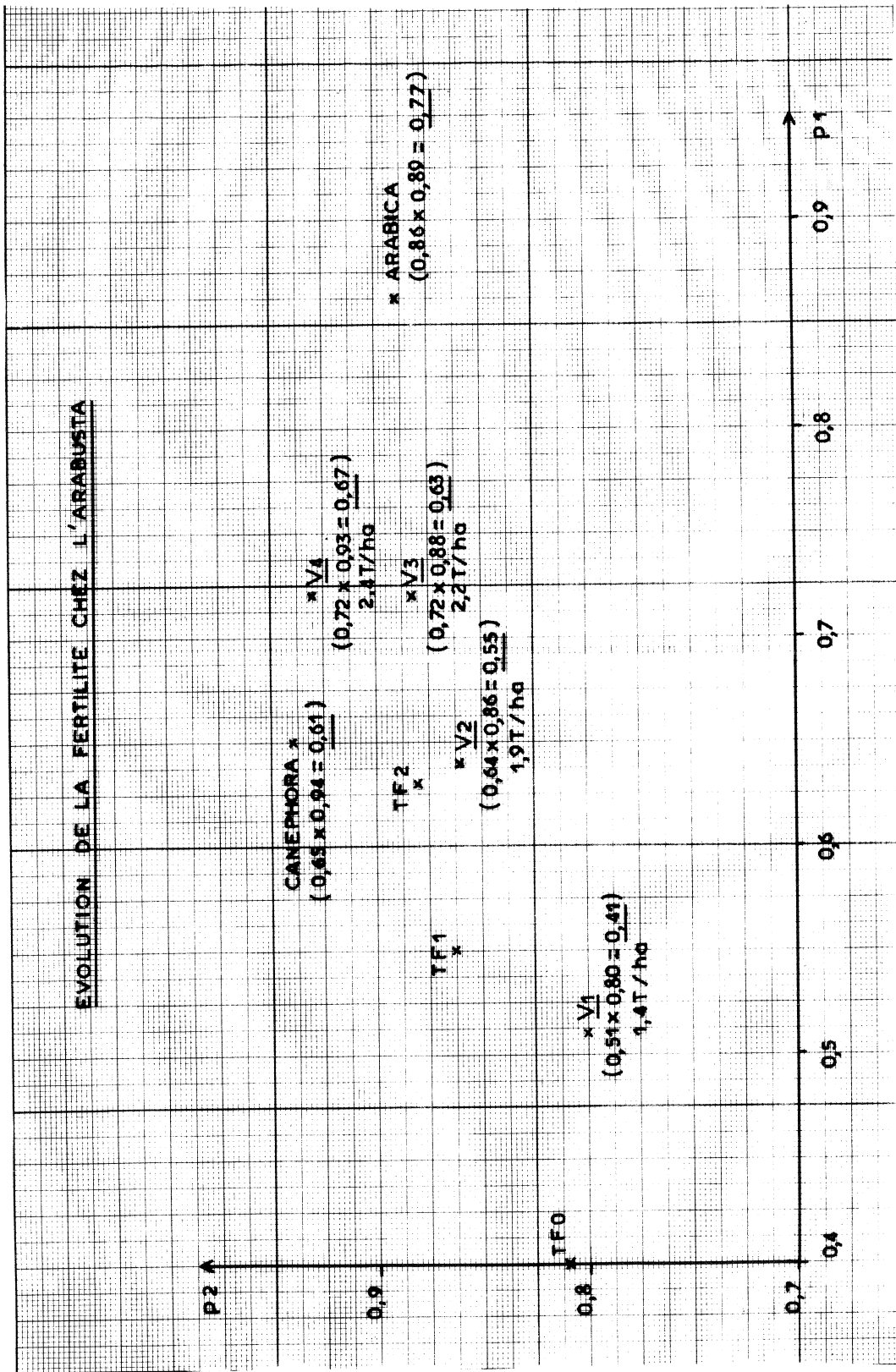


Figure 2.

HIGH PRODUCTION OF CAFFEINE BY STERILE TISSUE CULTURES OF *COFFEA ARABICA*



G. Waller

G. R. WALLER, C. F. CUMBERLAND

Department of Biochemistry

Oklahoma State University

Stillwater, Oklahoma 74078 U.S.A.

Introduction

Plant cell cultures are suitable systems in which to study the biosynthesis, biotransformation, and biodegradation of secondary metabolic products such as caffeine. In these cultures the rates of synthesis and catabolism of cellular constituents may depend markedly on many biotic and abiotic parameters. Since most secondary metabolites result from aberrations in primary metabolic pathways, they are difficult to produce in plant cell lines, particularly if high levels of secondary metabolites are desired.

We began work on sterile tissue cultures of *Coffea arabica* in the hope of minimizing the rapid darkening of excised tissue associated with polyphenol oxidases, and also of producing a high-yielding source of enzymes involved in the metabolism of caffeine. Our clonal lines of *Coffea arabica* are indeed reasonably light in color and most have yielded high levels of caffeine (although a few yielded very low concentrations); thus our hopes for efficient biosynthesis have been fulfilled. Biodegradation studies are not yet under way. We found, however, an almost total lack of information on levels of caffeine produced by sterile tissue cultures of the coffee plant. Frischknecht *et al.* (1977) showed that sterile callus of

C. arabica produced caffeine in concentrations of 1.0-1.6% dry weight, but found some growth inhibition when caffeine concentration exceeded 900-1000 g/mg of tissue. They also reported that a 49-day-old callus culture contained 25 times the amount of caffeine of the inoculum.

Other laboratories have produced sterile tissue cultures of various *Coffea* species (Staritsky, 1970; Keller, *et al.*, 1972; Sharp, *et al.*, 1973; Herman and Hags, 1975; van de Voort and Townsley, 1974; Townsley, 1974; and Sondahl, *et al.*, 1979) but without attention to caffeine production.

For conducting a selection program efficiently we have met, in part, the following conditions: a) variability in the original cell population of the stem tissue is high enough to permit selecting good starting material; b) a simple, specific, and sensitive assay method for caffeine is available; and c) the selected culture line has been shown to have biosynthetic stability. We have not yet selected the specific cell line for high (or low) caffeine production -- the cell lines vary widely with respect to caffeine biosynthesis!

We hope that the cell culture technique will allow us to isolate and

characterize the enzymes (Staba, 1978) catalyzing the production of caffeine, which may in turn lead to a better understanding of the mechanism regulating caffeine formation. It might then be possible to develop a low-caffeine or a caffeine-free coffee by manipulation of the gene(s) that control the production of the alkaloid. Our knowledge of caffeine metabolism is limited, but some clues are already available (Roberts and Waller, 1979).

Materials and Methods

Plant Materials for Primary Tissue Culture

Apical stems approximately 10 to 20 cm long were excised from two- to four-year-old *Coffea arabica* trees and used as primary explants. The trees were obtained as six-weeks-old seedlings from Plant Introductions of the USDA and have been maintained at the Oklahoma State University Horticulture Headhouse for the past four years. They were a high-yielding selection of coffee from Zaire (P.I. 392107) and from Ethiopia by way of Oeiras, Portugal which represented three hybrid stocks. These were developed in Portugal for specific disease resistance and have been distributed to Brazil, Colombia, and Costa Rica. Their P.I. numbers are 399420, CIF 2252/2, Hibrido de Timor, P.I. No. 399431, CIF H. 377/819/M (Caturro Vermelho) x H.W. 26/9 and P.I. No. 399436, CIF H. 473/13, 1637/36 (Caturro Amerelo) x H. 375/13.

Media and Culture Conditions

The tissue cultures were grown on our own modification of media used by Murashige and Skoog (1962), Staritsky (1970), and Baumann (1977).

Protocol for Tissue Culture on Solid Medium

The excised shoots were surface-sterilized in a saturated solution of calcium hypochlorite solution (4% W:V) for 20 minutes. The stems were rinsed twice in 50 ml sterile distilled water, one minute per rinse, and placed in a sterile 0.01% cysteine-HCl solution for 4 minutes. The sterilized stems were then placed in a sterile petri dish for handling. The oxidized ends of the shoots were removed with a scalpel and forceps, and the segments cut into pieces approximately one cm long. These pieces were aseptically transferred to tubes of media and incubated in the dark at 26°C.

Subculturing Callus Tissue

Vigorously growing callus was aseptically removed from the tubes of old media, divided into sections approximately seven mm square and these placed in fresh tubes of media. Subcultures were generally done at about sixty-day intervals.

Extraction of Caffeine from Callus and Media

The caffeine was extracted based upon a modification of the procedure of Frishnecht et al. (1977).

Results

The growth of callus tissue on the original plant is shown in Figure 1 representing primary cultures from 2-4 weeks old and a subculture at 4 weeks of age. The growth looks like a dumbbell at first but later the explant becomes fully covered by the solid callus much as reported by Frischnecht (1977). Most of the caffeine produced by the callus is excreted into the culture medium (Table 1). These results suggest that for the first 14 days little caffeine is produced as the explant adjusts to the culture medium. After this period, when callus growth is established, caffeine production begins and continues until it reaches a peak at about 60 days. The production then levels off, possibly because of the inhibitory effect of high concentrations of caffeine in the media, or because a steady state is reached between caffeine biosynthesis and caffeine biodegradation.

To determine whether the caffeine was localized in the medium, each tube was sliced horizontally into four equal layers, and each was analyzed for caffeine content. As Table 2 shows, there was little or no difference in the caffeine content among the layers indicating the easily diffusable properties of caffeine in an aqueous medium.

Caffeine Production

Caffeine formation parallels the increase of the sterile callus tissue growth. However, as the callus grows older, less caffeine is found in the tissue and more is excreted into the medium. This is shown in Table 3. The primary culture was analyzed after 30 and 42 days and showed a decrease in the amount of caffeine in the cells from 37 to 25% of the total caffeine. After subcultures-one, -two, and -three only 13% of the caffeine was found

to remain in the cells, the rest of the caffeine being excreted to the medium. The ratios of the total caffeine isolated (callus and media) to that in the original stem ranged from 20 to 77. These runs have been repeated several times and we consistently get ratios in excess of 50.

Table 4 shows the caffeine content ($\mu\text{m}/\text{mg}$) of callus tissue and media at various times after the primary culture. The ratio here ranges from 278 through 28 as the callus becomes older. However, we point out that 2 series of the (S_1) subculture showed a very high ratio of callus + media to the original stem. The average ratio in the last line was calculated by averaging the concentration of caffeine in $\mu\text{m}/\text{mg}$ tissue for callus of approximately the same age (each column) and dividing that number by 0.5, the concentration in $\mu\text{m}/\text{mg}$ tissue of the original stem.

The amount of caffeine produced by each culture was largely dependent upon how well the callus grew. Callus showing no growth, or production of a lot of polyphenolic compounds, evidenced by a light to dark brown color, produced much less caffeine than did cultures of white, vigorously growing callus. For example, series 9 and 10 might have been very high-caffeine-producing cell lines had we been able to subculture them, but because the callus did not grow well after the first subculture almost no caffeine was produced. Why series 3 produced such a high amount of caffeine after 6 months is difficult to explain -- it might be due to experimental error or to a regulatory mutation on the gene(s) controlling caffeine production. At any rate this finding needs further experimentation.

A summary of caffeine production by a few series of tissue cultures and subcultures (Table 5) allows comparisons to be made between series of about the same age and the same number of subcultures, or between one series and its successive subcultures. The percent caffeine/sample and caffeine concentration in $\mu\text{g}/\text{mg}$ tissue were fairly constant for the callus from the primary stem cultures, but varied widely for the subcultures. Again this could have been due in part to how well the callus grew after being subcultured or to the fact that we did not select for high caffeine production. The same conclusion may be drawn when different subcultures of the same stem series are compared. Callus from the primary culture series 10 contained a high percentage of caffeine

(results not shown) as did callus from the primary subcultures (S_{10}). In both cases callus growth was vigorous with little production of polyphenolic compounds. On the other hand, the secondary subcultures S_{210} did not grow well at all and this is reflected in the extremely low amount of caffeine produced. Series 12 showed fairly similar callus growth through two subcultures. Comparison of percent caffeine and caffeine concentration in $\mu\text{g}/\text{mg}$ tissue in callus from primary culture 12 and from secondary subculture S_{212} shows little difference between the two.

Discussion

The biochemistry of plant tissues in situ is often very different from that of rapidly proliferating tissues grown aseptically in vitro as cell or tissue culture. Waller et al. (1978) found some remarkable differences in concentrations of sterols and triterpenoids of Delphinium ajacis -- 0.4-0.6% in the whole plants and 8-10% in the sterile callus tissue culture. A very promising feature in the research now reported is that the amount of caffeine and other methylated xanthines produced by the sterile tissue culture cells is markedly elevated i.e., up to about 400 times as much as that of the whole coffee plant. By selecting coffee cell culture lines for high yields of caffeine, sterols, or other secondary metabolites, it may be possible to produce caffeine or another metabolite of choice in quantity. The tissue culture process has shown promise of providing drugs and chemicals now obtained by costly extraction of much slower growing plants. The stereospecific bioconversions by tissue cultures of some of the common cheaper precursors such as amino acids, mevalonic acid and sugars might be utilized to produce a desired metabolite, which could then be readily isolated. Production of natural plant products by cell culture techniques might improve their quality and uniformity.

Qualitatively the caffeine and dimethylxanthine contents of the tissues were similar enough to suggest that the normal biosynthetic pathway was being observed. Unidentified compounds were much more prevalent in the tissue culture than in the plant. This may be due to the degree of cellular organization and differentiation in the respective tissues and thus reflect the cellular metabolism associated with the plants physiological activity. The increased production of methylated

xanthenes and caffeine observed in cultured cells reveals a potential for modulation of production by controlling conditions to effect metabolism. These findings may provide opportunities for purine synthesis by using some of the intermediate compounds as reactants or by utilizing the biosynthetic capabilities of the tissue cultures for specific biotransformations. Caffeine as well as other compounds of secondary metabolites may be used in agriculture and industry and especially by the medical and pharmaceutical companies.

Acknowledgement

We are grateful to Dr. Otis C. Dermer for his critical comments on the manuscript. This research was supported in part by grant number PCM-78-23160 from the National Science Foundation.

References

- Barz, W. and Nicolas, H.-A. (1978) Metabolism and Degradation of Phenolics and Vitamins in Cell Cultures, Proc. 4th Inter. Cong. Plant Tissue Cell Culture (ed. Thorpe, T. A.), Univ. of Calgary Offset Printing Services, The Bookstore, University of Calgary, Alberta, Canada, pp. 345-352.
- Flow Laboratories Inc., Inglewood, Ca. 90302, Cat. No. 26-330-20.
- Frischkenecht, P. M., Baumann, T. W., and Wanner, H. (1977) Tissue Culture of Coffea arabica: Growth and Caffeine Formation, Planta Medica, 31, 344-350.
- Herman, E. B. and Haas, G. J. (1975) Clonal Propagation of Coffea arabica L. from Callus Culture, HortScience, 10, 588-589.
- Keller, H., Wanner, H., and Baumann, T. W. (1972) Caffeine in Fruits and Tissue Cultures of Coffea arabica, Planta, 108, 339-350.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures, Physiol. Plantarum, 15, 473-497.
- Sharp, W. R., Caldas, L. S., Crocomo, O. J., Monaco, L. C., and Carvalho, A. (1973) Production of Coffea arabica Callus of Three Ploidy Levels and Subsequent Morphogenesis, Phyton, 31, 67-73.
- Sondahl, M. R., Salisbury, J. L., and Sharp, W. R. (1979) SEM Characterization of Embryogenic Tissue and Globular Embryos During High Frequency Somatic Embryogenesis in Coffee Callus Cells, Z. Pflanzenphysiol., 94, 185-188.
- Staba, E. J. (1978) Products of Commercial Interest from Plant Cell Cultures, Proc. 4th Inter. Cong. Plant. Tissue Cell Culture (ed. Thorpe, T. A.), Univ. of Calgary Offset Printing Services, The Bookstore, University of Calgary, Alberta, Canada, pp. 476-477.
- Staritsky, G. (1970) Embryoid Formation in Callus Tissue of Coffee, Acta Bot. Neerl., 19, 509-514.
- Tabata, M., Ogino, T., Yoshioka, K., Yoshikawa, N. and Hiraoka, N. (1978) Selection of Cell Lines with Higher Yield of Secondary Products, Proc. 4th Inter. Cong. Plant Tissue Cell Culture (ed. Thorpe, T. A.), Univ. of Calgary Offset Printing Services, The Bookstore, University of Calgary, Alberta, Canada, pp. 213-222.
- Townsley, P. M. (1974) Production of Coffee from Plant Cell Suspension Cultures, J. Can. Inst. Food Sci. Technol., 7, 79-81.
- Van De Voort, F. and Townsley, P. M. (1974) A Gas Chromatographic Comparison of the Fatty Acids of the Green Coffee Bean, Coffea arabica and The Submerged Tissue Culture, J. Can. Inst. Food Sci. Technol., 7, 82-85.
- Waller, G. R., Mangiafico, S., Foster, R. C., and Lawrence, R. H., Jr. (1979) Sterols and Triterpenes of Delphinium ajacis: A Comparison of Whole Non-Sterile Plants vs. Sterile Callus Tissue Culture---A Possible Industrial Use, Proc. 11th Int. Symp. Chem. Nat. Prod., Golden Sands, Bulgaria, September, 1978, Vol. 4, No. 2, pp. 449-460.
- Waller, G. R. and Nowacki, E. K. (1978) Alkaloid Biology and Metabolism in Plants, Plenum Press, New York and London.

Zenk, M. H. (1978) The Impact of Plant Cell Culture on Industry, Proc. 4th Inter. Cong. Plant Tissue Cell Culture, (ed. Thorpe, T. A.), Univ. of Calgary Offset Printing Services, The Bookstore, University of Calgary, Alberta, Canada, pp. 1-13.

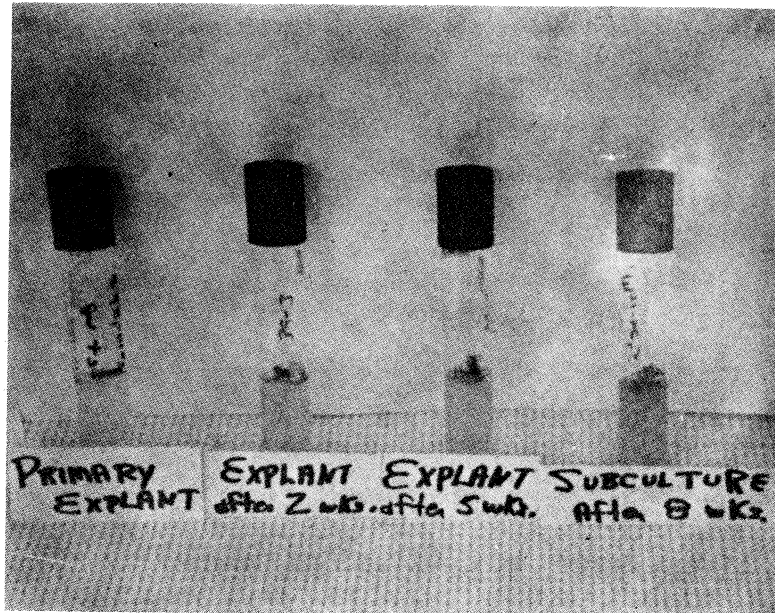


TABLE 1 AMOUNT OF CAFFEINE IN CALLUS TISSUE AND MEDIUM OF
PRIMARY C. ARABICA TISSUE CULTURES WITH RESPECT TO INCREASING CALLUS AGE

SAMPLE SOURCE	AGE (DAYS)	DRY WT. CALLUS (MG)	CAFFEINE PRODUCTION			PERCENT CAFFEINE (DRY WT. BASIS)	
			CALLUS (MG)	MEDIUM (MG)	TOTAL (MG)		
ORIGINAL STEM	-	380	0.04	-	0.04	0.01	
PRIMARY CULTURES	A	14	76	0.11	0.00	0.11	0.14
		28	257	0.15	0.43	0.94	0.36
		42	317	0.19	1.50	1.69	0.53
	B	56	503	1.56	5.33	6.94	1.38
	C	62	72	0.16	0.67	0.83	1.15
	D	74	899	1.23	6.16	7.39	0.32
	E	83	266	0.44	3.19	3.63	1.36

* CAPITAL LETTERS INDICATE THAT THE PRIMARY CULTURES ARE FROM DIFFERENT SERIES.

TABLE 2
TEST FOR LOCALIZATION OF CAFFEINE IN MEDIUM

SAMPLE	LAYER	FRESH WT (G)	No. OF TUBES	CAFFEINE EXTRACTED	
				TOTAL (µM)	MEDIA (µM)
PRIMARY	L 1	69.1	18 TUBES	2.2	32
SUBCULTURE FROM SERIES 4	L 2	72.3	18 TUBES	2.2	30
	L 3	76.9	18 TUBES	2.4	31
	L 4	61.4	18 TUBES	1.9	31

THE EXPERIMENT WAS REPEATED SEVERAL TIMES WITH SIMILAR RESULTS.

TABLE 3. CAFFEINE PRODUCTION BY STERILE CALLUS
TISSUE CULTURES OF *COFFEA ARABICA*

SERIES	Age (Days)		CAFFEINE PRODUCTION ¹ (µM/MG TISSUE)	RATIO OF CAFFEINE CONCENTRATIONS: CALLUS + MEDIA/ ORIGINAL STEM				
	UPON SUBCULTURE	TOTAL FROM DATE OF PRIMARY CELLS			ORIGINAL TISSUE	CALLUS ²	MEDIA	TOTAL (AVE)
ORIGINAL STEM	-	0	0.5	-	-	-	-	-
PRIMARY CULTURE	-	30	-	10.1	17.2	27.3	55	
PRIMARY CULTURE	-	42	-	7.9	24.4	32.2	64	
SUBCULTURE No. 1	42	84	-	5.1	33.6	38.6	77	
SUB-CULTURE No. 2	47	131	-	1.5	8.5	9.9	20	
SUB-CULTURE No. 3	58	189	-	3.0	21.4	24.4	49	

¹WEIGHTS OF TISSUE AND NUMBER OF TUBES OF MEDIUM ARE NOT SHOWN ; THEY VARY FROM 125-900 MG TISSUE AND 2-4 TUBES SAMPLE

²FIGURES CORRECTED FOR SAMPLES USED IN THE FOLLOWING SUBCULTURES

TABLE 4. CAFFEINE PRODUCTION ($\mu\text{M}/\text{MG}$ TISSUE) IN CALLUS TISSUE AT VARIOUS TIMES AFTER PRIMARY CULTURE

CULTURE SERIES	AGE (MONTHS) FROM DATE OF PRIMARY CULTURE					
	0	3	6	9	15	21
3	-	85.2 (0)*	304.5 (2)	0.0 (3)	-	-
4	-	88.5 (0)	38.0 (0)	0.0 (0)	-	-
9	-	370.1 (1)	0.3 (2)	0.0 (3)	-	-
10	-	409.2 (1)	5.8 (2)	0.0 (3)	-	-
11	-	57.2 (1)	3.66 (2)	0.0 (3)	-	-
14	-	39.6 (0)	24.2 (1)	43.9 (2)	25.6 (4)	2.5 (8)
15	-	22.6 (0)	7.8 (1)	34.1 (2)	19.1 (4)	25.6 (8)
23	-	38.6 (1)	24.4 (3)	-	-	-
AVERAGE RATIO: CALLUS + MEDIA ORIGINAL STEM	N/A	278	102	78	45	28

*NUMBER OF PASSAGES TISSUE HAS GONE THROUGH.

TABLE 5 CAFFEINE PRODUCTION BY STERILE CALLUS TISSUE CULTURES OF COFFEA ARABICA --- PERCENTAGE AND $\mu\text{G}/\text{MG}$ BASIS

SERIES No.	TYPE OF TISSUE	AGE (DAYS) CALLUS	DRY WT (MG)	CAFFEINE (MG)			CAFFEINE %	CAFFEINE $\mu\text{G}/\text{MG}$ DRY TISSUE
				CALLUS	MEDIA	TOTAL		
23	ORIGINAL	0	339	.065	N/A	.065	.019	1.92
24	STEM	0	405	.015	N/A	.015	.004	0.37
25		0	397	.025	N/A	.025	.006	0.62
6	CALLUS FROM PRIMARY CULTURE	54	583	2.13	6.25	8.38	1.4	14.4
9		54	418	1.00	6.89	7.89	2.1	21.7
12		58	137	1.36	1.71	3.07	2.3	22.6
S ₁ 10	CALLUS FROM PRIMARY SUBCUL.	65	162	.38	12.5	12.9	7.9	79.8
S ₁ 14		71	582	1.02	6.68	7.70	1.3	13.2
S ₂ 10	CALLUS FROM SECONDARY SUBCUL.	114	2994	.48	1.44	1.92	0.1	0.64
S ₂ 12		91	44	0.0	.97	.97	2.2	22.16
S ₂ 14		136	294	.13	2.38	2.51	0.9	8.54

ALLELOPATHIC CONSTITUENTS OF *COFFEA ARABICA* : CAFFEINE, DIMETHYLXANTHINES AND PLANT PHENOLICS

G. R. WALLER, C. H. CHOU

Department of Biochemistry

Oklahoma State University

Stillwater, Oklahoma 74078 U.S.A.

Allelopathy is a phenomenon in which a plant releases a toxic substance to the environment and thus produces a detrimental effect on other plants sharing the same habitat (Molisch, 1937). Muller (1966, 1974), Rice (1974), and Whittaker (1970) have each reviewed allelopathy and clearly stated that it is important in plant-plant interactions, formation of dominant vegetation, plant succession, and plant productivity. In recent years, many articles on allelopathy have appeared (Borner, 1971; Gliessman and Muller, 1978; Chou and Muller, 1972; Parker and Muller, 1979). However, there is almost a total lack of information regarding the allelopathic effect of *Coffea arabica*, one of the most important beverage plants for human beings. Allelopathic substances have been detected in coffee fruits, leaves, stems, and root tissues. Anaya et al. (1978) reported that the aqueous extracts of fresh, dried and roots of coffee plants exhibited allelopathic effect on weeds associated with coffee plantations in Coatepec, Southeast Mexico; however, none of the allelopathic compounds were identified. Now we report the nature of some allelopathic constituents present in coffee plant parts. This finding may clarify the part that allelopathy plays which we think is an important role in the development, productivity and longevity of coffee plantations through the world. This

research has been reported at several meetings and in several papers (Chou and Waller, 1979, 1980a,b; Waller and Chou, 1979a,b).

Methods and Materials

Materials

The fallen leaves, stems and roots of 2-year old coffee plants were obtained from the greenhouses of the Agricultural Experiment Station, Oklahoma State University, U.S.A., and young seedlings of about 10 cm in length were collected from the Kew Gardens, United Kingdom in 1977. This plant material was dried at room temperature and stored in a desiccator before using. Except as otherwise stated, all chemicals used in this study were purchased from the Sigma Company, U.S.A., and Dr. Bender-Dr. Hobein A.-G., Zurich, Switzerland, and solvents were obtained from the Burdick and Jackson Laboratories, U.S.A.

Bioassay of Extracts

In order to determine the phytotoxicity of the coffee tissue, a 5% aqueous extract of leaves or roots was bioassayed with lettuce (*Lactuca sativa* var. Great Lakes), rye grass (*Lolium multiflorum*) and

fescue (*Festuca* sp.) as test materials. Figure 1 describes the sponge bioassay technique which was used. Glass-distilled water served as a control. Before bioassaying, the extracts were adjusted to pH 7. In addition, the aqueous solutions of each (authentic) in a series of concentrations (100, 200, 300 and 400 ppm) were bioassayed with lettuce.

To identify the responsible allelopathic compounds present in the coffee tissues, the aqueous extracts were further extracted with chloroform and ethyl ether by two modified methods (Chou and Young, 1975). Fifty microliters (equivalent to about 0.125 g of dry plant material) of the ether.

Results and Discussion

Inhibitory Effects of Aqueous Extracts on Plant Growth

The aqueous extracts of the fallen leaves exhibit remarkable phytotoxic effects on the seed germination and radicle growth of all tested species, ranging from 41% to 100% inhibition for seed germination and 68% to 100% for radicle growth (Table 1). The root extract also revealed significant inhibition in these plants. Furthermore, the aqueous extracts in a series of concentrations (1%, 2%, 3%, 4%, and 5%) of fallen leaves, roots, stems, and young seedlings were also bioassayed with lettuce using the same techniques. Results expressed as % inhibition of distilled water control are shown in Figure 2, which indicates that when the extract concentration decreases the inhibition of both seed germination and radicle growth decreases. However, significant inhibition of radicle growth was still found in the 1% extract of young seedlings.

Next, the ether fraction of aqueous extract of fallen leaves was chromatographed, and chromatograms were bioassayed. These bioassay results (Figure 3) show that all chromatographic spots revealed significant inhibition on radicle growth except the segment of R_f 0.0-0.12. A similar pattern was also found by using rye grass as a test plant, but the inhibition was about 25% lower. These findings agree with those reported by Anaya et al. (1978) although the test plants for bioassay are different.

Identification of Allelopathic Constituents in *C. arabica*

Identification of phytotoxins was made by paper and thin-layer chromatography (TLC) and mass spectrometry (MS). The eluted unknown compounds were compared with authentic known ones as references and the allelopathic compound were identified (Table 2) and by mass spectrometry. These found in coffee tissue include caffeine, theobromine, theophylline, paraxanthine, scopoletin, and caffeic, chlorogenic, vanillic, ferulic, *p*-poumaric, and *p*-hydrobenzoic acids (Fig. 3). Table 3 compares the quantity of allelopathic substances in different parts of coffee plants found by the two extraction methods. Most of the phytotoxic substances appear in the ether fraction and only three compounds are found in the chloroform extracts. Among these compounds, caffeine is predominant (it was estimated to comprise more than 95% of the listed compounds), distributed in fallen leaves, roots, and young seedlings. Theobromine and theophylline are present in smaller amounts in extracts. However, paraxanthine, now reported in coffee tissues for the first time, was found only in the young seedlings, which suggests that the methyl transferases leading to the formation of caffeine (Roberts and Waller, 1979) may be capable of acting on the substrate of choice. The other allelopathic compounds (phenolics) found are widely distributed in the plant kingdom (Rice, 1974; Whittaker, 1970; Muller, 1974). Scopoletin has been reported as an allelopathic compound in the germ plasm of *Avena* cultivars (Fay and Duke, 1977). Evidently different metabolic processes may occur during the growth of coffee plants; more caffeine and related compounds are produced in young plants, and more phenolics accumulated in the mature stage. Of course caffeine is abundant in the fruit, particularly during senescence. It is reasonable that most waterborn phytotoxins are phenolic in nature, and they are frequently reported (Borner, 1971; Chou and Patrick, 1976; Chou and Lin, 1976; McPherson et al. 1971). However, it is also ecologically significant that some alkaloids, such as caffeine, are water-soluble and have not been previously reported as allelopathic compounds. Of course, not all caffeine-related compounds are phytotoxic; for example, some alkaloid precursors such as indole derivatives, purines, and nicotinic acid are powerful growth stimulators (Waller and Nowacki 1978). Alkaloids as well as other water-soluble compounds may be leached out of

plants by ecological processes and tend to accumulate in the soil.

Inhibitory Effects of Aqueous Solutions of Known Compounds

To clarify the phytotoxic effect of these compounds, aqueous solutions of each alkaloids (authentic) in a series of concentrations (100, 200, 300, and 400 ppm) were bioassayed with lettuce. Results (Table 4) show that the listed compounds exhibit significant phytotoxicity on the radicle growth at a concentration below 100 ppm. To our knowledge, the four alkaloids have not previously been reported as allelopathic. The phytotoxicity of scopoletin and chlorogenic, caffeic, ferulic, vanillic, *p*-coumaric, and *p*-hydroxybenzoic acids for lettuce has been previously reported by McPherson et al. (1971), Rice (1974), and Fay and Duke (1977).

Since 1832, when De Candolle first pointed out that plant-plant interactions occur in many crops, allelopathic study has been increasingly conducted by plant ecologists. Detailed experiments might clarify the mechanism of allelopathic action at the biochemical level. From the allelopathic point of view, young coffee seedlings may produce enough phytotoxic alkaloids and release them to the soil to suppress the growth of weeds competing with them; however, an autointoxication phenomenon may occur in the coffee plantations where allelopathic compounds accumulate in soil (Anaya et al., 1978). It has been observed that coffee plantations become less productive with age. Similarly, in Taiwan it is observed that tea plantations become less productive after a certain number of years. It may be that these two closely related plants (and other plants that produce caffeine) share the same problem, and that allelopathy plays a significant role in coffee and tea plantations throughout the world.

Acknowledgements - The authors wish to thank Dr. J. K. McPherson for supplying authentic phenolic compounds and Mrs. Cheryl Cumberland for technical assistance. The senior author also acknowledges the National Science Council, Taiwan, R.O.C. for support of his Sabbatical Leave of Absence from the Institute of Botany, Academia Sinica, and Department of Botany, National Taiwan University, Taiwan.

REFERENCES

- Anaya, A. L., del Amo, S., Roy-Ocotla, G., and Ortiz, L. M. 1978. Allelopathic potential of a coffee plantation. p. 8 (Abstract). 2nd Int. Cong. Ecol. Jerusalem, Israel.
- Borner, H. 1971. German research on allelopathy, pp. 52-57, in *Biochemical Interactions Among Plants*. National Academy of Sciences, Washington, D. C.
- Chou, C. H., and Chung, Y. T. 1974. Allelopathic potential of *Miscanthus floridulus*. Bot. Bull. Academia Sinica 15:1427.
- Chou, C. H., and Lin, H. L. 1976. Autointoxication mechanism of *Oryza sativa* I. Phytotoxic effects of decomposing rice residues in soil. J. Chem. Ecol. 2:353-367.
- Chou, C. H., and Muller, C. H. 1972. Allelopathic mechanism of *Arctostaphylos glandulosa* var. *zacaensis*. Am. Midl. Nat. 88:324-347.
- Chou, C. H., and Patrick, Z. A. 1976. Identification and phytotoxic activity of compounds produced during decomposition of corn and rye residues in soil. J. Chem. Ecol. 2:369-387.
- Chou, C. H., and Young, C. C. 1975. Phytotoxic substances in twelve subtropical grasses. J. Chem. Ecol. 1:183-193.
- Chou, C. H., and Waller, G. R. (1979) Allelopathic Constituents of *Coffea arabica*. Fed. Proc. 38, 825, 63rd Annual Meeting, Dallas, Texas, April 1-10.
- Chou, C. H. and Waller, G. R. (1980a) Isolation and Identification by Mass Spectrometry of Phytotoxins in *Coffea arabica*. Bot. Bull. Academia Sinica, 21, 25-34.
- Chou, C. H. and Waller, G. R. (1978b) Allelopathic constituents of *Coffea arabica*, J. Chem. Ecol., IN PRESS.
- Fay, P. K., and Duke, W. B. 1977. An assessment of allelopathic potential in *Avena* germ plasm. Weed Sci. 25:224-228.
- Gliessman, S. R., and Muller, C. H. 1978. The allelopathic mechanism of dominance in bracken (*Pteridium aquilinum*) in southern California, J. Chem. Ecol. 4:337-362.

- Harborn, J. B. 1973. Phytochemical Methods. Chapman and Hall, London, pp. 33-88.
- McPherson, J. K., Chou, C. H., and Muller, C. H. 1971. Allelopathic constituents of chaparral shrub Adenostoma fasciculatum. Phytochemistry 10:2925-2933.
- Molisch, H. 1937. Der Einfluss einer Pflanze auf die ander-Allelopathie, Fischer, Jena. Muller, C.H. 1966.
- Muller, C. H. 1966. The role of chemical inhibition (allelopathy) in vegetational composition. Bull. Torrey Bot. Club 93:332-351.
- Muller, C. H. 1974. Allelopathy in the environmental complex. pp. 73-85, in B. R. Strain and W. D. Billings (eds.) Vegetation and Environment. Dr. W. Junk B. V. Publishers, The Hague.
- Parker, V. T., and Muller, C. H. 1979. Allelopathic dominance by a tree-associated herb in a California annual grassland. Oecologia (Berl.) 37:315-320.
- Rice, E. L. 1974. Allelopathy. Academic Press, New York and London, 353p.
- Roberts, M. F., and Waller, G. R. 1979. N-Methyltransferases and 7-methyl N-nucleoside hydrolase activity in Coffea arabica and their biosynthesis of Caffeine. Phytochemistry 18:451-455.
- Waller, G. R. and Chou, C.-H. (1979a) Identification and Mass Spectrometry of Phytotoxins in Coffea arabica. 26th Annual Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Seattle Washington, June 3-8, Paper No. FAMOB8.
- Waller, G. R. and Chou, C.-H. (1979b) Allelopathic Constituents of Coffea arabica: Caffeine, Dimethylxanthines and Plant Phenolics, 19th Annual Meeting of the Phytochemical Society of North America, Northern Illinois University, DeKalb, Illinois August, 12-15.
- Waller, G. R. 1968. Description of the Oklahoma State University combination mass spectrometer-gas chromatograph. Proc. Okla. Acad. Sci. 47:271-292.
- Waller, G. R., and Dermer, O. C. 1979. Biochemical Application of Mass Spectrometry, First Supplemental Volume. 1278pp + xvii, Wiley-Interscience, N.Y.
- Waller, G. R. and Nowacki, E. K. 1978. Alkaloid Biology and Metabolism in Plants. Plenum Publisher, N.Y. pp. 143-182.

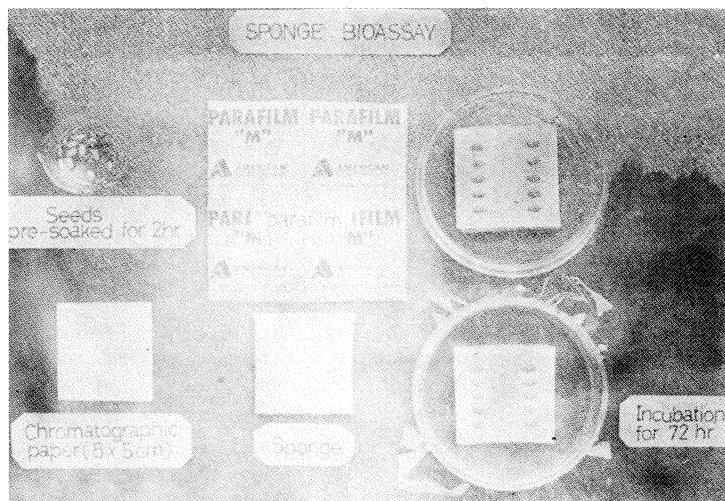


FIG. 1. SPONGE BIOASSAY TECHNIQUE

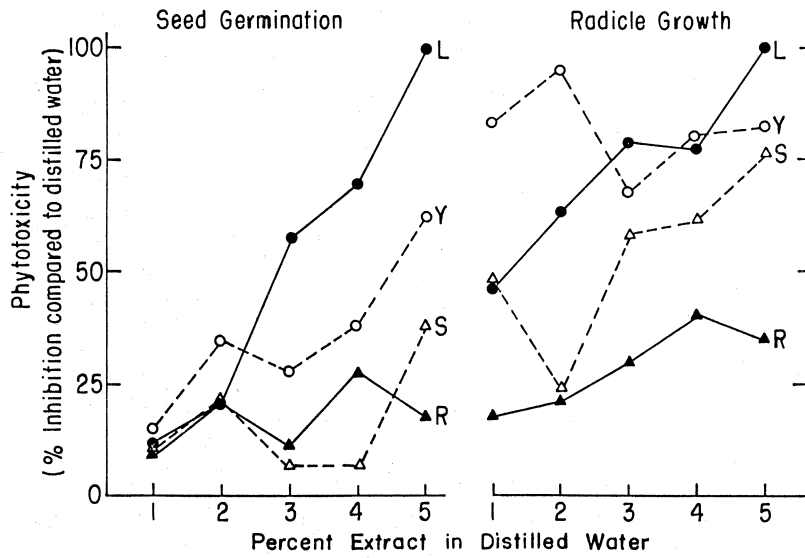


FIG. 2. INHIBITORY EFFECTS OF AQUEOUS EXTRACTS OF COFFEE PLANTS PARTS IN A SERIES OF CONCENTRATION ON GERMINATION AND RADICLE GROWTH OF RYE GRASS. THE EXTRACTS WERE OBTAINED FROM FALLEN LEAVES (L), STEMS (S), ROOTS (R), AND YOUNG SEEDLINGS (Y).

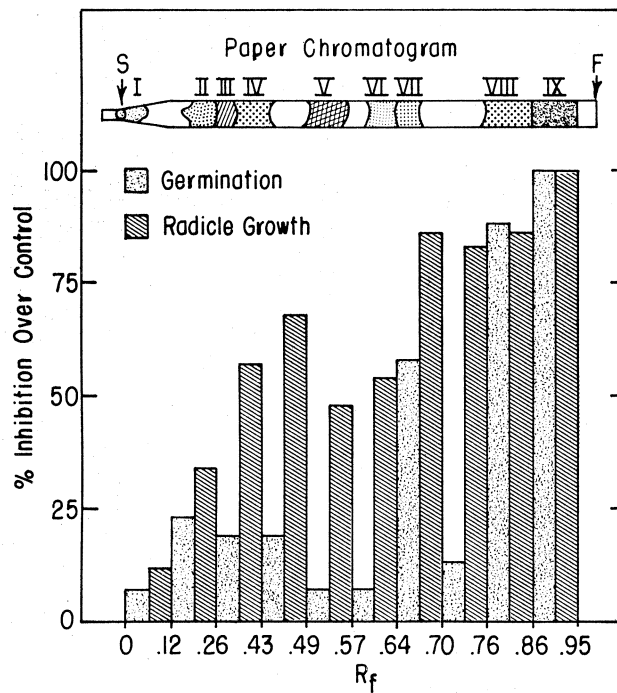
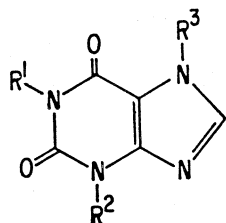


FIG. 3. LOCATION OF COMPOUNDS ON PAPER CHROMATOGRAM AND RELATIVE PHYTOXICITY TO LETTUCE SEED GERMINATION AND RADICLE GROWTH OF COMPOUNDS FOUND IN THE ETHER FRACTION OF AQUEOUS EXTRACT OF FALLEN COFFEE LEAVES. THE CORRESPONDING R_f SEGMENT OF DEVELOPED PAPERS WITH OR WITHOUT SPOTTING WAS USED AS TEST AND CONTROL, RESPECTIVELY. THE PHYTOXICITY IS EXPRESSED AS % INHIBITION OF CONTROL. LEGENDS SHOWN ON CHROMATOGRAM ARE I: UNKNOWN, II: CAFFEIC ACID + UNKNOWN(S), III: CAFFEIC ACID, FERULIC ACID + UNKNOWN(S), IV: P-COUMARIC ACID + UNKNOWN(S) V: VANILLIC ACID, VI: P-HYDROXYBENZOIC ACID, VII: UNKNOWN, VIII: CAFFEINE + UNKNOWN, IX: UNKNOWN, S: SPOTTING POINT, AND F: SOLVENT FRONT. THE PAPER STRIP WAS DEVELOPED WITH 2% ACETIC ACID.

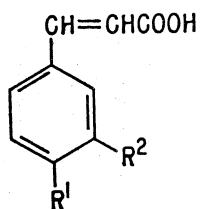


$R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$ Caffeine

$R^1 = R^2 = \text{CH}_3, R^3 = \text{H}$ Theophylline

$R^1 = R^3 = \text{CH}_3, R^2 = \text{H}$ Paraxanthine

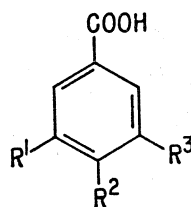
$R^2 = R^3 = \text{CH}_3, R^1 = \text{H}$ Theobromine



$R^1 = R^2 = \text{OH}$ Caffeic acid

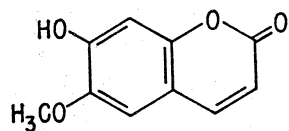
$R^1 = \text{OH}, R^2 = \text{H}$ *p*-Coumaric acid

$R^1 = \text{OH}, R^2 = \text{OCH}_3$ Ferulic acid

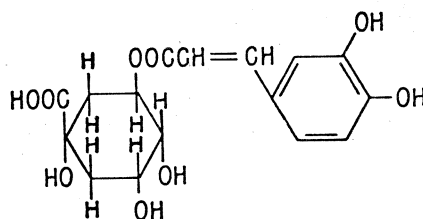


$R^1 = R^3 = \text{H}, R^2 = \text{OH}$ *p*-Hydroxybenzoic acid

$R^1 = \text{H}, R^2 = \text{OH}, R^3 = \text{OCH}_3$ Vanillic acid



Scopoletin



Chlorogenic acid

FIG. 4. - THE CHEMICAL STRUCTURE OF ALLELOPATHIC COMPOUNDS PRESENT IN COFFEE PLANT PARTS.

TABLE 1. INHIBITORY EFFECTS OF A 5% AQUEOUS EXTRACT OF COFFEE LEAVES AND ROOTS ON SEED GERMINATION AND RADICLE GROWTH OF LETTUCE, RYE GRASS, AND FESCUE

	LETTUCE		RYE GRASS		FESCUE	
	GERMINATION	GROWTH	GERMINATION	GROWTH	GERMINATION	GROWTH
	(%)	(MM)	(%)	(MM)	(%)	(MM)
DISTILLED WATER (CONTROL)	63	22	97	22	70	26
LEAF EXTRACT	9 (100) ^A	0 (100) ^B	57 (41)	26 (63) ^B	26 (63)	9(68) ^B
ROOT EXTRACT	50 (21)	7 (68) ^B	93 (4)	9.6 (56) ^B	53 (25)	20(23) ^B
STATISTICAL VALUE (F)	37.7 ^B		18.7 ^B		14.2 ^B	

A: DATA IN PARENTHESIS INDICATES THE PERCENT OF INHIBITION USING DISTILLED WATER AS A CONTROL.

B: STATISTICAL SIGNIFICANCE AT 1% (F = 10.9) LEVEL.

TABLE 2. IDENTIFICATION OF PHYTOTOXINS PRESENT IN *C. ARABICA*^A

COMPOUND	PAPER CHROMATOGRAPHY				THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY				
	R _F	S ^{UV}	1 ^{UV}	DPNA	R _F		S ^{UV}	1 ^{UV}	VISIBLE
	(2% HOAC)				A	B			
CAFFEIC ACID	0.30	BL F	YEL F	YEL-BR	0.04	0.12	AB	BL F	OR-YEL
CHLOROGENIC ACID	0.56	BL F	BL F	-	0.00	0.00	AB	BL F	YEL
FERULIC ACID	0.30	BL F	BL F	SKY-BL	0.15	0.71	AB	BL F	YEL
SCOPOLETIN	0.40	BL F	S BL F	YEL-BR	0.50	0.52	BL F	S BL F	YEL-BR
P-HYDROXYBENZOIC ACID	0.62	AB	-	RED	0.13	0.40	AB	-	-
P-COUMARIC ACID	0.43	AB	-	DK-BL	0.26	0.13	AB	-	-
VANILLIC ACID	0.51	AB	-	VIOLET	0.17	0.17	AB	AB	-
CAFFEINE	ND	ND	ND	ND	0.51	0.28	AB	-	-
THEOBROMINE	ND	ND	ND	ND	0.30	0.14	AB	-	-
THEOPHYLLINE	ND	ND	ND	ND	0.33	0.24	AB	-	-
PARAXANTHINE	ND	ND	ND	ND	0.23	0.14	AB	-	-

A. THE ABBREVIATIONS ARE DESCRIBED AS FOLLOWS:

S^{UV} = 2537 NM, 1^{UV} = 3660 NM, DPNA = DIAZOTIZED P-NITROANILINE FOLLOWED BY 20% Na₂CO₃,

A = CHLOROFORM-METHANOL (90:10, v/v), B = ACETIC ACID-CHLOROFORM (10:90, v/v), BL = BLUE,

F = FLUORESCENCE, AB = ABSORPTION, YEL = YELLOW, OR = ORANGE, BR = BROWN, S = STRONG,

ND - NOT DETECTABLE

TABLE 3. QUANTITATIVE COMPARISON OF PHYTOTOXINS IN YOUNG SEEDLINGS, FALLEN LEAVES, AND ROOTS OF *C. ARABICA*^A

	YOUNG SEEDLINGS		FALLEN LEAVES		ROOTS	
	C ^B	E	C	E	C	E
PURINE ALKALOIDS						
CAFFEINE	+++++ ^C	+++++	+++	+++	+	-
THEOBROMINE	+	+	+	+	+	-
THEOPHYLLINE	-	+	-	+	-	-
PARAXANTHINE	-	+	-	-	-	-
PHENOLIC COMPOUNDS						
CAFFEIC ACID	+	++	+	++	+	+
CHLOROGENIC ACID	-	+	-	-	-	-
FERULIC ACID	-	+	-	+	-	-
SCOPOLETIN	-	+	-	+	-	-
P-HYDROXYBENZOIC ACID	-	-	-	+	-	+
P-COUMARIC ACID	-	-	-	++	-	-
VANILLIC ACID	-	-	-	+	-	-

A ALL COMPOUNDS WERE IDENTIFIED BY PAPER CHROMATOGRAPHY, TLC, AND MS.

B C: EXTRACTED WITH CHLOROFORM, E: ETHER FRACTION OF AQUEOUS EXTRACT

C -(ABSENCE), + (PRESENCE), ++ (MORE THAN 250 µG/G SAMPLE), +++ (ABOUT 1000 µG/G SAMPLE), ++++ (ABOUT 3000 µG/G SAMPLE); ALL SAMPLES ON DRY WEIGHT BASIS.

TABLE 4. INHIBITORY EFFECTS OF 4 ALKALOIDS IN AQUEOUS SOLUTION ON RADICLE GROWTH OF LETTUCE AFTER 48 HR AT 25°C

COMPOUND	PHYTOTOXICITY				STATISTICAL VALUE (F)
	(% INHIBITION COMPARED TO DISTILLED WATER)				
	CONCENTRATION (PPM)				
	100	200	300	400	
DISTILLED WATER (CONTROL)	0	0	0	0	
CAFFEINE	54	78	90	84	101.3 ^A
THEOBROMINE	41	51	32	64	10.2 ^A
THEOPHYLLINE	58	69	81	76	76.1 ^A
PARAXANTHINE	62	66	66	85	40.9 ^A

A: STATISTICAL SIGNIFICANCE BELOW 1% (E = 6.0) LEVEL.

CELL-FREE METABOLISM OF CAFFEINE IN *COFFEA ARABICA*

G. R. WALLER, T. SUZUKI

Biochemistry Department,
Oklahoma State University,
Stillwater, Oklahoma 74078, U.S.A.

M. F. ROBERTS

Department of Pharmacognosy,
The School of Pharmacy,
University of London,
2939 Brunswick Square, London WC1N 1AX, U.K.

Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) is synthesized from the same precursors utilized for purine and methyl group synthesis in other systems [1-3]. Among the methylated xanthines, 7-methylxanthine and theobromine (3,7-dimethylxanthine) have been reported as precursors of caffeine [4,5]. However the pathway leading to 7-methylxanthine is less obvious, but recent work [5,6] strongly supports the view that ring formation in caffeine follows the classical scheme for purine nucleotide biosynthesis [7]. As compared to intact plants and callus tissue from coffee and tea plants, cell free systems are advantageous for study since the direct proof for the involvement of S-adenosyl-L-methionine and the sequence of methylations of the purine ring can only be obtained by the use of such systems. Recent work with cell free extracts from tea leaves proves that S-adenosyl-L-methionine functions there as methyl donor and that the biosynthesis of caffeine occurs via 7-methylxanthine and theobromine [8]. We show that active cell free extracts may be prepared from coffee fruits and callus tissue cultures and the S-adenosyl-L-methionine N-methyltransferase and N-methyl-N-nucleoside hydrolase activity of these preparations has been investigated and compared with the activity of the tea leaf extracts. Portions of this study have been reported earlier [9-11].

Xanthine cannot serve as the direct precursor of the caffeine purine ring [5,8-12]. Tea plants catabolize xanthine to urea and CO₂ by the same pathways of xanthine catabolism observed in animals [12]. Tea leaf extracts produce allantoin and urea from xanthine [8]. We also show that extracts from coffee berries and callus tissue cultures possess the same enzymatic activity.

EXPERIMENTAL

Plant material

Unripe coffee fruits at various stages from petal fall, were obtained from King's College, University of London, the Royal Botanic Gardens, Kew and Oklahoma State University. Experiments in which ¹⁴CH₃-L-methionine was fed to detached coffee fruits were performed in situ and material for the preparation of cell free systems was collected and transported packed in solid CO₂. These berries were stored at -20° until required.

Callus tissue culture: High caffeine yielding callus tissue culture was used [13]. The callus was stored at -20° until required.

Preparation of Tissue Extracts for Enzyme Assays

Green coffee fruits or callus tissue cultures were pulverised in a mortar in the presence of solid CO₂ and liquid N₂. The resulting powder was rapidly added to previously hydrated Polyclar AT and stirred in an atmosphere of N₂ for 30 min. The Polyclar AT was hydrated by allowing it to stand 20 min in extracting buffer I (200 M phosphate pH 7.3, 0.5% ascorbate, 5 mM 2-mercaptoethanol and 5 mM EDTA). The Polyclar AT was subsequently removed by squeezing the slurry through cheesecloth followed by centrifugation at 38,000 g for 15 min. The supernatant (25 ml) was placed on a Sephadex G-25 column (1.5 x 30 cm) and eluted with buffer II (50 mM phosphate pH 7.3, 2 mM 2-mercaptoethanol; 2 mM EDTA). The first 20 ml of protein solution were collected for use as the enzyme preparation.

Assay for N-methyltransferase

Enzyme activity was measured using an assay based on the transfer of a ¹⁴C-labelled methyl group from S-adenosyl-L-methionine (SAM) to the appropriate xanthine to produce theophylline, theobromine and caffeine. The standard assay mixture contained substrate (1 mg/ml) 30 µl; MgCl₂ (3 mM) 10 µl; ¹⁴CH₃-SAM (1.45 mCi/mMole) 20 µl (final conc. 1.4 x 10⁻⁵ M) enzyme inhibitor (if any) 10 µl; enzyme solution 20 µl and 50 mM Tris buffer pH 8.5 to 100 µl. The reaction was carried out in Eppendorf tubes with pre-incubation at 30° for 5 min. The reaction was initiated with the enzyme and terminated with 10% HCl (200 l) after an incubation period of 10 min at 30°. Controls consisted of samples with boiled enzyme or minus enzyme.

Isolation of the reaction products

The xanthines were extracted from the acidified incubation mix with CHCl₃ (1 ml + 2 x 0.5 ml). The appropriate carrier xanthine (5 µg) was added and the solutions taken to dryness. Then xanthines were separated using TLC on prepared aluminum backed Silica Gel G/F₄₅₀ plates; solvent system CCHCl₃:MeOH (9:1); visualisation was by UV. The appropriate xanthine product was cut out from the TLC plate and placed in a scintillation vial with EtOH 1 ml and 10 ml of scintillation fluid (P.P.O. 12.5 g dimethyl/POPOP 0.75 g in toluene 2.5 l). The radioactivity was determined and hence the amount of product formed could be deduced.

Experiments showed no loss of caffeine on vacuum drying at 50° and therefore these samples were dried in this manner before further processing at Oklahoma State University. The caffeine was isolated using the methods of Frischnecht, Baumann and Wanner [14] and TLC and radioactivity measurements were made essentially according to Looser, Baumann and Wanner [5].

Cell-free synthesis of urea from xanthine

This was detected by the same reaction mixture described for N-methyltransferase, with the exception that xanthine-2-¹⁴C (48 mCi/mMole) was used instead of ¹⁴CH₃-S-adenosyl methionine. The reaction products were identified by co-chromatography on Whatman 3MM paper with standard allantoin, allantoin acid and urea in solvents (a) N-BuOH: AcOH: H₂O (4:1:1, by vol.) 2nd (b) N-PrOH: 0.1% NH₄OH (2:1). Standard compounds were visualized by their reaction with Ehrlich reagents.

Determination of protein

This was determined using the method of Lowry *et al.* [15]. A unit of protein was taken as 1 mg.

Results and Discussion

Isolation of N-methyltransferase

The preparation of active cell free extracts was only possible with the use of Polyclar AT and rigorous exclusion of oxygen as described in the experimental. It was also essential to remove phenolic materials rapidly by gel filtration. The protein content of the resulting extracts was low (3 mg/ml) and this in part was responsible for the extreme lability of the methyltransferase. Similar preparations were made with young coffee seedlings but in these the formation of caffeine was not detectable and only very low activity was present in partially ripe fruits.

N-Methyltransferase activity in cell free preparations was detected by using S-adenosyl-L-[¹⁴CH₃]-methionine as the methyl donor and the dimethylxanthines, theobromine, theophylline and paraxanthine, as acceptor since all three can be utilized in caffeine formation [8] Table 1 shows that only cell free extracts from the young green coffee fruits contained significant activity, as was expected from the incorporation of L-methionine by the whole fruits. Assays in which boiled protein

solution or no protein were used showed no activity. The results given in subsequent sections are from at least three separate experiments with duplicates. Two preparations were made from the green coffee fruits, the interval between the preparations being three months. These gave similar results. A combination of TLC and radiography was used for the separation and identification of the ^{14}C -labelled methylxanthines. After incubation with the enzyme solution it was shown that the radioactivity transferred from S-adenosyl-L- $^{14}\text{CH}_3$ -methionine occurred only in the appropriate product (depending on the substrate used) and that this activity was only slightly increased by Mg^{2+} (10%).

Properties of the coffee berry N-methyltransferase catalysing caffeine synthesis

The effect of time and enzyme concentration. The rates of formation of theobromine and caffeine from 7-methylxanthine and theobromine respectively were found to be linear with time up to at least 7 min and was proportional to the amount of enzyme solution added (up to at least 186 μg protein per assay) under the conditions of the standard assay described in the experimental.

Stability of methyltransferase activity. The enzyme extracts lost 50% of their activity over a period of 1 hr at 4° , though this rapid loss in activity could be reduced if enzyme solutions were fortified with bovine serum albumin protein (BSA) 3 mg/ml. It was found however that enzyme solutions stored in liq. N_2 with or without the BSA fortification and with BSA addition would withstand 3-4 thawings before significant (50%) loss of activity was observed. It was therefore possible to carry out most of the experiments on methyltransferase activity on the same preparation. However the green fruits harvested and immediately frozen with solid CO_2 kept well at -20° and subsequent preparations with these fruits made over a period of six months showed similar activity. It was thus possible to harvest fruits at a time of maximum methyltransferase activity and have active material available over a period of time far in excess of the short natural period of high methyltransferase activity.

pH profile of methyltransferase activity. The pH optimum in 50 mM Tris Buffer at 30° appeared sharply at 8.5 with both 7-methylxanthine and theobromine as substrate.

Effect of inhibitors on methyltransferase activity. Table 2 illustrates the action of inhibitors on the enzyme activity. Significant inhibition by thiol reagents was observed, p-chloromercuribenzoic acid (pCMB) being the most effective. Some inhibition was observed with NaN_3 (10 mM) and KCN (100 mM). However KCN (10 mM) while inhibitory for the methylation of 7-methylxanthine, appeared slightly to stimulate the methylation of theobromine. Some slight inhibition was also observed with azouracil. EDTA had no effect on activity which would imply that there is no absolute requirement for metal ions.

Substrate specificity of methyltransferase. To learn whether these pathways of caffeine biosynthesis in coffee fruits were similar to those found in tea leaves [8], the further methylation of a series of methylxanthines was investigated. The results in Table 3 show that 1-methylxanthine produced theophylline and 7-methylxanthine produced theophylline and 7-methylxanthine produced only theobromine. As with tea leaf extracts 8 paraxanthine was the most active of the dimethylxanthines, the formation of caffeine being $1\frac{1}{2}$ times that for the formation of caffeine from theobromine. However, the formation of paraxanthine from 1-methylxanthine was low and that from 7-methylxanthine was not detectable, so that paraxanthine is probably not a normal precursor of caffeine *in vivo*. The synthesis of theophylline from 1-methylxanthine is slow, as is the synthesis of caffeine from theophylline. Unlike the situation with tea leaf extracts [8] the synthesis of theobromine from 7-methylxanthine is lower than the synthesis of caffeine from theobromine.

Investigation of the utilization of xanthine, hypoxanthine, xanthosine and 7-methylxanthosine showed that of the substrates only 7-methylxanthosine could act as a substrate for theobromine formation with coffee fruit cell tree extracts, thus indicating the presence of an active 7-methyl-N nucleoside hydrolase. Like the leaf disc experiments of Looser *et al.* [5], these results would support "Pathway II" of coffee biosynthesis proposed by Ogutuga and Northcote [4] in which methylation occurs at N-7 of guanine in a polynucleotide and subsequently 7-methylguanylic acid is transformed via 7-methylguanosine to 7-methylxanthosine, which is converted via a 7-methyl-N nucleoside hydrolase to 7-methylxanthine and subsequently to caffeine (Fig. 1).

Furthermore, the fact that theophylline in coffee cell free extracts is formed from 1-methylxanthine rather than 3-methylxanthine corresponds with the findings with tea cell-free extracts [8] and thus substantiates the view [5] that the biosynthesis of the theophylline from xanthine via 3-methylxanthine is unlikely.

Effect of substrate concentration on methyltransferase activity. The rate of production of theobromine and caffeine was measured at various concentrations of 7-methylxanthine, theobromine, paraxanthine and S-adenosyl-L-methionine. The rate of production of theobromine at various concentrations of 7-methylxanthine and S-adenosyl-L-methionine were determined from the Lineweaver-Burke plot. The Km values for 7-methylxanthine and S-adenosyl-L-methionine were 0.2 mM and 0.01 mM respectively. Similarly the Km values for theobromine and S-adenosyl-L-methionine were 0.2 mM and 0.01 mM respectively, and for paraxanthine and S-adenosyl-L-methionine 0.07 mM and 0.01 mM. These are summarized in Table 4.

These results differ significantly from those recorded for tea cell free extracts [8] in that the concentration requirement for the methylated xanthine substrate is lower by a factor of 10. However, as with tea methyltransferase activity, estimations of the apparent Km values are the same for theobromine and caffeine formation, although these could change with further purification. The two reactions have similar pH optima and there is little difference in their behaviour with inhibitors hence the question of whether one or two separate enzymes are involved in caffeine synthesis remains unsolved. Although the preliminary feeding experiments suggested that theobromine might be an inhibitor at high concentration and thus regulate the formation of caffeine, increasing the concentration of this substrate by a factor of 100 had no inhibitory effect in the cell free extracts. Similarly additions of caffeine to a concentration of 10 mM had no effect on caffeine formation. It must be assumed therefore that these methylxanthines inhibit protein synthesis rather than enzyme activity.

Experiments with extracts from callus tissue cultures.

Extracts prepared from callus tissue cultures also exhibited N-methyltransferase and N-methyl-N⁹-nucleoside hydrolase activities, and they have similar

characteristics to the enzymes obtained from green coffee berries. The results indicated that callus tissue cultures of *C. arabica* can form caffeine in an identical manner to that observed in green coffee berries (Fig. 1).

Cell-free synthesis of urea from xanthine.

Xanthine was totally inactive as a methyl acceptor (Table 3). In contrast, the extracts from coffee berries and callus tissue cultures were able to produce urea from xanthine when xanthine-2-¹⁴C was incubated with coffee berry or callus tissue culture extracts in 50 mM Tris buffer at 30°C for 60 min. The product formed from xanthine-2-¹⁴C was identified as urea by paper chromatography in solvents (a) and (b) (Fig. 2). The results are comparable with those obtained from the tea-leaf extracts [8].

General metabolism of caffeine

A proposed metabolic (biosynthetic and biodegradation) pathway [5, 6, 8, 10, 16-21] of purines in coffee and tea plants and its relationship to caffeine is shown in Figure 3. We agree with the findings made by Looser *et al.* [5] that methylation of free nucleotides rather than that of free nucleic acids are likely to be the first compounds to be methylated in the biosynthesis of caffeine. The source of the purine ring of caffeine must be demonstrated *in vitro* and that the presence of methylated purine nucleotides be shown to occur in coffee and tea plants. Paraxanthine is known to be the most effective precursor of caffeine while theophylline is less active; an attractive hypothesis is that they may be derived from nucleic acid breakdown which depends upon the observation that methylation of nucleic acids occurs in tea leaves (*in vitro* and *in vivo*) of N-1 of adenine in tRNA [17]. Paraxanthine has recently been found in young coffee seedlings [18].

Biodegradation of caffeine to form CO₂ was shown by Kalberer [19, 20] and Baumann and Wanner [21]. They showed that coffee plants degrade caffeine to xanthine which is further metabolized yielding allantoin, allantoic acid, urea and finally CO₂. We have shown in this study that the coffee plant is similar to the tea plant in the metabolism of xanthine [8, 12].

Acknowledgments

The authors wish to thank the Royal

Botanic Gardens, Kew, and the Department of Plant Sciences, Kings College, London University, for supplying coffee fruits. T. S. thanks Kyoto Kogei-Seni Daigaku, Japan for granting Leave of Absence, part of which was spent at Oklahoma State University. We acknowledge the partial support of the National Science Foundation, Grant No. PCM-78-23160.

References

1. Anderson, L. and Gibbs, M. (1962) J. Biol. Chem., 237, 1941.
2. Preusser, E. and Sarenkov, G. P. (1963) Biokhimiya, 28, 857.
3. Inoue, T. and Adachi, F. (1962) Chem. Pharm. Bull., 10, 1212.
4. Ogotuga, D. B. A. and Northcote, D. H. (1970) Biochem. J., 117, 715.
5. Looser, E., Baumann, T. W. and Wanner, H. (1974) Phytochemistry, 13, 2515.
6. Suzuki, T. and Takahashi, E. (1976) Phytochemistry, 15, 1235.
7. Buchanan, J. M. and Hartman, S. C. (1959) Adv. Enzymol., 21, 199.
8. Suzuki, T. and Takahashi, E. (1975) Biochem. J., 146, 87.
9. Waller, G. R., Roberts, M.F., Wanner, H. and Baumann, T. W. (1977) Abst. Paper presented at the 20th West Central States Biochemical Conference, Kansas State University, Manhattan, Kansas, November 4-5.
10. Roberts, M. F. and Waller, G. R. (1979) Phytochemistry, 18, 451.
11. Waller, G. R. and Roberts, M.F. (1979) Abst. Paper presented at the 19th Phytochemical Society of North America, Northern Illinois University, De Kalb, Illinois, August 12-15.
12. Suzuki, T. and Takahashi, E. (1975) Biochem. J., 146, 79.
13. Waller, G. R. and Cumberland, C. (1980) Paper presented at the Ninth International Colloquium on the Science and Technology of Coffee, London, June.
14. Frischnecht, P. M., Baumann, T. W. and Wanner, H. (1977) Planta Medica, 31, 344-350.
15. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem., 193, 265-275.
16. Suzuki, T. and Takahashi, E. (1977) Drug Metab. Rev., 6, 213.
17. Suzuki, T. and Takahashi, E. (1976) Biochem. J., 160, 171, 181.
18. Chou, C.-H. and Waller, G. R. (1980) Bot. Bull. Academia Sinica, 21, 25.
19. Kalberer, P. (1964) Ber. Schweiz. Bot. Ges., 74, 62.
20. Kalberer, P. (1965) Nature, 205, 597.
21. Baumann, T. W. and Wanner, H. (1972) Planta, 108, 11.

TABLE 1. THE FORMATION OF CAFFEINE FROM DIMETHYLBENZYLXANTHINES BY CELL FREE EXTRACTS OF COFFEE SEEDLINGS AND BERRIES USING S-ADENOSYL-L- l - 14 C $_2$ H $_3$ IMETHIONINE AS METHYL DONOR^A

	CPM	
	THEOBROMINE	PARAXANTHINE
COFFEE SEEDLINGS	-	-
GREEN COFFEE BERRIES	5223	190
RED/YELLOW PARTIALLY RIPE COFFEE BERRIES	36	7
		154

^ATHE COMPLETE SYSTEM CONTAINED SUBSTRATE (0.5 MG/ML) 30 μ L; MgCl $_2$ (3 mM) 10 μ L; S-ADENOSYL-L- l - 14 C $_2$ H $_3$ IMETHIONINE 1.4 M CI/MOLE) 20 μ L (FINAL CONC. 1.4 x 10 $^{-4}$ M) ENZYME SOLUTION (62 μ G PROTEIN) 20 μ L; 50 mM TRIS BUFFER PH 8.5 TO 100 μ L, SAMPLES WITHOUT MgCl $_2$ SHOWED A 10% REDUCTION IN ACTIVITY. CONTROL SAMPLE EITHER WITH BOILED ENZYME OR MINUS THE SUBSTRATE HAD NO DETECTABLE ACTIVITY. INCUBATION WAS FOR 60 MIN AT 30 $^{\circ}$.

TABLE 2. THE EFFECT OF INHIBITORS ON METHYLTRANSFERASE ACTIVITY IN GREEN COFFEE BERRIES^A

mM CONCENTRATION OF INHIBITOR, mM	% ACTIVITY	
	7-METHYLBENZYLXANTHINE	THEOBROMINE
NO INHIBITOR	100	100
P-CMB (0.5)	0	0
(0.05)	70	70
IODOACETATE (100)	0	0
(10)	21	11
NaN $_3$ (10)	61	78
(1)	90	84
KCN (100)	12	26
(10)	56	133
AZOURACIL (1)	72	100
(0.1)	80	82
N-METHYLMALDEIMIDE (1)	0	100
(0.1)	83	100
EDTA (5)	94	100
(0.5)	100	100

^ACOFFEE BERRY ENZYME EXTRACT (20 μ L 62 μ G PROTEIN) WAS PRE-INCUBATED 5 MIN AT 300 WITH THE COMPLETE INCUBATION MIX MINUS S-ADENOSYL-L-METHIONINE PLUS THE INHIBITOR AT THE CONCENTRATIONS INDICATED AND THEN THE ACTIVITY WAS MEASURED UNDER STANDARD ASSAY CONDITIONS.

TABLE 3. SUBSTRATE SPECIFICITY OF METHYLTRANSFERASE.

SUBSTRATE mM	METHYLATED PRODUCT	n-KATALS	RELATIVE METHYLATION %
7-METHYLXANTHINE 1.5	THEOBROMINE	7.6	79
3-METHYLXANTHINE 1.5	-	-	-
1-METHYLXANTHINE 1.5	THEOPHYLLINE	133	4.5
THEOBROMINE 1.5	CAFFEINE	6.2	100
THEOPHYLLINE 1.5	CAFFEINE	169	3.6
PARAXANTHINE 1.5	CAFFEINE	4.0	138
XANTHINE 1.5	-	-	-
HYPOXANTHINE 1.5	-	-	-
XANTHOSINE 1.5	-	-	-
7-METHYL-XANTHOSINE 1.5	THEOBROMINE	99.0	6.1

THE COMPLETE SYSTEM CONTAINED SUBSTRATE (0.5 MG/ML) 50 μ L MgCl₂ (3mM) 10 μ L; S-ADENOSYL-L-[¹⁴CH₃] METHIONINE (1.4 Ci/MMOLE) 20 μ L (FINAL CONC. 1.4x10⁻⁴M) ENZYME SOLUTION (62 μ G PROTEIN) 20 μ L 50mM TRIS BUFFER PH 8.5 TO 100 μ L. INCUBATION WAS AT 30^o FOR 10 MIN. A UNIT OF PROTEIN IS TAKEN AS 1 MG. WITH THE SUBSTRATES XANTHINE, HYPOXANTHINE AND XANTHOSINE INCUBATION WAS FOR 60 MIN.

TABLE 4. EFFECT OF SUBSTRATE CONCENTRATION ON METHYLTRANSFERASE ACTIVITY

FORMATION OF THEOBROMINE

SUBSTRATE	K _M VALUE
7-METHYLXANTHINE	0.2 mM
S-ADENOSYL-L-METHIONINE	0.01 mM

FORMATION OF CAFFEINE

SUBSTRATE	K _M VALUE*
THEOBROMINE (3,7-DIMETHYLXANTHINE)	0.2 mM
S-ADENOSYL-L-METHIONINE	0.01 mM
<hr/>	
PARAXANTHINE	0.07 mM
S-ADENOSYL-L-METHIONINE	0.01 mM

* RESULTS DIFFER SIGNIFICANTLY FROM THOSE RECORDED FOR TEA CELL FREE EXPERIMENTS BY SUZUKI AND TAKAHISHI (1975).

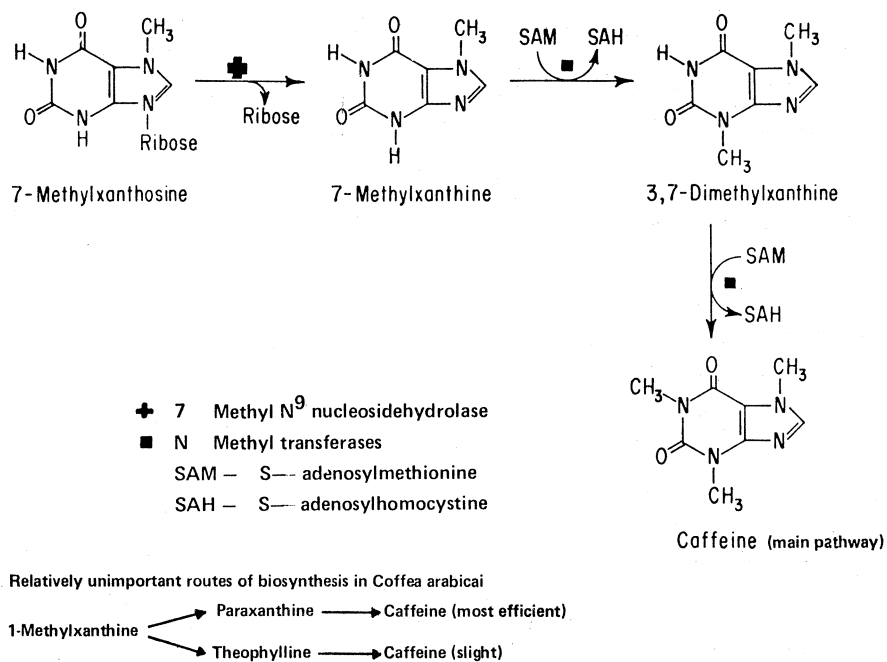


Figure 1. Formation of caffeine from 7-Methylxanthosine in *Coffea arabica* plants.

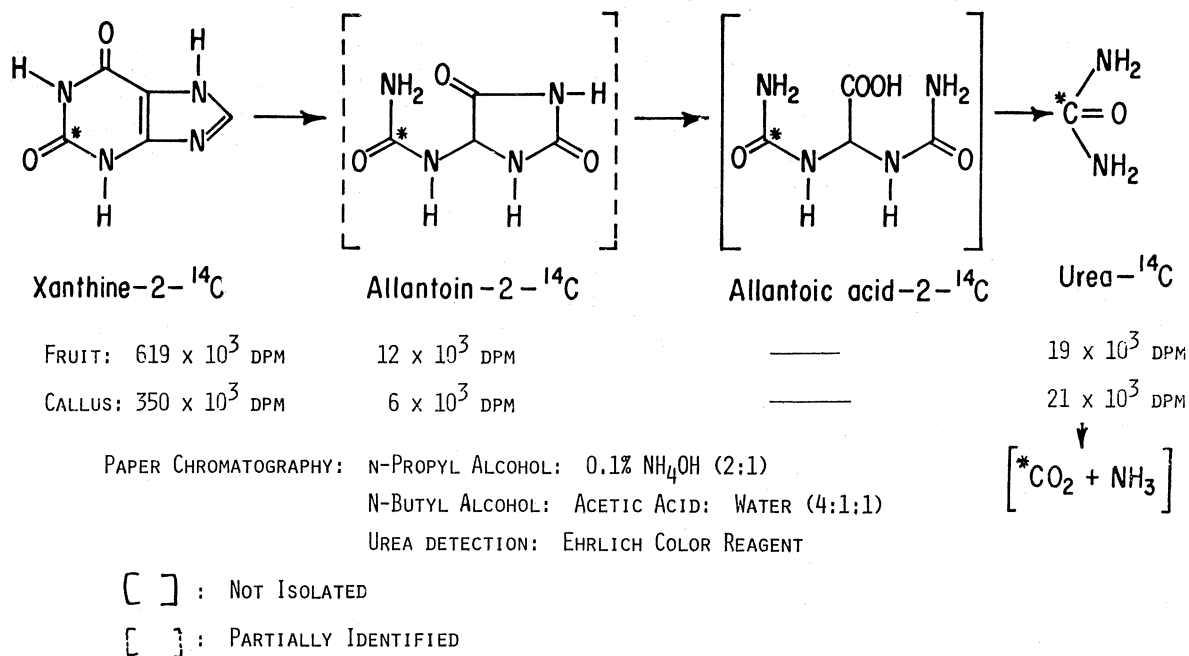


FIGURE 2. CELL-FREE BIOSYNTHESIS OF UREA FROM *COFFEA ARABICA*: SMALL GREEN FRUIT AND STERILE CALLUS TISSUE CULTURE

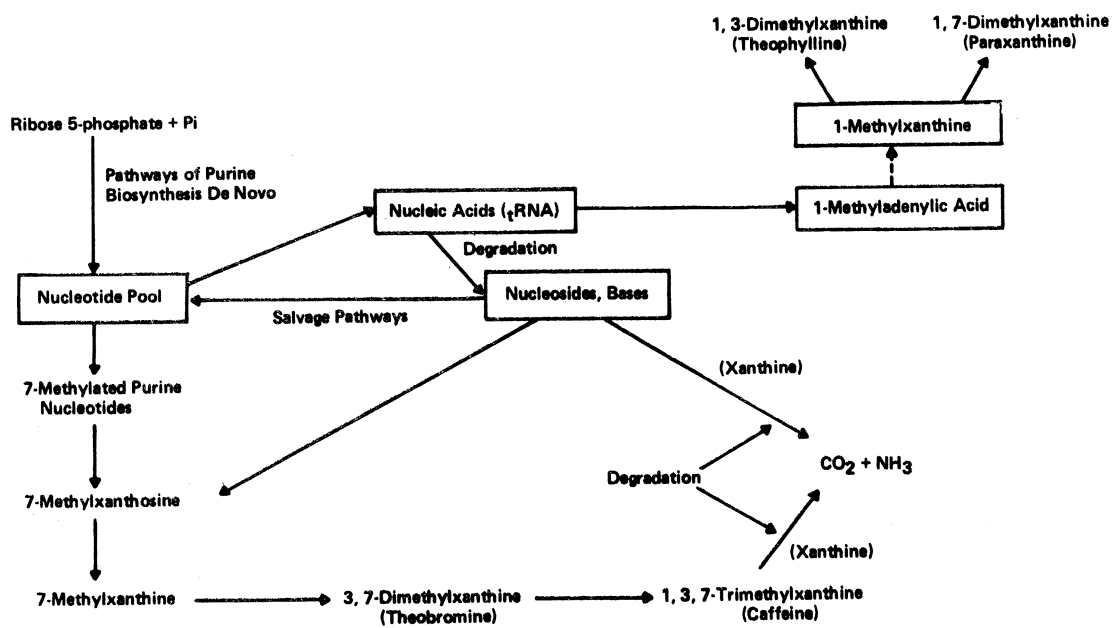


FIGURE 3. POSSIBLE METABOLISM OF PURINES IN COFFEE AND TEA PLANTS AND ITS RELATION TO CAFFEINE

INFLUENCE DES ENGRAIS SUR L'ARCHITECTURE ET LA CROISSANCE DU CAFÉIER ROBUSTA

J. SNOECK

Chef de la Division d'agronomie

Centre de recherches de l'IFCC en Côte d'Ivoire

Ph. de REFFYE

Génétiicien

Centre de recherches de l'IFCC en Côte d'Ivoire

01 B.P. 1827, Abidjan 01

Introduction

Le rendement d'un caféier dépend de deux facteurs principaux la "fertilité" des fleurs (pourcentage d'ovules transformés en grains) et la "capacité de production" qui englobe à la fois toutes les caractéristiques d'architecture et de croissance (de REFFYE et SNOECK). Le premier auteur a mis au point un modèle mathématique simulant la croissance et l'architecture du Coffea robusta. L'application de ce modèle à des caféiers cultivés avec ou sans engrais devrait permettre de déceler la part de chacun des facteurs du rendement sur les augmentations de production enregistrées grâce aux apports d'azote.

Matériel et méthode

En 1971, sur la station centrale de recherches agronomiques de Divo, un essai factoriel NP à 3 niveaux a été planté en 4 répétitions avec 3 clones sélectionnés. Un premier cycle de récolte a donné de bonnes augmentations de production grâce aux apports de sulfate d'ammoniaque. Le recépage des vieilles tiges est intervenu en décembre 1977 après la récolte. La production 1978 vient des tire sève et celle de 1979, des nouveaux rejets. Ces deux premières récoltes du second cycle confirment l'efficacité des engrais azotés (Tableau I).

TABLEAU I

Productions du clone 182, essai D6 à Divo,
kg de café marchand/ha.

	Premier cycle		Second cycle		% de Fo
		Cumul 5 ans 1973-1977	Tire-sève 1978	1979	
Sans engrais	: FO	10.426	257	1.600	-
60 unités N/ha	: F1	15.435	290	2.106	32
120 unités N/ha	: F2	15.685	356	2.589	62

Les deux autres clones, 107 et 197, ont également répondu favorablement aux engrais (augmentations respectives de 35 % et de 42 % pour F1 sur le premier cycle), mais seul le clone 182 a été retenu pour la présente étude, parce qu'il a déjà fait l'objet de plusieurs années de mesures dans l'essai B 11 sur la Station de recherches de Bingerville. Grâce à ces mesures, de REFFYE a pu calculer les équations caractérisant l'architecture de ce clone et il suffit d'une série de mesures à un instant T donné pour pouvoir refaire le graphe permettant l'estimation du nombre de noeuds plagiotropes (totaux, feuillus et fructifères) que porte le caféier à l'instant T choisi.

Une première série de mesures a été faite le 20 novembre 1978, soit 10 mois après le démarrage des nouveaux rejets, sur les 10 caféiers de chaque parcelle élémentaire dans les 4 blocs. On a fait les observations suivantes :

tronc : hauteur et nombre de noeuds.

plagiotrope de rang 5) : longueur, nombre de noeuds,
plagiotrope de rang 10) nombre de feuilles.
plagiotrope de rang 15)

Il n'y avait pas de fruits à cette époque puisque les troncs n'étaient âgés que de 10 mois. On n'a donc que le développement végétatif des nouveaux troncs.

Une seconde série de mesures a été faite le 10 août 1979. On a compté le nombre de noeuds des troncs, le nombre de noeuds totaux des plagiotropes de rangs 3,6,9,12,15,18, 21,24,27,30, ainsi que le nombre de noeuds portant des feuilles et des fruits.

Ces comptages permettent d'avoir une image précise du développement des caféiers, image qui devrait être en relation étroite avec les productions figurant au tableau I.

Analyse de la croissance des caféiers 11 mois après le recépage

Le tableau II indique les résultats des mesures et des analyses de variance. L'essai est disposé en 4 répétitions. La parcelle élémentaire comprend 10 caféiers. Chaque donnée représente la moyenne de 40 mesures par traitement sans engrais (F0) ou avec engrais (F1 et F2). Il y a peu d'écarts significatifs dans la croissance des caféiers. Seuls sont significatifs :

- nombre de noeuds sur le tronc (F1 + 12,6 %, F2 + 14,4 %)
- hauteurs des troncs (F1 + 11,4 %, F2 + 17,7 %)
- longueurs des plagiotropes de rang 5 (F1 + 4,5 %, F2 + 9,3 %).

TABLEAU II

Croissance du clone 182, essai D6 à Divo

Mesures du 20/11/1978, 10 mois après le démarrage des nouveaux troncs.

	T R O N C S		PLAGIOTROPES 5		noeuds avec feuilles		PLAGIOTROPES 10		PLAGIOTROPES 15		Nbre plagio absentes		
	Haut.	Nbre noeuds	Long. entre-noeuds cm	Long.	Nbre total	noeuds avec feuilles	Long.	Nbre total	Long.	Nbre total		Nbre noeuds avec feuilles	
F0	175 b	17,4 b	10,1	39,6 b	4,9	4,7	73,8	9,4	8,5	93,4	11,4	9,6	4/10
F1	195 a	19,6 a	9,9	41,4ab	5,0	4,8	80,0	10,1	9,6	97,9	12,4	10,8	0,8/10
F2	206 a	19,9 a	10,4	43,3 a	5,0	4,8	76,5	9,8	9,2	95,1	11,9	11,0	0,2/10
Seuil de signification	P = 0,02	P = 0,05	NS	P = 0,05	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Coef. de variation	5,2 %	6,0 %	3,6 %	3,4 %	1,7 %	2,8 %	5,2 %	4,4 %	5,9 %	4,5 %	8,9 %	11,8 %	125 %

classement : a > b

L'allongement des troncs et des plagiotropes grâce aux apports d'azote n'a pas d'influence évidente sur la productivité des caféiers, par contre l'augmentation du nombre de noeuds sur le tronc est favorable puisqu'elle implique un plus grand nombre de plagiotropes.

On constate parallèlement qu'à partir du quinzième rang de plagiotropes, il y a plus de branches non développées chez le témoin que chez les caféiers recevant des engrais. La différence n'est pas significative à cause de la très grande variation observée. Mais cette variation provient uniquement des parcelles témoins comme le montre le tableau III.

TABLEAU III. Nombre de branches non développées en % sur le noeud 15 du tronc âgé de 10 mois.

		: FO : sans engrais	F1	F2
Blocs	1	80	10	0
	2	20	10	10
	3	0	0	0
	4	60	10	0
Moyennes		40	8	2

La mesure du développement des troncs 11 mois après le recépage permet déjà d'entrevoir une des causes de la meilleure productivité des caféiers recevant des engrais. Les mesures plus détaillées, faites 9 mois plus tard, en août 1979 corroborent cette première impression et permettront de traduire graphiquement les différences observées.

Analyse de la croissance des caféiers 20 mois après le recépage (troncs âgés de 19 mois)

Sur les mêmes caféiers, on a compté en août au stade de remplissage des fruits:

- nombre de noeuds sur un orthotrope.
- nombre de noeuds totaux, à feuilles et à fruits sur les plagiotropes de rangs 3,6,9,12,15,18,21,24,27,30 à partir du sommet.

Les données sont résumées dans le tableau IV. Celui-ci montre l'influence significative de l'azote sur le nombre d'étages de l'axe orthotrope : augmentation de 5,1 % à la dose 1 et augmentation de 9,8 % à la dose 2. Pour les plagiotropes l'azote provoque l'apparition d'un noeud supplémentaire sur les branches complètement développées des arbres recevant 60 kg/ha et de deux noeuds supplémentaires pour 120 kg/ha. Ceci se traduit par un effet significatif favorable sur le nombre de feuilles (N Fe) aux étages 15, 18 et 21 à partir du sommet. Aux étages inférieurs 24, 27, 30, cet effet favorable persiste, mais est masqué par une variation plus grande d'arbre à arbre, surtout chez les témoins sans engrais (FO). Il en va de même pour les noeuds à fruits (N Fr). Il y a augmentation significative aux étages 15 et 18. Les accroissements aux autres étages ne sont plus significatifs à cause de la grande variabilité chez les arbres témoins. Cette variabilité traduit un fonctionnement médiocre et irrégulier des noeuds fructifères sur ces arbres.

Calcul du nombre total de noeuds plagiotropes, de noeuds à feuilles et de noeuds fructifères

Etant donné que la croissance du caféier peut être assimilée à une fonction continue et régulière au niveau mensuel et étant donné qu'il a été montré (de REFFYE et SNOECK) qu'il n'y a pas de différence majeure entre un rameau de l'étage N(i) et un rameau de l'étage N(j), on peut considérer les rameaux plagiotropes d'étages successifs comme un seul et même rameau plagiotrope déphasé d'un laps de temps Δt , qui correspond à l'intervalle de temps nécessaire pour former un étage plagiotrope à l'instant T.

Connaissant cet intervalle et la fonction de croissance du rameau standard, on peut calculer le nombre de noeuds plagiotropes à n'importe quel niveau du caféier et même dessiner le graphe d'un caféier.

A partir des mesures et des comptages, il est donc possible de reconstituer chacun des rameaux plagiotropes du caféier, d'en déterminer le nombre de noeuds, de noeuds à feuilles et de noeuds à fruits. Ceci a été fait pour chaque traitement et donne les courbes suivantes représentées dans les graphiques 1,2,3.

TABLEAU IV. Croissance du clone 182, essai D6 à Divo
 Mesures du 10 août 1979, 20 mois après recépage.
 (troncs âgés de 19 mois).

	FO	F1	F2
	sans engrais	60 kg N/ha	120 kg N/ha
TRONCS			
Nombre d'étages	27,4	28,8	30,1
% de FO	-	5,1	9,8
Classement (P=0,05)	(b)	(ab)	(a)
(Coef. variat. 3,4 %)			
PLAGIOTROPES			
Noeuds totaux sur branches matures	15,6	16,8	17,6
Noeuds par étage	<u>NFe</u> <u>NFr</u>	<u>NFe</u> <u>NFr</u>	<u>NFe</u> <u>NFr</u>
Etages			
3	3,3 0	3,5 0	3,4 0
6	7,6 0	7,5 0	8,0 0,1
9	11,8 0,6	11,0 0,5	12,1 1,0
12	14,3 4,8	13,4 5,1	14,3 5,3
15	12,9xx(b) 6,8x(b)	14,3(a) 7,6(ab)	15,2(a) 8,7(a)
18	10,2xx(b) 8,6x(b)	12,9(a) 8,8(ab)	13,2(a) 10,0(a)
21	7,9x(b) 9,8	10,4(ab) 10,3	12,2(a) 10,9
24	6,0 10,0	7,1 11,0	9,0 11,6
27	3,8 6,7	3,8 9,8	6,6 10,3
30	- -	- -	5,4 9,4
PLAGIOTROPES NON DEVELOPPES			
Etages			
15	0 %	0 %	2,5 %
18	5,0 %	0 %	0 %
21	12,8 %	0 %	7,5 %
24	19,5 %	5,0 %	12,8 %
27	42,0 %	36,5 %	23,1 %
30	-	-	69,0 %

Analyses statistiques :

NFe : Noeuds à feuilles : écarts significatifs du 15 ème au 21 ème étage

Coefficients de variation :

étage 15 : 4,1 %
 étage 18 : 3,9 %
 étage 21 : 15,3 %

NFr : Noeuds à fruits : écarts significatifs aux étages 15 et 18, avec coefficients de variation de 9,4 % et 7,2 % respectivement.

Développement des rameaux plagiotropes

Nombre de noeuds (N_p) en fonction de l'âge de l'étage (graphique 1)

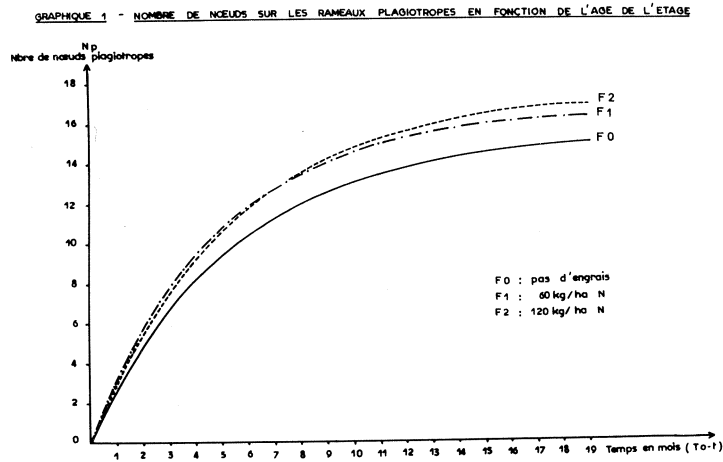
$$F0 : N_p = 15,6 (1 - e^{-0,183 (T_0 - t)}) - 0,20 \quad r = 0,93$$

$$F1 : N_p = 16,8 (1 - e^{-0,204 (T_0 - t)}) + 0,04 \quad r = 0,98$$

$$F2 : N_p = 17,6 (1 - e^{-0,184 (T_0 - t)}) + 0,07 \quad r = 0,96$$

où $T_0 = 19$ mois et $(T_0 - t)$ est l'âge auquel est formé un plagiotrope.

Photo 1.



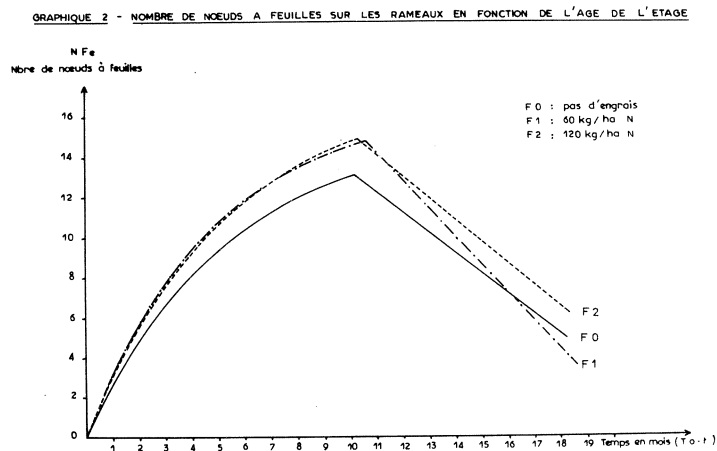
Nombre de noeuds à feuilles (N_{Fe}) en fonction de l'âge de l'étage, pour $(T_0 - t) > 10$ mois, car les branches de moins de 10 mois portent des feuilles sur tous les noeuds (graphique 2).

$$F0 : N_{Fe} = -1,02 (T_0 - t) + 23,5 \quad r = 0,99$$

$$F1 : N_{Fe} = -1,41 (T_0 - t) + 29,8 \quad r = 0,98$$

$$F2 : N_{Fe} = -1,09 (T_0 - t) + 26,1 \quad r = 0,99$$

Photo 2



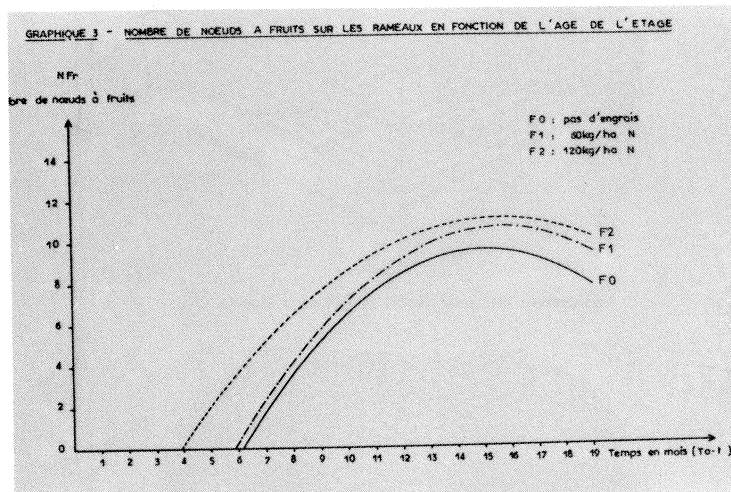
Nombre de noeuds à fruits (NFr) en fonction de l'âge de l'étage (graphique 3).

$$FO : NFr = - 0,118 (To-t)^2 + 3,57 (To-t) - 17,46 \quad r = 0,98$$

$$F1 : NFr = - 0,110 (To-t)^2 + 3,45 (To-t) - 16,42 \quad r = 0,99$$

$$F2 : NFr = - 0,081 (To-t)^2 + 2,52 (To-t) - 8,54 \quad r = 0,98$$

Photo 3



Les ajustements avec les valeurs observées sont tous excellents, puisqu'elles sont significatives au seuil de 1 % (sauf F1-NFe qui est significatif à 1 %).

L'examen des courbes et des graphiques montre clairement l'effet de l'engrais sur le nombre de noeuds fructifères. Par contre, il n'y a pas d'effet sensible sur la longévité des feuilles qui commencent à tomber vers le dixième mois pour les trois traitements.

En tenant compte du pourcentage de bourgeons extra-axillaires qui ne se sont pas développés en rameaux plagiotropes, on peut déterminer le nombre de noeuds totaux, à feuilles et à fruits que portaient les caféiers à 19 mois. Il suffit de faire le compte pour chaque étage en vie.

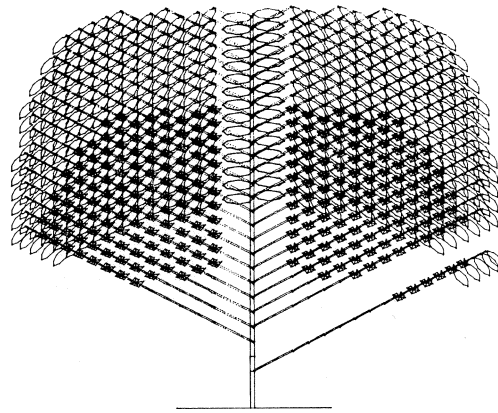
Cela donne :

	: FO : sans engrais	F1 60 kg/ha N	% FO	F2 120 kg/ha N	% FO
Noeuds totaux	: 271	343	26	336	24
Noeuds à feuilles	: 210	260	24	265	26
Noeuds à fruits	: 119	151	27	170	43
Productions kg/ha	: 1.600	2.106	32	2.589	62

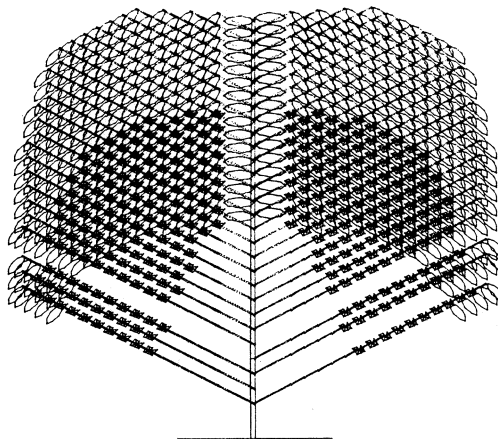
On peut conclure que les surcroûts de récolte sont dus pour une part importante au plus grand nombre de noeuds fructifères produits par les arbres en réponse aux apports d'engrais.

Simulation et graphe des caféiers à 19 mois

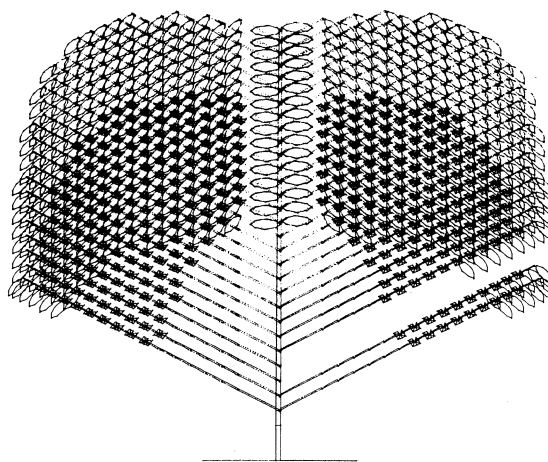
Un programme de construction graphique du caféier à partir de ces courbes de croissance a été mis au point afin de mieux visualiser l'influence de l'engrais sur l'architecture de l'arbre. Le caféier est tracé en deux dimensions avec des entre-noeuds de longueur conforme aux mesures. L'emplacement des feuilles et des fruits est schématisé par des symboles alpha numériques. Les graphiques obtenus avec le micro ordinateur H.P 9825 et sa



Architecture du clone Robusta 182 sans engrais (F_0)



Architecture du clone Robusta 182
avec engrais, dose 1 (F_1)



Architecture du clone Robusta 182
avec engrais, dose 2 (F_2)

table traçante reproduisent à un entre-noeud près sur chaque étage plagiotrope, les caractéristiques mesurées. On distingue la zone feuillue qui est limitée par l'extrémité des branches et par l'âge de la feuille. La cinétique de croissance du bourgeon plagiotrope de type amortie donne à la zone feuillue sa forme caractéristique.

On distingue encore la zone fructifère qui chevauche partiellement la zone feuillue. La zone fructifère est limitée apicalement par l'âge trop jeune des bourgeons floraux et basalement par l'épuisement des stocks de ces bourgeons.

On remarque que certaines branches manquent au pied de l'arbre. Ceci est dû à l'inhibition fréquente du démarrage des premiers primaires (voir tableau IV).

La géométrie de l'arbre est ainsi reconstituée. On s'aperçoit alors directement que l'engrais exerce son influence surtout par la formation d'une zone fructifère plus étendue qui correspond à un développement végétatif plus important de l'arbre.

Conclusion

Les mesures et comptages faits sur les caféiers de l'essai de dose à Divo ont permis de mettre en évidence une bonne relation entre la récolte enregistrée et la croissance des troncs et des branches primaires. Les apports d'engrais augmentent significativement le nombre total de noeuds fructifères, conséquence de l'accroissement du nombre d'étages sur le tronc et du nombre de noeuds sur les rameaux plagiotropes.

La représentation graphique et la simulation mathématique sur ordinateur des courbes de croissance permettent de bien visualiser l'influence de l'engrais sur l'architecture des arbres et les paramètres responsables du surcroît de production.

Bingerville, le 9 Avril 1980

BIBLIOGRAPHIE

- REFFYE (Ph de), SNOECK (J) : Modèle mathématique de base pour l'étude et la simulation de la croissance et de l'architecture du Coffea robusta. Café Cacao Thé (Paris) Vol 20, n°1, 1976, p.11-32.
- SNOECK (J), DUCEAU (P) : Essais d'engrais minéraux sur Coffea Canephora en Côte d'Ivoire: Production et rentabilité. Café Cacao Thé (Paris) Vol. 22, n°4, 1978, p. 285-302.

GENETIC IMPROVEMENT OF COFFEE TRANSFER OF FACTORS FOR RESISTANCE TO *HEMILEIA VASTATRIX* BERK. & BR. INTO HIGH YIELDING CULTIVARS OF *COFFEA ARABICA* L.

A. J. BETTENCOURT, J. LOPES, I. L. GODINHO

Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro

2780 Oeiras, Portugal

Introduction

Since the beginning of this century that efforts have been made in several coffee experimental centers aiming at the genetic improvement of *Coffea arabica* L. in relation to the resistance to *Hemileia vastatrix* Berk. & Br.. The work carried out in the two last decades was given special emphasis and priority in the research programs of some centers namely in India, Brazil, Colombia and Mexico. (RODRIGUES *et al.*, 1975). All these programs have received the cooperation of the Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), at Oeiras, Portugal, which has provided the basic data on the physiologic specialization and genetic mechanism of the *Coffea* - *Hemileia vastatrix* association, as well as supplied diversified germplasm of *Coffea* with resistance to the fungus, most of it synthesised at Oeiras.

In 1960, within a project aiming at the transfer of rust resistance factors to the main cultivars of *C. arabica*, it was started, at the CIFC, the study of several populations resulting from crosses between coffee plants of different resistance sources with coffee plants of those cultivars (BETTENCOURT & LOPES, 1965; BETTENCOURT, 1977). Seed F₁ of these crosses and seed F₂ of the plants selected in the F₁ populations were forwarded from 1966 onwards to the Instituto de Investigação Agronómica de Angola (IIAA) and Instituto do Café de Angola (ICA) to be included in field trials. In, 1971, F₂ and F₃ progenies of these hybrids selected at the IIAA and ICA were introduced in Brazil and submitted to field trials at the experimental centers of the Universidade Federal de Viçosa (UFV), Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) and Instituto Brasileiro do Café (IBC).

The work described in this paper reports the analysis and selection, carried out from 1960 to 1979, of the successive generations of

progenies and in the backcrosses of those coffee plants to the susceptible cultivars seem to indicate the existence in each of those plants of new factors besides S_{H1} to S_{H6} . These new factors will condition, single or associated, the resistance of groups A, 1, 2, and 3.

In the coffee material bearing the factors S_{H1} to S_{H5} it was observed a segregation in accordance with the number of genes existing in the selected coffee plants. Thirteen physiologic groups with a number of factors from 1 to 4 were defined.

The selfed F_3 progenies of the coffee plants selected in the IIAA field trials bearing Híbrido de Timor genes associated to S_H genes presented a variable segregation towards groups A, 1, R or 4, D and E with predominance of group A. They demonstrated to bear the factors S_{H2} and S_{H6} and the new factors which condition the resistance of groups A and 1. The analysis of the F_3 progenies bearing the genes S_{H1} to S_{H5} showed that most of the selected coffee trees still possessed several genes associated in number from 2 to 4.

In relation to the selfed F_4 progenies of the derivatives of Caturra Vermelho x Híbrido de Timor selected in the IIAA and UFV, the analysis for rust resistance indicated a great variability in the segregation, between progenies, for the physiologic groups A, 1, 2, 3, R or 4 and E, with a high percentage of plants belonging to group A. It was observed that 6 of these progenies included only plants of group A and that 23 progenies did not segregate for group E, such as the progeny of the coffee tree UFV 386-45 from which 287 plants were studied. The variable number of group E susceptible plants and of plants of groups 1, 2, 3, R or 4 allows to conclude that the studied coffee trees should possess a variable number of factors of resistance to *H. vastatrix*. In the progenies with S_H factors three associations of factors corresponding to the groups O (S_{H1} - S_{H2} - S_{H4} - S_{H5}), J (S_{H4} - S_{H5}), and D (S_{H2} - S_{H5}) were determined.

Finally the analysis of the F_5 progenies obtained from 16 coffee trees Caturra Vermelho x Híbrido de Timor showed a high percentage of group A coffee seedlings and a low percentage of group E seedlings (total absence in 17 progenies). This fact leads to the conclusion that in this generation there are several resistance factors at play.

The populations derived from the hybrids CIFC HW 26 and CIFC H 46 (Caturra Vermelho x Híbrido de Timor), predominantly constituted by group A plants, which from the F_3 onwards received at the UFV the designation of CATIMOR (CHAVES *et al.*, 1976), are already in extensive experimentation and in multiplication seed plots not only in Brazil but also in other countries of the Latin America. Among these populations there should be stood out the progenies of UFV 386-45 (F_3 of CIFC HW 26) homozygous for the allele Ct (short size) and with yield and vegetative vigour identical to the traditional Arabica cultivars.

Coffee material derived from other recombinations seem also to present good perspectives in view of its good behaviour in the F_3 generation. Such material is the following: CIFC H 361 (Villa Sarchi x Híbrido de Timor) and CIFC H 528 (backcross to Catuai Amarelo of CIFC HW 26/13 = Caturra Vermelho x Híbrido de Timor) with group A resistance; CIFC H 275 (Caturra Vermelho x S.795) and CIFC H 315 (Mundo Novo x S.795) with resistance conditioned by the gene S_{H3} , single or associated to S_{H2} ; CIFC H 101 (S.333 x Dilla & Alghe) with the resistance factors S_{H1} and S_{H2} , and CIFC H 175 (Caturra Vermelho x S.12 Kaffa) with the resistance factors S_{H1} and S_{H4} (CHAVES *et al.*, 1976; CARNEIRO *et al.*, 1978; GASPAR *et al.*, 1978; NETTO *et al.*, 1979).

In the inoculation of the coffee seedlings and the reading of the interactions coffee plant-rust isolate, were followed the method and the reaction types adopted in the CIFC (OLIVEIRA, 1955). Reaction types intermediate to 0 and 4 were always confirmed by repeating the inoculations in order to eliminate the possible influence of unfavourable environmental conditions. In these cases the reaction types below 2 were considered as resistance reactions and those above 2 as susceptible ones.

The uredospores of *H. vastatrix* were placed with the aid of a scalpel on the lower surface of the young leaves and then spread over them with a camel brush. The inoculated leaves and the whole plant were sprayed with distilled water afterwards. The inoculated plants were maintained in moist chamber during 48 hours, after which time they were removed to the greenhouse benches. About one month later were made the readings of the reaction types. According to the reaction spectra presented by the coffee plants to the physiologic races, the plants were classified within the groups already described (RODRIGUES *et al.*, 1975) and in 8 new groups (Table 1).

Experimental results

F₁ generation

From the 308* crosses made at the CIFC, 200 were simple hybrids, 83 backcrosses (BC₁, BC₂ and BC₃), and 25 complex hybrids. The 6853 seedlings obtained, after being analysed for resistance to the rust races, were included in the following 25 physiologic groups: A, 1, 2, 3, M, R (S_H6), C (S_H1-S_H5), D (S_H2-S_H5), 5 (S_H1-S_H6), G (S_H3-S_H5), J (S_H4-S_H5), 4 (S_H5-S_H6), L (S_H1-S_H2-S_H5), Z (S_H1-S_H3-S_H5), W (S_H1-S_H4-S_H5), H (S_H2-S_H3-S_H5), Y (S_H2-S_H4-S_H5), 6 (S_H2-S_H5-S_H6), X (S_H3-S_H4-S_H5), V (S_H1-S_H2-S_H3-S_H5), O (S_H1-S_H2-S_H4-S_H5), U (S_H1-S_H3-S_H4-S_H5), T (S_H2-S_H4-S_H5), 9 (S_H2-S_H3-S_H5-S_H6) and (S_H1-S_H2-S_H3-S_H4-S_H5).

The successive selections, made at the CIFC, of each population of the above groups concerning rust resistance, vigour, tree shape, and percentage of empty fruits, led to the choice of 686 coffee plants which were maintained in the greenhouses until they cropped (Table 2).

F₂ generation

The study of the F₂ progenies obtained from seed of 29 selfed coffee plants (12 selected at the CIFC, 9 at the IIAA and 8 at the UFV), corresponding to recombinations of group A resistance factors with S_H factors, allowed to include the 1484 tested plants for rust resistance in groups A, 1, 2, 3, R or 4, D, and E or β (Table 3).

The analysis for rust resistance of the F₂ progenies of 82 coffee plants (47 selected at the CIFC and 35 at the IIAA) corresponding to recombinations of factors S_H1 to S_H5, in a total of 5885 plants, allowed the inclusion of these in the following physiologic groups: U, O, X, Y, H, W, Z, L, J, G, D, C and E (Table 3).

* The 16 hybrids with the prefix HW were made by M. Noronha Wagner of the Genetics Department of Estação Agronômica Nacional, who has given colaberation to the CIFC on the genetic study of the resistance of *Coffea* spp to *Hemileia vastatrix*.

In the progenies bearing the allele Ct (derived from the hybrids where one of the parents is short sized such as Caturra, Catuaí, Villa Sarchi, etc.), the segregation ratio between the short sized and the regular sized plants was approximately of 3:1.

F₃ generation

The analysis for rust resistance of the F₃ progenies of 38 coffee trees, joining group A factors and S_H factors, selected for yield at the IIAA, led to the inclusion of the 458 studied plants in groups A, 1, R or 4, D, and E (Table 4).

The same type of analysis carried out in relation to the F₃ progenies of 151 coffee trees selected at the CIFC and at the IIAA, bearing the factors S_{H1} to S_{H5}, led to the inclusion of the 3405 studied plants in the groups O, V, Y, H, W, Z, L, J, G, D, C and E (Table 4).

F₄ generation

The analysis of the F₄ progenies of 47 coffee trees of the hybrid CIFC HW 26 = Caturra Vermelho x Híbrido de Timor, 44 plants of which selected at the UFV and 3 at the IIAA, led to the inclusion of the 2957 tested in the physiologic groups A, 1, 2, 3, R or 4 and E (Table 5).

The study of 8 F₄ progenies, of the hybrids CIFC HW 12 = Caturra Vermelho x S.4 Agaro (IIAA 534 and IIAA 451) and HW 17 = S.286-7 x S.12 Kaffa (IIAA 512) selected at the IIAA, with some of the S_H factors, allowed to detect the physiologic groups O, J, D, and E.

F₅ generation

The analysis of the F₅ progenies of 20 short sized coffee trees (CIFC HW 26 = Caturra Vermelho x Híbrido de Timor), under study at the UFV and EPAMIG, resulted in the distribution of the 997 tested plants in the groups A, 1, 2, 3, and E (Table 6).

Discussion and Conclusions

The 686 coffee plants selected from the populations F₁, BC₁, BC₂, BC₃, included in 25 different physiologic groups, constitute a germplasm collection of great genetic variability for the genes of resistance to H. vastatrix S_{H1} to S_{H6} and others not yet identified of groups A, M, 1, 2 and 3, associated to genes of productivity.

The selfed F₂ progenies of the coffee plants selected at the CIFC and in the IIAA field trials, when analysed for rust resistance, presented, as foreseen, a large segregation not only for the resistance factors but also for other agronomic characteristics. In the material derived from the Híbrido de Timor there was a predominance of plants of groups A (with resistance to all the known races), occurring the plants of groups 1, 2, 3, R or 4, and E or β in lesser number. Considering the hypothesis that the four coffee plants Caturra Vermelho x Híbrido de Timor CIFC HW 26/5, CIFC HW 26/7, CIFC HW 26/13 and CIFC H 46/10, bear dominant and independent factors for resistance, the segregation of group E plants produced in their

308 coffee hybrids in relation to the resistance to the fungus races. This studied was focused on the coffee seedlings of the F₁ and on the F₂, F₃, F₄ and F₅ progenies of the seedlings selected at the CIFC and in the field trials of IIAA, ICA, UFV, and EPAMIG. In the field trials, the plants were evaluated taking into account their yield, vegetative vigour, size, percentage of empty fruits, resistance to the *H. vastatrix* determined locally and at the CIFC, and behaviour towards other diseases and pests. (CHAVES *et al.*, 1976; CARNEIRO *et al.*, 1978; GASPAR *et al.*, 1978; NETTO *et al.*, 1976, 1977, 1979; PEREIRA & NETTO, 1979).

Materials and Methods

The screening of the coffee seedlings for rust resistance carried out at the CIFC was made by using 81 isolates of *Hemileia vastatrix*, representing in a variable number from 1 to 8, each of the 30 races of the CIFC collection as follows: I (8), II (8), III (7), IV (2), VI (3), VII (2), VIII (4), X (1), XI (4), XII (1), XIII (1), XIV (1), XV (6), XVI (1), XVII (3), XVIII (1), XIX (1), XX (2), XXI (1), XXII (3), XXIII (3), XXIV (2), XXV (1), XXVI (1), XXVII (4), XXVIII (1), XXIX (4), XXX (3), XXXI (1) and XXXII (1). Most isolates obtained from rust samples received from 17 countries (Angola, Brazil, Cambodia, Central African Republic, Ethiopia, India, Ivory Coast, Kenya, Madagascar, Mozambique, Philippines, São Thome, Srilanka, Tanzânia, Timor, Uganda and Zaire) infect cultivars of physiologic group E (Typica, Bourbon, Caturra, Catuaí, Mundo Novo, etc.) with exception of those differentiated as races IV, VI, XI, XVIII, XIX, XX, XXI, XXVII and XXXII. (RODRIGUES *et al.*, 1975).

During the period these studies were carried out, the number of races and of the corresponding isolates used in the screening was increasing in the following way: 1960-63 from I to XVI, 1963-64 from I to XVIII, 1964-66 from I to XXIII, 1966-72 from I to XXVI and after 1972 from I to XXXII. The screening of the coffee seedlings selected in the successive generations which were maintained until the present, at Oeiras, was always taken to completion with the isolates of all races.

As to the basic material used in obtaining the hybrids, the following coffee trees belonging to 17 physiologic groups of resistance to *H. vastatrix* were utilized: 1) 64 plants of group E, bearing gene SH₅, belonging to cultivars and commercial selections derived from the varieties *arabica*, *bourbon* and *caturra* (Bourbon Amarelo, Bourbon Vermelho, Blue Mountain, Catuaí Amarelo, Catuaí Vermelho, Caturra Amarelo, Caturra Vermelho, Hibrítico, Ke 20, Mundo Novo, Pacas, Padang, Pantgoer, Philippinean, San Ramon, Villalobos and Villa Sarchi) susceptible to most of the rust races, including the most common ones II and I (CARVALHO, 1967; FERNIE, 1964; GONZALEZ, 1976); 2) 27 plants of commercial selections derived from Kent's (K.7, S. 286-7, D/K 1/6 and series F, H, and KP) and from tetraploid hybrids *C. arabica* x *C. liberica* (S. 288-23, S. 333, S. 353 4/5, S. 795 and BA 16) with resistance to the rust conditioned by the factors SH₂ and SH₃, single or associated, included in groups D, G, and H (JONES, 1957; FERNIE, 1964, NARASIMHASWAMY, 1960); 3) 22 plants of Arabica populations with great genetic variability collected in Ethiopia and Sudan (BE-5 Wush-Wush, Dilla & Alghe, Geisha, S.4 Agaro, S.6 Cioiccie and S.12 Kaffa) bearing genes for resistance SH₁, SH₄ and SH₅, single or associated, of groups C, α, J, X, I and W (CARVALHO *et al.*, 1962; FERNIE, 1964; SYLVAIN, 1955); 4) coffee plants of heterogeneous populations derived from interespecific hybrids, such as Hibrido de Timor (*C. arabica* x *C. canephora*), Piatã hybrid (*C. arabica* x *C. dewevrei*) and Kawisari hybrid (*C. arabica* x *C. liberica*) with resistance conditioned by the factor SH₆ (group R) and by some others not

yet identified of groups A, M, 1, 2, and 3 (BETTENCOURT, 1973; CRAMER, 1957; MONACO et al., 1967).

Almost all the coffee plants referred to have genotypes where the factors S_{H1} , S_{H2} , S_{H3} , S_{H4} , S_{H5} and S_{H6} are found in homozygous condition except in the plants 187/8 (Blue Mountain), 213/18 (N.39), 635/3 (S.12 Kaffa), 365/6 (S.795) and 1344/19 (S.795) which present, respectively, the following genetic constitutions: $S_{H2} S_{H2} S_{H5-}$, $S_{H2} S_{H2} S_{H5-}$, $S_{H1} S_{H1} S_{H4} S_{H4} S_{H5-}$, $S_{H2} S_{H2} S_{H3} S_{H3} S_{H5-}$, and $S_{H2} S_{H2} S_{H3} S_{H3} S_{H5-}$. Most of the coffee plants chosen to hybridize with the different sources of resistance to H. vastatrix belong to cultivars or selections of high yield capacity, good coffee quality and good adaptation to a large range of climates and soils, such as Mundo Novo, Bourbon, Catuaí and Caturra.

Other plants, however, either from selections with commercial interest, or from sources of resistance to H. vastatrix, were also chosen taking into account the following characteristics of great agronomic interest. Short size, conditioned by the allele Ct, of cultivars Caturra, Catuaí, Villa Sarchi, Pacas, San Ramon and Villalobos; exceptional liquor quality of Bourbon N.39 (FERNIE, 1964); drought resistance of selections SL 14, SL 28 and SL 34 (JONES, 1957); tolerance to low temperatures of selections SL 14, SL 34, Ke 20 and Blue Mountain (JONES, 1957); resistance to the "coffee berry disease - CBD", either associated or not to the rust resistance like in Bourbon 43-7 x RP 13, Geisha, Híbrido de Timor, K.7 and Padang (FERNIE, 1977); and resistance to the nematodes of Híbrido de Timor and S.288-23 populations (BETTENCOURT, 1973; THOMAS, 1948).

Simple hybrids were obtained by using as parents coffee plants both of commercial varieties (almost always as the female parent) and of selections with different genes for rust resistance. The backcrosses were carried out by hybridizing plants of the F_1 with coffee plants of Bourbon, Caturra, Catuaí and Mundo Novo, having in mind to obtain plants with the highest possible number of chromosomes of the recurrent cultivar, but maintaining the chromosome or chromosomes with the factors for rust resistance. In this process were preferentially utilized the short sized cultivars Caturra and Catuaí, in virtue of the growing interest of the farmers towards the varieties which facilitate the harvest, phytosanitary treatments and other cultural practices.

In order to obtain complex hybrids with the highest possible number of combinations of two or more resistance factors (S_{H1} to S_{H6}), associated to the factors of groups A, M, 1, 2 and 3, crosses were made between coffees of different genotypes belonging to the F_1 of the simple hybrids or to the backcrosses. Using this system, it was attempted to create conditions to obtain germplasm with the highest possible genetic variability concerning rust resistance.

The selfing and outcrossing techniques used were those followed in the Section of Genetics of the Instituto Agronómico de Campinas (KRUG, 1935). The hybridization was made by emasculating the floral buds of the female parents when these buds were still unopen. The emasculation was made with the aid of a special pair of scissors which removed all the stamens. The emasculated branches were numbered and protected with paper bags. The pollen of the male parent flowers was laid on the stigma of the female parent flowers, two or three days after the emasculation. The paper bags were removed from the branches about 10 days later.

For the selfing of the coffee plants branches previously marked with labels were enveloped with paper bags, one or two days before the opening of the flowers. The paper bags were removed about 10 days later.

It must be stressed the interest in continuing in the CIFC the analysis for rust resistance of the 308 recombinations already in field evaluation in several experimental centers. The main objective is to define the resistance genotypes of those plants which show themselves more promising in relation to yield and other agronomic characteristics. With a basis on this analysis it will be possible to supervise the selection in course in those centers in order to avoid the loss of resistance and genetic variability of the populations under study.

This analysis will also provide conditions to establish composite cultivars with coffee trees of different genotypes for resistance and allow the synthesis of new recombinations for further studies in the field.

In the populations which are already stable for the main agronomic traits it would also be of great interest to see whether horizontal resistance is present, so that advantage could be taken of it in the future together with the vertical resistance.

Acknowledgements

The authors wish to express their appreciation to all the technicians of the CIFC who cooperated in the maintenance and analysis of the studied material, namely J. Zacarias, M. L. Guerra, D. A. Godinho, J. E. Passo, A. R. Passo and S. Palma.

To Prof. G. Martins Chaves and Dr. Alves Pereira, respectively of UFV and EPAMIG; to Dr. A. Mendes Gaspar and Dr. A. Mendes da Ponte, ex-responsible for the coffee improvement program in the IIAA, and Dr. Ivone Carneiro and Mr. D. T. Fernandes, ex-responsible for the coffee improvement program in the ICA, they wish to thank for the data provided on yield and adaptation of the studied material as well as the supply of coffee progenies selected in the field trials.

They also want to thank Dr. Alcides Carvalho, Chief of the Genetics Department of the IAC, for the great help in the definition of the criteria followed in the selection of the coffee plants in the field.

Finally the authors can not help expressing their deep appreciation to Prof. Branquinho d'Oliveira, ex-Director of CIFC, and Dr. C. J. Rodrigues Jr., present Director of CIFC, for the suggestions they gave to this work. To the latter they also thank for the translation of this paper into English.

Literature cited

- BETTENCOURT, A. J., LOPES J. 1965. Breeding of C. arabica L. for rust resistance. Centro Inv. Ferrug. Caf. Rept 1960-65:124-34.
- BETTENCOURT, A. J., RODRIGUES, C. J. Jr. 1965 Routine screening for resistance to Hemileia vastatrix B. et Br. on Coffea canephora Pierre and Coffea spp accessions from different regions of the world. Centro Inv. Ferrug. Caf. Rept 1960-65:100-20.
- BETTENCOURT, A. J. 1973. Considerações sobre o Híbrido de Timor. Instituto Agronômico de Campinas. Circ. 23, 20 pp.
- BETTENCOURT, A. J. 1977. Transferência de factores de resistência à Hemileia vastatrix Berk & Br. para as variedades comerciais de Coffea arabica. Reunion Internacional sobre mejoramiento genetico del Cafe. IICA (Costa Rica). 20 pp (mimeographed).

- BETTENCOURT, A. J., NORONHA-WAGNER, M., LOPES, J. 1980. Factor genético que condiciona a resistência do clone 1343/269 (Híbrido de Timor) à Hemileia vastatrix Berk & Br. Broteria-Genética I (LXXVI):53-58.
- CHAVES, G. M., BETTENCOURT, A. J., ZAMBOLIM, L. e CRUZ FILHO, J. 1976. Comportamento de progênies F₃ de híbridos "Catimor" recebidos do Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro pela Universidade Federal de Viçosa. Quarto Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras (Resumos) Caxambu:220-24.
- CARNEIRO, M. F. N., BETTENCOURT, A. J. e FERNANDES, D. T. 1978. Estudo da adaptação às condições da Estação Regional do Uige, Angola, de seleções de Coffea arabica L. e de híbridos tetraplóides de C. arabica x Coffea spp, portadores de diferentes factores de resistência à ferrugem alaranjada (Hemileia vastatrix Berk & Br) Garcia de Orta (Ser. Est. Agron.) 5 (1-2):25-30.
- CARVALHO, A., MONACO, L. C. e SCARANARI, H. J. 1962. Melhoramento do cafeeiro XXIV - Variação na produtividade de cafeeiros importados, com referência especial ao material da Etiópia e do Sudão. Bragantia 21 (13): 215-39.
- CARVALHO, A. 1967. Espécies e Variedades. Manual do Cafeicultor. Capítulo II. Universidade de São Paulo. Edições Melhoramentos. São Paulo : 19-39.
- CRAMER, P. J. S. 1957. A review of literature of coffee research in Indonesia. ed. F. Wellman. Inter. Am. Inst. Agric. Sci. Misc. Publ. 15. Turrialba. Costa Rica 262 pp.
- FERNIE, L. M. 1964. Description of the coffee tree, varieties and selections. A Handbook on Arabica Coffee in Tanganyika, Chapter 1:1-8.
- FERNIE, L. M. 1977. Coffee breeding programmes in Eastern Africa. Reunion Internacional sobre Mejoramiento Genético del Café. IIAA (Costa Rica) 12 pp (mimeographed).
- GASPAR, A. M., BETTENCOURT, A. J. e PONTE, A. M. da. 1978. Estudo da adaptação de seleções de Coffea arabica L. e de híbridos sintetizados no CIFC, com resistência à Hemileia vastatrix Berk & Br., às condições do Planalto Central de Angola. Garcia de Orta, (Ser. Est. Agron.) 5 (1-2): 37-42.
- GONZÁLEZ, J. A. 1976. Variedades de Cafe de Importância Económica en El Salvador. Manual Técnico del Cultivo del Cafe en El Salvador. Instituto Salvadoreño de Investigaciones del Café. 23-26.
- JONES, P. A. 1957. Notes on the varieties of Coffea arabica in Kenya. Selected Articles of Coffee Culture. Kenya Coffee Board. :158-66.
- KRUG, C. A. 1935. Hybridization of coffee: a preliminary study of flowering habits, and of methods of crossing. J. Hered 26 (8):325-30.
- MONACO, L. C., CARVALHO, A., ANTUNES, C. S. N. 1967 Aproveitamento de uma combinação híbrida interespecífica para fins de melhoramento do cafeeiro. Fitotec. Latinoam. 4:113-21.
- NARASIMHASWAMY, R. L.. 1960. Arabica selection S.795. Its origin and performance: a study. Indian Coffee. 24:197-204.
- NARASIMHASWAMY, R. L.. 1960. Coffee Breeding (arabica and robusta) and extension work with selections. Thirteenth Annual Report. 1959/60. Indian Coffee Board Res. Dep. :67-79.
- NETTO, K. de A., CRUZ FILHO, J. e CHAVES, G. M., 1977. Acerca de progênies "F₂" e "F₃" de Catimor, "F₁" e "F₂" de Catindú, seleções de H. de Timor e outros procedentes do CIFC-Oeiras, Portugal - Uma comparação com cultivares nacionais. Quinto Congresso de Pesquisas Cafeeiras (Resumos). Guarapari :188-190.
- NETTO, K. de A., KAISER, A. A. P., PAULINO, A. J., D'ALMEIDA, S. R., PEREIRA, J. B. D., REBEL, E. K.,. 1979. Algumas seleções de destaque do cultivar Catimor de Coffea arabica. 7º Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Araxá (MG) :240-242.
- D'OLIVEIRA, A. B.,. 1955. As ferrugens do cafeeiro. Rev. Café Port. 2:9-17.
- PEREIRA, J. B. D. e NETTO, K. de A. 1979. Comportamento de progênies de Catimor e outras na zona da Mata de Minas Gerais. 7º Congresso de Pesquisas Cafeeiras, Araxá (MG) :156-159.

- RODRIGUES, C. J. Jr., BETTENCOURT, A. J., RIJO, L.. 1975. Races of the pathogen and resistance to coffee rust. Ann. Rev. Phytopathol. 13:49-70.
- SYLVAIN, P. G.. 1955. Some observations on Coffea arabica L. in Ethiopia. Turrialba 5:37-53.
- THOMAS, K. M.. 1948. Botany breeding (arabica) Bulletin nº. 1. First Annual Report of the Research Department of the Indian Coffee Board (Balehonnur) 1947/48:3-5.
- VISVESWARA, S.. 1974. Periodicity of Hemileia in Arabica selection - S.795. Indian Coffee 38:49-51.

Table 1. New coffee physiologic groups

Physiologic groups	Hybrids and their parents	Resistance factors
4	H 440/7 = 19/1 Caturra Vermelho x x 1343/269 Híbrido de Timor	S _H 5,6
5	H 468/23 = 128/2 Dilla & Alghe x x 1343/269 Híbrido de Timor	S _H 1,6
6	H 537/18 = 32/1 DK 1/6 x x 1343/269 Híbrido de Timor	S _H 2,5,6
7	H 538/29 = 87/1 Geisha x x 1343/269 Híbrido de Timor	S _H 1,5,6
8	H 539/8 = 134/4 S.12 Kaffa x x 1343/269 Híbrido de Timor	S _H 1,4,6
9	H 535/10 = 34/13 S.353 4/5 x x 1343/269 Híbrido de Timor	S _H 2,3,5,6
10	H 581/17 = 254/14 S.333 x x 1343/269 Híbrido de Timor	S _H 3,5,6
11	H 583/5 = 110/5 S 4 Agaro x x 1343/269 Híbrido de Timor	S _H 4,5,6

Table 2. Analysis for rust resistance of the populations F₁, BC₁, BC₂ and BC₃ of 308 hybrids produced at the CIFC with indication of the total number of selected plants for further study.

Group A-Group M-S _H 1 to S _H 6	Nº. of obtained recombinations	Nº. of tested plants	Nº. of plants of each physiologic group										Nº. of selected plants
			A	1	2	3	M	S	9	T	U		
			1319	427	42	159	27	57	19	33	59		
			O	V	10	X	6	Y	H	7	W		
308		6853	148	32	50	204	42	100	307	4	213	686	
			Z	L	Ror4	J	G	D	5	C	E		
			185	268	132	632	270	436	43	457	1188		

Table 3. Analysis for rust resistance of 111 F₂ progenies obtained from coffee trees selected at the CIFC, IIAA and UFV.

Nº. of selected coffee plants (F ₁)	Nº. of tested plants (F ₂)	Nº. of plants of each physiologic group							
		A	1	2	3	R or 4	D	E	
Group A - S _{H1} to S _{H6} 29	1484	922	129	104	78	107	3	141	
		U	O	X	Y	H	W	Z	
S _{H1} to S _{H5} 82	5885	17	64	292	191	673	284	682	
		L	J	G	D	C	E		
		397	742	494	692	696	661		

Table 4. Analysis for rust resistance of 189 F₃ progenies obtained from coffee trees selected at the CIFC and IIAA.

Nº. of selected coffee plants (F ₂)	Nº. of tested plants (F ₃)	Nº. of plants of each physiologic group					
		A	1	R or 4	D	E	
Group A - S _{H1} to S _{H6} 38	458	403	2	1	24	28	
		O	V	Y	H	W	Z
S _{H1} to S _{H5} 151	3405	12	16	8	3	46	66
		L	J	G	D	C	E
		179	1978	148	245	252	452

Table 5. Analysis for rust resistance of 47 F₄ progenies of hybrid CIFC HW 26 (Caturra Vermelho x Híbrido de Timor) obtained from coffee trees selected at the IIAA and UFV.

Coffee trees (F ₃)	Tested plants (F ₄)	Nº. of plants of each physiologic group					
		A	1	2	3	R	E
IIAA							
857-1-10	34	30	2	1	1		
857-1-16	37	19	9		9		
857-3-17	44	40	1		3		
UFV							
384-1	47	5	1		2	1	38
384-4	49	21	1		1		26
384-9	25						25
384-52	72	31			2		39
384-80	53	22			1	2	28
384-118	49						49
384-122	52	31					21
384-134	82						82
386-19	53	16	12		7		18
386-30	74	41	1				32
386-35	63	59	3				1
386-45	287	190	95		2		

Table 5. Analysis for rust resistance of 47 F₄ progenies of hybrid
(Continued) CIFIC HW 26 (Caturra Vermelho x Híbrido de Timor) obtained
from coffee trees selected at the IIAA and UFV.

Coffee trees (F ₃)	Tested plants (F ₄)	Nº.of plants of each physiologic group						
UFV		A	1	2	3	R	E	
386-52	40	40						
386-58	54	42	12					
386-59	46	45	1					
386-69	60	25	4		1		30	
386-70	70	52	5	2			11	
386-77	58	57					1	
386-78	63	29	8		19		7	
386-97	81	79	2					
386-105	76	43					33	
387-1	66	42	8		2		14	
387-20	65	65						
387-51	39	38					1	
387-83	71	53	12		5		1	
387-107	65	65						
387-109	68	68						
390-8	69	68			1			
390-24	58	58						
390-25	57	57						
390-52	45	41	3		1			
390-61	70	43	4		5	2	16	
390-73	58	52	5		1			
390-78	92						92	
390-86	48	47			1			
391-12	58	39	5		1		13	
391-74	58	51	7					
391-114	70	69	1					
394-22	53	38	1				14	
395-31	63	39	20		4			
395-46	59	50	9					
395-87	44	37	7					
395-126	63	38	1		10		14	
395-147	49	26	12		11			

Table 6. Analysis for rust resistance of 20 F₅ progenies of the
hybrid CIFIC HW 26 (Caturra Vermelho x Híbrido de Timor)
obtained from coffee trees selected at the UFV and Es-
tação Experimental de Ponte Nova (EPAMIG).

Coffee trees (F ₄)	Tested plants (F ₅)	Nº.of plants of each physiologic group						
UFV		A	1	2	3	R	E	
386-45-1	159	120	35		4			
386-45-4	216	152	61		3			
386-45-6	43	42		1				
386-45-88	223	157	64		2			
386-45-434	29	23	6					
386-45-435	41	30	11					
386-45-711	27	22	5					
386-45-714	24	20	3		1			

Table 6. Analysis for rust resistance of 20 F₅ progenies of the hybrid CIFC HW 26 (Caturra Vermelho x Híbrido de Timor) (Continued) obtained from coffee trees selected at the UFV and Estação Experimental de Ponte Nova (EPAMIG).

Coffee trees (F ₄)	Tested plants (F ₅)	Nº.of plants of each physiologic group					
		A	1	2	3	R	E
UFV							
414-15-225	50	31	19				
414-15-370	50	37	13				
415-2-292	51	35	16				
415-2-429	42	27	4		4		7
EPAMIG (PN)							
386-45-2	29	15	12		1		1
386-45-25	28	13	10		4		1
386-45-48	21	15	6				
386-45-51	34	26	8				
386-45-79	26	23	2		1		
386-52-244	43	42	1				
386-52-327	31	31					
386-52-328	23	23					

CHEMICAL INDUCED MUTATION OF RACE I OF *HEMILEIA VASTATRIX* BERK. & BR. INTO RACE XXIV

M. F. I. NEVES CARNEIRO

Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro

2780 Oeiras, Portugal

Introduction

The first attempts to induce mutations on rusts date back to 1956 (4) when Flor submitted uredospores of *Melampsora lini* to U.V. radiation. Later, on this same rust, high frequency of mutations was obtained by Flor (5, 6) using X rays, and by Schwingamer (12, 13) using X rays, thermic neutrons and U.V. radiation. Rowell, Loegering and Powells (11) used X rays to induce mutations for pathogenicity in *Puccinia graminis tritici*. In 1966, Baker and Teo (1), and in 1975 Teo and Baker (14), attempted to induce mutations on the oat rust *Puccinia graminis avenae* with the chemical mutagen ethyl methane sulphonate. So far, any attempts to induce mutations on the orange coffee rust - *Hemileia vastatrix* - are, however, unknown.

One of the research lines of the CIFC is the characterization of physiologic races of *H. vastatrix*. The differentiation of these races allows, besides the enlargement of the unique collection of coffee rust races in the world, to test the coffee seedlings which arrive to the CIFC with the largest possible number of rust races. Therefore any possible way of increasing this number is of great interest to the Center's work, no matter whether these races are found in the nature or are they artificially produced at the laboratory.

Considering that Flor's gene-for-gene theory has been proved to apply to the coffee-orange rust association (8, 3) and that 6 genes are at least, involved in this interaction (2), it is to be predicted, according to Person's model (9), the existence of 64 races of *H. vastatrix*. So far, there are, however, only 32 races known (10, 7).

The present communication refers to the attempt of inducing mutation on one isolate of *H. vastatrix*, using the chemical mutagen ethyl methane sulphonate.

Material and Methods

The rust isolate used was the 1285, received in 1971 from Angola and characterized as race I (7). In order to be sure that the inoculum stock was genetically homogeneous, single spore cultures were made by using glass micropipettes to pick up the spores from the glass slides and to put them on to the coffee leaves according to the usual method described for other rusts. Of about 300 single spore cultures attempted, only two rust pustules were obtained. One of these rust pustules was bulked up by inoculation on a susceptible cultivar of C. arabica and its purity was checked by inoculating the series of differential hosts.

The rust uredospores were collected directly from the host and divided in 5 lots of 10 mg each. Four of these lots were submitted to the ethyl methane sulphonate (EMS) treatment at the following concentrations; A - 0.5×10^{-2} M, B - 1.0×10^{-2} M, C - 1.25×10^{-2} M, and D - 1.5×10^{-2} M.

The uredospores were immersed in 20 ml of the EMS solution and gently stirred for 2 hours. The fifth lot was immersed in distilled water and used as control (T). After the 2 hour immersion, the uredospore suspensions were filtered out through milipore, washed out for several times with distilled water and inoculated right away on the cultivar of C. arabica Matari (CIFC 849).

Results and conclusions

The reactions of the coffee plants inoculated with the treated uredospores were observed 4 weeks later. Uredospores submitted to the A, B and C treatments induced on their hosts susceptible reactions (type 4) identical to those of the control.

The inoculum corresponding to the D treatment induced both susceptible and resistant reactions (flt) on the inoculated host. The uredospores of one of these type 4 pustules were inoculated on the cultivar Matari of C. arabica (CIFC 849/1) and after being bulked up on it they were inoculated on the differential hosts. It was observed that the differential host S. 4 Agaro (CIFC 110/5) presented, among several resistant reactions, one pustule of susceptibility. This pustule was then isolated and bulked up, after which it was considered as the subculture 1285 A of the original isolate 1285. In order to determine to what race this subculture belonged to, the same series of differential hosts was inoculated. The results of this inoculation are presented on Table I, together with the results of the inoculation of the isolate 1285 used as control.

The analysis of the table indicates that the subculture 1285 A has a larger virulence spectrum than the control 1285, infecting, in addition to the race one's normal hosts, the hosts CIFC 110/5 (group J) and CIFC 849/1 x 635/2 (group γ), which corresponds to the virulence spectrum of race XXIV. Since the original isolate has the genotype $V_2 V_5$ and the new subculture has the genotype $V_2 V_4 V_5$, there was apparently a mutation for virulence at the locus V_4 .

Table I. - Reaction spectra of the isolate 1285 and of the subculture 1285 A obtained after treatment with $1.5 \times 10^{-2}M$ EMS

Rust isolates	Differential hosts											
	832/1 (H. Timor)	1343/269 (H. Timor)	34/13 (S.353 4/5)	1006/10 (KP.353)	110/5 (S.4 Agaro)	635/2 (S.12 Kaffa)	33/1 (S.288-23)	87/1 (Geisha)	128/2 (Dilla & Alghe)	32/1 (D.K 1/6)	63/1 (Bourbon)	849/1 (Matari)
	A	R	H	L	U	Y	G	C	X	D	E	P
1285 A	R	R	R	R	MS	MS	R	R	R	S	S	S
1285	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S

R - Resistance reactions; MS - moderately susceptible; S - susceptible.

Acknowledgments

The author wishes to express her appreciation to Dr. C. J. Rodrigues Jr., Director of the Coffee Rusts Research Center, for the suggestions given to the execution of this research, and also for the translation of the manuscript into English.

Literature cited

1. Baker, E. P., Teo, C. 1966. Mutants of Puccinia graminis induced by ethyl methane sulphonate. Nature pp 632.
2. Bettencourt, A. J., Carvalho, A. 1968. Melhoramento visando a resistência à ferrugem. Bragantia, vol 27 nº. 4.
3. Bettencourt, A. J., Noronha-Wagner, M. 1971. Genetic factor conditioning resistance of Coffea arabica L. to Hemileia vastatrix Berk & Br. Agronomia Lusit. 31:285-292.
4. Flor, H. H. 1956. Mutations in flax rust induced by ultraviolet radiation. Science 124, p. 888-889.
5. Flor, H. H. 1957. X - ray induced mutations for pathogenicity in F₁ of race 22 x race 1 of the flax rust fungus Phytopathology 44: p. 11.
6. Flor, H. H. 1958. Mutation to Wider Virulence in Melampsora lini. Phytopathology 48: pp. 297-301.
7. Lopes, J., Godinho, I. 1976. Physiologic specialization of Hemileia vastatrix B. & Br. Garcia de Orta. Ser. Est. Agron. 3(1-2), 13-16.

8. Noronha-Wagner, M., Bettencourt, A. J., 1967. Genetic study of the resistance of Coffea spp. to leaf rust. I - Identification and behavior of four factor conditioning disease reaction in Coffea arabica to twelve physiologic races of H. vastatrix. Canadian Journal of Botany vol. 45.
9. Person, C. 1959. Gene-for-gene relationship in host-parasite systems. Can. J. Botany 37:1001-1130.
10. Rodrigues, C. J. Jr., Bettencourt, A. J., & Lopes J. 1965. Study of the physiologic specialization of the coffee rust Hemileia vastatrix B. & Br. and selection of coffee clones for the establishment of a standard range of differential host for this rust. Progress Report 1960-1965. Coffee Rusts Research Center, Oeiras. (mimeographed).
11. Rowell, J. B., Loegering, W. Q. , Powers, H. R. 1960. Mutations for pathogenicity in Puccinia graminis var. tritici. Phytopathology 50:653 (Abstr.):
12. Schwingamer, E. A., 1957. Radiation-induced mutations in race 1 of the flax rust fungus (Abst.). Phytopathology 47:31.
13. Schwingamer, E. A., 1959. The relation between radiation dose and the frequency of mutations for pathogenicity in Melampsora lini. Phytopathology 49:260-269.
14. Teo, C., Baker, E. P. 1975. Mutagenic effects of ethyl methane sulphurate on the oat stem rust pathogen (Puccinia graminis f. sp. avenae) Proc. Linn. Soc. N.S.W. 99:166-73.

RESISTANCE TO *HEMILEIA VASTATRIX* BERK. & BR. OF SOME MOZAMBICOFFEA COFFEE SPECIES

C. J. RODRIGUES JR

Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro

2780 Oeiras, Portugal

The subection Mozambicoffea of the section Eucoffea (sensu Chevalier) or of the subgenus Eucoffea (sensu Leroy) comprises the following coffee species: *C. Schumanniana* Busse, *C. eugenioides* S. Moore, *C. kivuensis* Lebrun, *C. nufindiensis* Hutch., *C. zanguebariae* Lour., *C. ligustroides* S. Moore, and *C. salvatrix* Swynn. & Phil. Specimens of these species, with exception of *C. schumanniana* and *C. nufindiensis*, have been received in this Center thanks to the good offices of some official and private entities, and have been studied in order to determine their resistance to the known physiologic races of *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. (Oliveira & Rodrigues, 1961; Bettencourt & Rodrigues, 1965). The referred coffee species are not generally cultivated, with exception of *C. racemosa* in certain areas of Mozambique where it is utilized for internal consumption. Despite their generalized lack of economical interest, the knowledge of their behaviour towards *H. vastatrix* is useful for the following reasons: 1) They might be used as differential hosts for new rust races; 2) They might operate in the field as repositories of these races which eventually will affect the coffee trees of the cultivated areas; 3) They might come to be utilized, if rust resistant and after the duplication of their genome, in crossings with *C. arabica* L.

In the present communication a summarized report of the screening work carried out in this Center on the referred species is presented. The methods of inoculation and of evaluation of the results have been described by Oliveira and Rodrigues (1961).

Results and conclusions

C. eugenioides S. Moore. Of about 100 inoculated plants, corresponding to 12 introductions, only about 25% were susceptible to the inoculated rust races. The remaining 75% were basically characterized by

presenting strong reactions of flecks (fl) and tumefactions (t). However, some of these plants, despite their generalized resistance to the inoculated rust races, presented sporadically and inconsistently moderate susceptibility to a few of the races. In these cases, the flt reaction areas which first appear are later followed by some sporulation around these areas. The erratic behaviour of these plants is quite common in some other diploid species as well, and has been mainly attributed to the condition of the leaves at the moment of their inoculation.

Three isolates of H. vastatrix collected from infected leaves of C. eugenioides forwarded from the Ruiru Coffee Research Station (Kenya) with the numbers Hem 370 and Hem 371, and from the Adiopaudoumé Center (Ivory Coast) with the number Hem 1508, identified as races II and I, respectively, did not infect the resistant plants.

C. racemosa Lour. - About 120 seed samples of this species were received in this Center coming originally from Mozambique, its native center. Most of the samples comprised small-leaved coffee seedlings (2 x 4 cm), but some of them included seedlings of medium size (4 x 8 cm), large size (5 x 9 cm) and very large size leaves (6 x 14 cm).

Almost the total number of tested plants behaved as susceptible to all the known rust races. For this reason, coffee seedlings of this species are utilized at this Center to maintain the rust isolates, mainly those which do not attack C. arabica, such as Hem 71 (race VI) and Hem 92 (race XVIII).

In 1965, some seed samples of C. racemosa collected at Mr. Pimentel's farm, located at the Madia hill, between Namarroi and Ilemuane Madia, Mozambique, gave rise to seedlings which presented some characteristics of resistance. The accession numbers of these seedlings were CIFC 1685, 1686, 1688, 1691 and 1692, the three former numbers corresponding to short sized plants and the two latter ones to large and very large sized plants, respectively. The depicted resistance is characterized by the formation of strong chlorosis associated with some tumefactions and, in some occasions, with production of few spores. The behaviour of the resistant plants is apparently identical to all the races of H. vastatrix inoculated.

Rust isolates collected on C. racemosa infected plants were always identified as race VI. These rust isolates did not infect the resistant plants more than the other isolates belonging to other races.

C. kivuensis Lebrun. - This species was received at Oeiras, either as seedlings forwarded by the Plant Introduction Section (Beltsville, Maryland) of the U.S.D.A., or as seed, all originally collected at Mulungu, Kivu (ex-Belgian Congo). This material could not be inoculated with all the rust races presently known, in view of the premature death of a large number of seedlings. However, it was still possible to include part of it in group F (with susceptibility to all the races) and to create the new group K (with susceptibility only to race XI) (Oliveira & Rodrigues, 1961). The type clone of this group K, designated as CIFC 1197/6, was later replaced by clone CIFC 821/1 of C. canephora with the same resistance behaviour (Bettencourt and Rodrigues, 1965).

C. zaquebariae Lour. - It was possible to study only one plant of this species (CIFC 9640), collected in Shimoni by one ORSTOM mission to Kenya, and kindly provided by the GERDAT. The referred plant behaved as highly resistant to all the rust races inoculated, presenting strong chlorosis and quite visible tumefactions, but no sporulation.

C. salvatrix Swynn. & Phil. - Seedlings of this species were forwarded to this Center by the Plant Introduction Section of the U.S.D.A., as originally collected in Tanzania. Some of the plants were considered as susceptible and others as indefinite because they did not fall in any previously defined group. On the other hand they could not be considered as representatives of new groups in view of their inconsistent behaviour towards the rust races.

C. ligustroides S. Moore. - A few plants of this species were forwarded to this Center by the Plant Introduction Section of the U.S.D.A. with the P.I. number 222178. Their origin was, however, not indicated.

These plants did not adapt to the CIFC conditions at Oeiras and died prematurely. Only four of them could be inoculated with 2-3 rust isolates to which they showed resistance, but no conclusions could be drawn for obvious reasons.

The present work confirms and completes previous reports where diploid species have been shown to present both susceptible and resistant plants in the same accession. The behaviour of some of the plants is, however, difficult to interpret because of the inconsistency of their reactions towards the rust isolates. The species C. eugenioides, in particular, and to a certain extent C. salvatrix as well, are very sensitive to H. vastatrix in the sense that they easily produce tumefactions well evident with naked eye. The condition of the leaves at the moment of the inoculation seems to be, however, quite decisive for some plants which do not present the same pattern of reaction all the time.

The discovery that some C. racemosa accessions present resistance to the rust races is here reported for the first time. This fact seems to be worth exploring in the field in view of the usefulness of this species for Mozambique coffee consumption. Since C. racemosa is highly susceptible to the rust races, including race VI present in Mozambique, the introduction of resistance into high yielding plants might be of considerable interest in future breeding programs.

Some of the species here considered should be more completely studied because of their premature death or low representativeness in the CIFC collection. On the other hand it would be quite interesting to know the behaviour of species such as C. schumaniana and C. nufindiensis which were never received at the CIFC.

Literature cited

- Bettencourt, A. J. & Rodrigues, Jr., C. J. 1965. Routine screening for resistance to Hemileia vastatrix Berk. & Br. on Coffea canephora Pierre and Coffea spp. accessions from different regions of the world. Progress Report 1960-1965, pp 100-120. Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro. Portugal.
- Oliveira, B. d' & Rodrigues, Jr., C. J. 1961. O problema das ferrugens do cafeeiro. Rev. Café Port. pp 89-133. Separata nº. 25.

TONIC EFFECT OF FUNGICIDES ON ARABICA COFFEE IN KENYA

H. A. M. Van der VOSSSEN

Coffee Research Foundation, Ruiru, Kenya

Fungicides are used in large quantities on arabica coffee in Kenya to control Coffee Berry Disease (CBD) and Leaf Rust. However, these intensive spray programmes have not only become extremely expensive (40% or more of the total production costs), but also they cannot always prevent considerable crop loss due to CBD under excessively wet weather conditions, such as occurred in Kenya during the past three years (1977 - 1979).

Under these circumstances only disease resistance will guarantee continued profitable coffee growing. Fortunately, the breeding programme of the Coffee Research Station at Ruiru has made considerable progress and many promising genotypes, which combine resistance to CBD and Leaf Rust with high yield and good quality, are presently being tested in a number of regional trials. Disease resistant plant material is expected to become available to the coffee industry in Kenya within 5 - 6 years from now.

However, long before intensive spray programmes became necessary to control CBD, it was realised by the coffee growers in Kenya that a few fungicide applications could increase yields by 50 - 100% independent of disease control (Gillett 1942). The initial effect of such "tonic" sprays of fungicide is a 2 - 3 months delay in leaf fall (Fig 3, in Van der Vossen and Browning, 1978). This results in increased yields because the number of flowers initiated is directly related to the number of leaves present on the tree during the periods of most intense flower initiation.

This tonic effect is not restricted to copper fungicides but many purely organic fungicides, e.g. Captafol, produce equally large yield increases. One possible explanation for the delay in leaf fall is that fungicides remove the leaf surface micro-flora and concurring weak spots (Rayner, 1957), which induces the leaves to senesce and then drop prematurely, especially at times when the coffee trees are exposed to water stress.

On the other hand, there is little doubt that a few fungicide spray applications greatly increase the risks of heavy outbreaks of CBD and Leaf Rust in susceptible coffee varieties (Griffiths 1972; Mulinge & Griffiths, 1974).

These two aspects of the tonic effect of fungicides in coffee — yield increase and higher disease incidence — have important consequences for our breeding programme and it became clear that an urgent answer was required to the following questions:

1. Will the new disease resistant varieties continue to need a few fungicide sprays or will it be possible to select for genotypes which have a high natural leaf retention and are consequently as productive without tonic sprays as the present cultivars are with them.
2. If tonic sprays continue to be necessary, would there be an increased risk of CBD and Leaf Rust infection even on resistant plant material, or in other words would this require higher levels of disease resistance.

First of all, a technique had to be developed which could rapidly detect variation between genotypes in their tonic response to fungicide sprays. There is well documented evidence from studies in other crops that ethylene plays an important regulatory role in the natural control of leaf abscission and that it is also a common metabolic product of micro-organisms and of diseased or injured plant tissue. Valencia (1970) showed that defoliation in coffee caused by Cercospora coffeicola (brown eye spot) was associated with raised ethylene levels in the leaves. It is therefore reasonable to suppose, that natural leaf abscission in arabica coffee is also finally mediated by ethylene and that ethylene levels in unsprayed leaves are higher due to its production by the leaf micro-flora and by the minute injured leaf tissue caused by the fungal elements of this micro-flora (the weak spots, which are absent on tonic-sprayed leaves).

It would be extremely difficult to determine endogenous ethylene levels of coffee leaves under field conditions. Instead we resorted to foliar applications of CEPA (2-chloroethane phosphonic acid) which releases ethylene gas in vivo and is known to cause leaf abscission on coffee. Leaves of unsprayed trees should be more responsive to CEPA applications since thresholds for ethylene levels to induce leaf abscission would be reached more quickly. Also genotypes which have a longer natural leaf retention, because they are expected to have higher thresholds of ethylene levels, should be less responsive to exogenous ethylene. These studies have been published elsewhere (Van der Vossen & Browning, 1978) and it should be sufficient to mention here the main results.

1. It was possible to obtain dose responses of leaf abscission for individual trees by spraying various concentrations of CEPA (250, 500, 1000 and 2000 ppm) to separate branches and dose responses varied with different genotypes (Fig. 1 in Van der Vossen & Browning, 1978).
2. Water stress is known to stimulate ethylene production in plants and for arabica coffee it was found that under conditions of severe water stress leaf abscission became increasingly

responsive to exogenously-applied ethylene (Fig 2 in Van der Vossen & Browning, 1978). Apparently a lower extra dose of ethylene was required in that case to reach the threshold value of ethylene concentration in the leaf required for leaf abscission.

3. Leaves of unsprayed leaves required indeed significantly lower doses of exogenous ethylene for abscission than leaves on tonic-sprayed trees (Fig 4 in Van der Vossen & Browning, 1978). These results provide indirect evidence for the role of the leaf micro-flora in premature leaf fall in arabica coffee.
4. There were marked genotypic differences in thresholds for leaf abscission as indicated by CEPA induced leaf fall, but in the available germ plasm of *C. arabica* very few genotypes were more resistant to premature leaf fall than the locally selected cultivar SL 28.

The two factors which contribute to accelerated senescence in coffee leaves - water stress and the activity of the leaf micro-flora - appear to act through the same mechanism of increasing the endogenous ethylene levels in the leaves. The water stress experienced by coffee trees growing in Kenya is probably so very much greater than by coffee trees growing in their natural environment of the Ethiopian forests that genotypes may not exist at present which will perform better under Kenyan conditions than the already selected local cultivars such as SL 28. Selection pressure for tolerance to higher ethylene levels must have been particularly severe since selection of these cultivars took place before tonic sprays with fungicides became general practice in Kenya. It thus appears that with these cultivars the upper limits of selection for high endogenous thresholds for leaf abscission within arabica coffee have already been approached. But even with a cultivar like SL 28 the tonic effect of fungicides on leaf retention and subsequent yield increases is still very pronounced. It is concluded therefore that tonic sprays of fungicides will continue to be effective in Kenya in increasing yield even after the introduction of new disease-resistant cultivars.

The answer to the second question is given by the results of a field experiment with 12 progenies of the main breeding programme and two standard cultivars, which gave a full range of completely resistant to highly susceptible coffee trees for both CBD and Leaf Rust. The trial was laid out according to a randomised complete block design in 4 replications and with split plots. The trees in one half of each plot received a tonic spray of a mixture of 0.5% Copper and 0.2% Captafol twice a year. The other half of each plot never received any fungicide applications. There were highly significant main and sub-treatment effects for yields and incidence of CBD and Leaf Rust while also the interaction effects between progenies and tonic sprays were significant. Occasional fungicide sprays did indeed dramatically increase the severity of CBD and Leaf Rust but only on susceptible genotypes. The tonic effect of fungicide increased yields, cumulative over the first four years of production, by 80 - 90% in the resistant progenies. However, the positive effect of tonic sprays in susceptible cultivars or progenies was masked by the tremendously increased CBD infection, so that the non-sprayed sub-plots produced slightly more than the tonic sprayed ones.

Tonic sprays are in fact very useful in our breeding programme, since the increased infection differentiates CBD and Leaf Rust susceptible genotypes more efficiently from resistant ones in the selection fields.

On the other hand, a few fungicide sprays can be safely applied in new disease resistant cultivars to obtain the benefits of the tonic effect, as there is no indication that this would increase the risk of CBD and Leaf Rust infection in resistant genotypes.

R e f e r e n c e s

Gillet, S (1942). Results and observations of spraying trials using bordeaux mixture on coffee at the Scott Agricultural Laboratories. Monthly Bulletin of the Coffee Board of Kenya 1: 30 - 31.

Griffiths, E (1972). Negative effects of fungicides in coffee. Tropical Science 14: 79 - 89.

Mulinge, S K & E Griffiths (1974). Effects of fungicides on leaf rust, berry disease, foliation and yield in coffee. Trans. Brit. mycol. Soc. 62: 495 - 507.

Rayner, R S (1957). Tonic spraying of coffee. Proceedings of the Nairobi Scientific and Philosophical Society 9: 12 - 15.

Van der Vossen, H A M & G Browning, 1978). Prospects of selecting genotypes of Coffea arabica L. which do not require tonic sprays of fungicide for increased leaf retention and yield. Journal of Hort. Science 53(3): 225 - 233.

RELATIONSHIP BETWEEN GENETICS AND CHEMISTRY IN THE SYSTEM *COFFEA* SPP./*HEMILEIA VASTATRIX*

S. SIEVERS**, E. ABLANQUE, E. BAUTISTA, F. CHAPARRO, J. GUTIÉRREZ,
J. HAVERKAMP***, E. MORENO, M. DE PEÑA, E. POSADA,
MA. L. ROJAS, B. SPETTEL****, V. ZAMUDIO, M. QUIJANO RICO*

* LIQC, Laboratorio de Investigaciones sobre la Química del Café y de los Productos Naturales de la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia.

** GTZ, German Agency for Technical Cooperation.

*** FOM, Institute for Atomic and Molecular Physics, Amsterdam, Holland.

**** MPI, Max Planck Institute for Chemistry, Mainz, Federal Republic of Germany.

In the Research Laboratory of the National Federation of Coffee Growers of Colombia (LIQC), Bogotá, a research project (Quijano-Rico, 1977) on resistance of coffee against *Hemileia vastatrix* has been initiated, which is also supported by the German Agency for Technical Cooperation (GTZ).

The first phase of the project which passed in absence of the pathogen was mainly concerned with the exploration and establishment of methods. The collaborating laboratories were Phillips Duphor's, Grave land and FOM Institute of Atomic and Molecular Physics (Amsterdam, Netherlands), the Coffee Rust Research Center (Oeiras, Portugal), the Applied Research Laboratories (Dearborn, Michigan, USA), the Max Planck Institute for Chemistry (Mainz, Federal Republic of Germany), the Biological Institute (São Paulo, Brazil) and CENICAFE (Chinchiná, Colombia). The cooperation of these institutes which is gratefully acknowledged, allows us to present some preliminary results.

Controlled thermal degradation patterns of coffee leaf and rust uredospore samples studied by pyrolysis-mass spectrometry.

Pyrolysis-mass spectrometry was suggested by Dr. Marco Quijano-Rico and first used by Dr. H.L.C. Meuzelaar (1979) for the study of coffee rust races. The facilities of the FOM were used in order to examine samples of coffee leaves and rust uredospores. Basically the technique consists in the controlled thermal degradation of the non-volatile biological material, resulting in a mixture of largely volatile products (pyrolysates), which are further analyzed by mass spectrometry. The resulting mass spectra give information about the relative contents of organic constituents such as amino acids, sugars, phenols, etc., by taking into account the peak series representative of each reference compound. Numerical evaluation by special computer programmes of the patterns obtained results in distance matrices which can be visualized in two dimensional non-linear maps (Eshuis, et.al., 1977).

Comparisons of leaf samples by pyrolysis-mass spectrometry show a clear distinction of the subsections Erythrocoffea (*C. arabica*, *C. canephora*, *C. eugenioides* and Híbrido de Timor) and Pachycoffea (*C. liberica* and *C. dewevrei*) with the exception of the variety Sumatra of *C. arabica* which was inconsistent. Within Erythrocoffea the species *C. eugenioides* was well separated (from *C. arabica* and *C. canephora*, the latter two showing higher similarity).

When uredospore -*H.vastatrix*- samples (kindly provided by Dr. C.J. Rodrigues, CIFC, Portugal) of races I (v₂,v₅), II (v₅), III (v₁,v₅), XV (v₄,v₅) and XXIV (v₂,v₄,v₅) were analyzed, the intraracial variation (different isolates of the same race) was found to be higher than the differences between races.

A more profound study using uredospores and uredogermings grown and kept under controlled conditions will be necessary.

Samples of healthy and rusted leaves were analysed after different times of infection. Separation was obtained only after prolonged times (35 days and larger) of infection.

Semi-quantitative analysis of the changes which had occurred in these samples showed higher amounts of proteins, polyphenols and amino sugars as compared to healthy and more recently infected leaves, the latter showing relatively higher contents of neutral polysaccharides. The data obtained so far suggest that pyrolysis mass spectrometry is a sensitive technique for studying the chemical composition of coffee leaves and rust uredospores. It could possibly contribute to our understanding of specificity in host pathogen recognition.

Bioelement content of leaves from different coffee species.

Bioelement contents of coffee fruits have been correlated with the quality of the beverage (Ferreira, et.al., 1971) and genetics (Quijano-Rico and Spettel, 1975). In order to study the genetical control of bioelement content of leaves, plants from several coffee species and some *C. arabica* varieties grown in two different localities of Colombia were analysed with respect to their content of 21 bioelements. Using plastic gloves, the second leaf pairs of each 10 trees from 3 different altitudes (upper, middle, lower) were carefully washed with distilled and double-distilled water, dried with clean filter paper and collected into previously washed polyethylene bags.

The samples consisting of 60 g of representative leaves were dried and the homogenized. For drying, a combination of microwave heating and vacuum was found to result in maximal fragility of the leaves for manual homogenization within the bags.

The following species and varieties were compared. *C.canephora*, *C. liberica*, *C. dewevrei*, *C. eugenioides*, Híbrido de Timor and the *C. arabica* varieties: Typica amarillo, Caturra amarillo, Catuay rojo, Borbon rojo, Sumatra, Laurina and Caturra x Híbrido de Timor (Catimor).

Three of them, *C. canephora*, *C. liberica* and *C. arabica* var. Typica, were studied from both localities.

Two methods were employed to analyse the bioelement content: inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (JCP-AES) measurements (13 bioelements) were done in the Applied Research Laboratories, Dearborn, Michigan, USA, and instrumental thermal neutron activation (NAA) analysis (15 bioelements) was performed in the Max Planck Institute for Chemistry, Mainz, West Germany. Six of the bioelements were estimated by both methods.

Table 1 gives a comparison of the data obtained by the two different methods for *C. arabica* var. Caturra and *C. canephora* (intermediated altitude). Values given in ppm ($\mu\text{g/g}$ of dry weight).

The two methods led to essentially the same results.

The three species which were sampled in both localities showed considerable differences, possibly because of environmental influences on the bioelement concentrations. Comparing the three altitudes of the trees, the higher trees like *C. liberica* were found to have a greater variation as compared to small trees like *C. arabica* var. Typica. The intermediate altitude samples were representative for the average content of the three altitudes.

TABLE 1: Comparison of bioelement contents in leaf samples measured by atomic emission spectroscopy (AES) and thermal neutron activation analysis (NAA)

Element	C. arabica var. Caturra		C. canephora	
	NAA	AES	NAA	AES
Ca	7559	7496	12636	12237
K	18300	19859	21000	21749
Fe	60.4	61.4	67.65	52
Mn	171	170	81.9	73.5
Zn	5.65	6.6	7.6	7.7
Ba	20.1	40.4	31	30.35

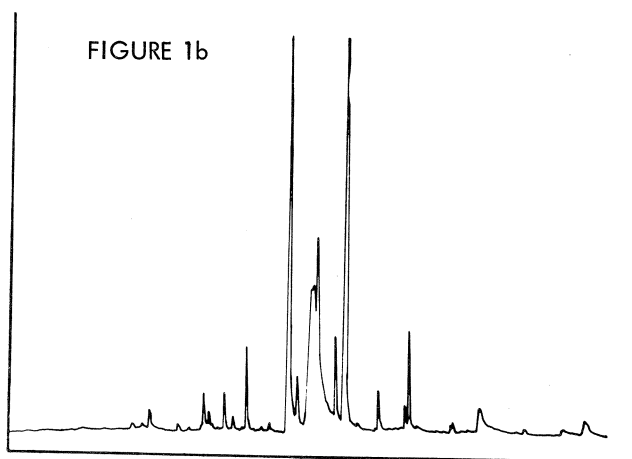
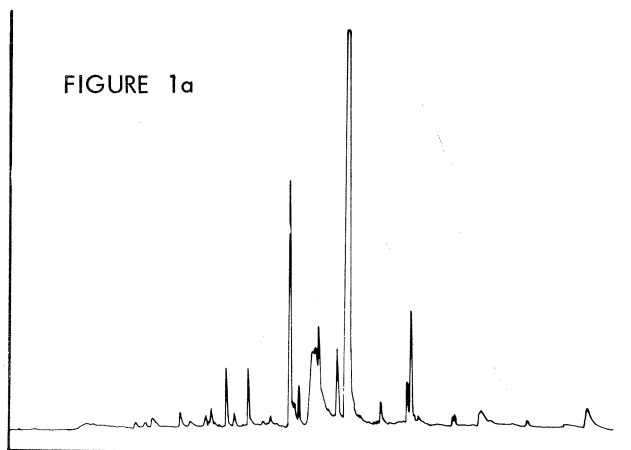
Because of the limited number of leaf samples studied up to now, a definite conclusion on a genetical control of the differences observed can not be ascertained. Tissue culture samples in different stages of redifferentiation are being analysed to further support the hypothesis of genetical control.

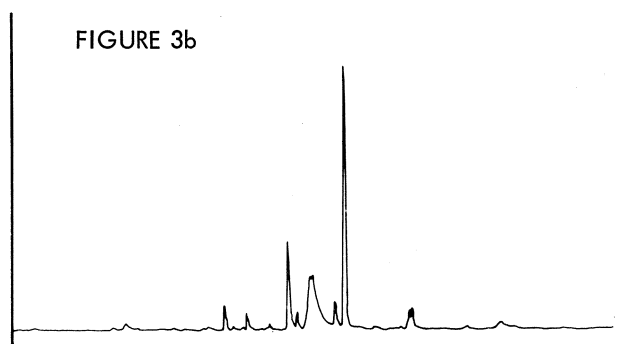
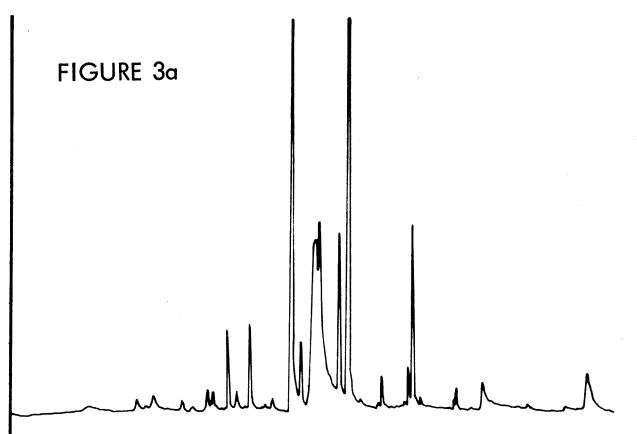
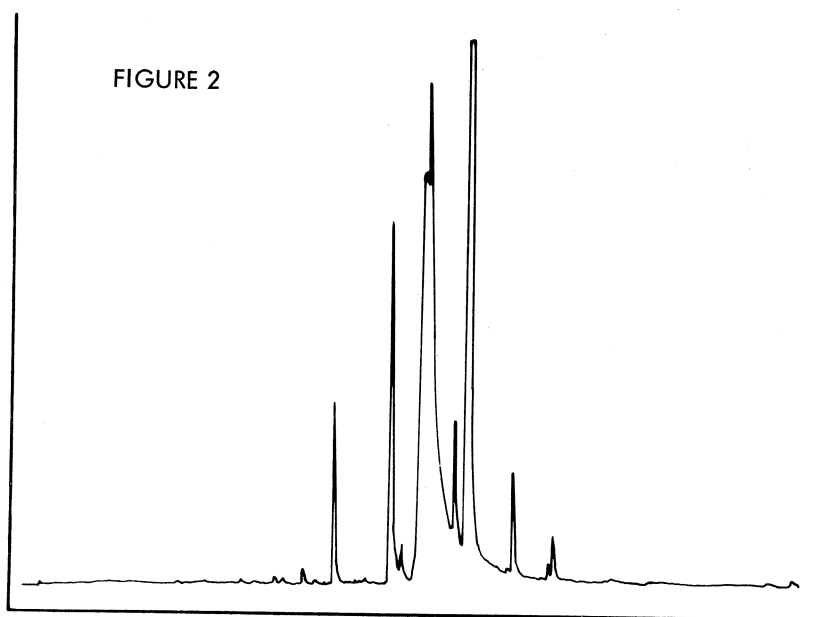
For the collaboration concerning the determination of the bioelements using thermal neutron activation analysis, the authors are thankful to Professors Dr. G. Herrmann, Institute for Nuclear Chemistry, J. Gutenberg Universitaet and Dr. H. Waenke, MPI for Chemistry in Mainz, FRG.

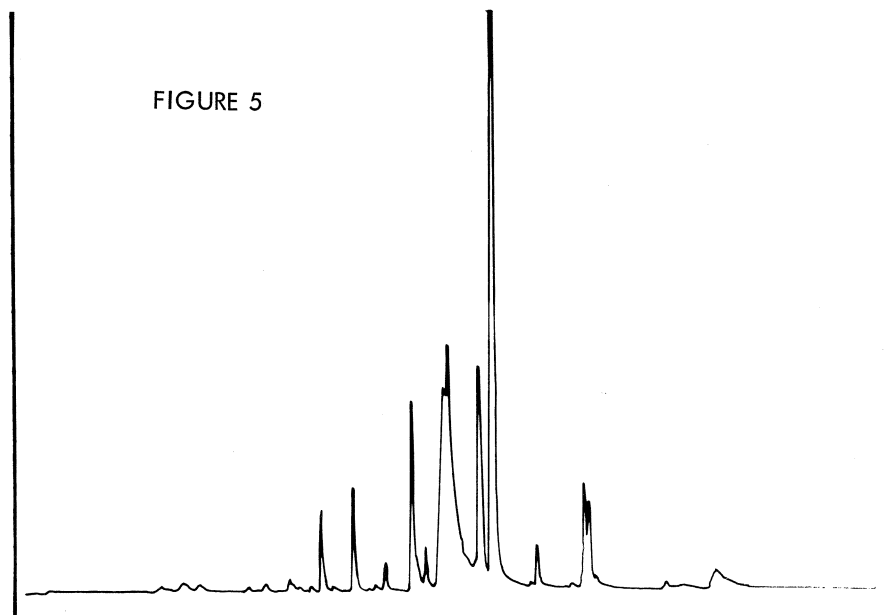
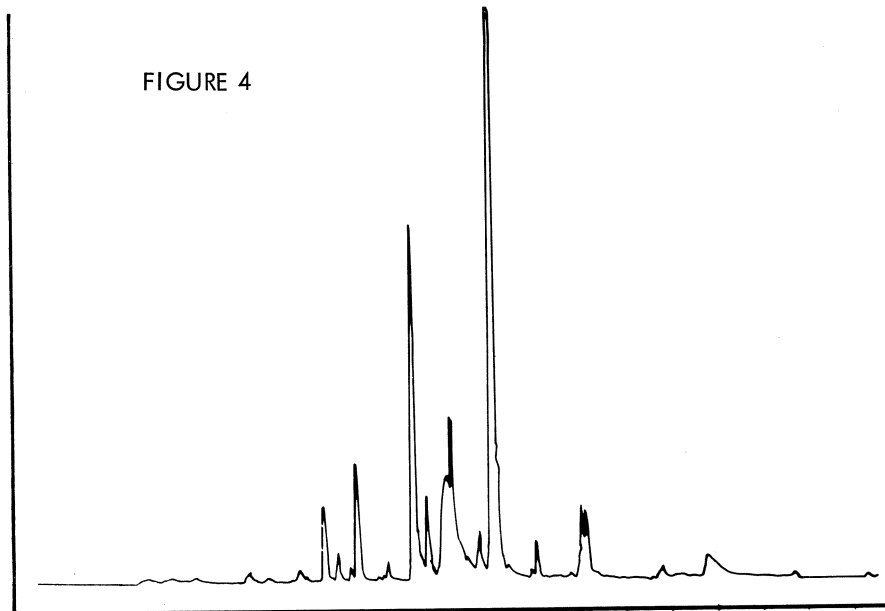
Volatile compounds from coffee leaves

Volatile leaf constituents form a part of the biotope of rust fungi on the leaf surface and within the intercellular spaces (sub stomatal cavities) of the host leaves. The formation of infection structures in vitro of the wheat rust fungus Puccinia graminis f. sp. tritici (race 32) is stimulated by volatile leaf constituents within a small concentration range, whereas secondary hyphae formation is inhibited (Grambow, 1977). Although the majority of the complex active volatile leaf compounds like hexenols are of ubiquitous occurrence in higher plants, considerable variation has been observed in closely related varieties. The stimulatory action of the volatile leaf constituents on wheat rust differentiation depends on the presence of a non-volatile phenolic leaf fraction, whereas the inhibitory effect does not. Both volatile and non-volatile leaf constituents are candidates for being involved in the expression of resistance in host-pathogen interactions. In collaboration with Dr. Grambow (RWTH, Aachen, West Germany) and Dr. Moraes (São Paulo, Brasil), we are planning to investigate the effect of volatile coffee leaf compounds on the differentiation of Hemileia vastatrix Berk et. Br. Apart from the complex hexene-derivatives smaller molecules like the phytohormone ethylene will be studied. A method which permits the isolation, gas chromatographic separation and identification of coffee leaf volatiles was developed. Leaf discs of about 2.3 cm² were cut and kept in sealed glass vials under liquid nitrogen until used. For the isolation of the volatile fraction, the frozen leaf discs were put in a glass trap and left for 5 minutes until room temperature was reached. The volatile head space was removed within 10 minutes using a helium flow of 60 ml/min and adsorbed to 120 mg of tenax (60 mesh). After connecting the tube to the injection point of the gas chromatograph, the volatiles were desorbed from the tenax within 20 minutes by heating the tube up to 250°C, passing a helium flow at the same time. The volatiles were condensed at the top of the precooled capillary chromatograph column (-40°C) and separated by continuously heating (2°C/min) the column up to 140°C.

The gas chromatogrammes obtained were reproducible if discs from the same leaf or leaf pair were analysed. Leaves of different ages or different plants showed considerable quantitative differences, which suggests the use of more homogeneous plant material like seedlings. Leaves of second leaf pairs from different Coffea species were compared, such as *C. arabica* var. BA-8, Híbrido de Timor, Caturra x Híbrido de Timor, *C. racemosa* and *C. liberica* resulting in the gas chromatogrammes shown in Figures 1-5. Gas chromatogrammes of coffee leaf samples:







- 1a: C. arabica var. BA-8 L 105-1839 (group E)
- 1b: C. arabica var. BA-8 L 105-2181 (group G)
- 2: C. liberica var. arwivensis
- 3a: Caturra x Híbrido de Timor 74/8 - 712 (group E)
- 3b: Caturra x Híbrido de Timor 75/1 - 1048 (group A)
- 4: Híbrido de Timor I 574 (group A)
- 5: C. racemosa 1345/1 (group F)

The plant material was kindly provided by Dr. J. Castillo-Z., director of the plant breeding section of CENICAFE, Caldas (Colombia).

As can be seen in the figures, the qualitative composition of the volatile fractions is similar but quantitative differences are striking. The chemical composition of the volatile leaf fractions will be analysed using reference substances. In addition to gas chromatography, mass spectrometry is employed. Special attention will be paid to the ethylene/ethane evolution after wounding and infecting coffee leaves (Eltner and Konze, 1976).

Oxidative enzymes in coffee leaves

Although a specific role of peroxidases and polyphenoloxidases in rust resistance has not yet been established (Yamamoto, et.al., 1978), changes in enzyme activities and isoenzymes have been observed in host-rust interactions. Guedes and Rodrigues (1974) correlated the physiological groups of coffee with the gel electrophoresis patterns of fenoloxidase isoenzymes from healthy leaves.

In the laboratory of Dr. Walkyria Moraes, São Paulo, two near isogenic C. arabica varieties which differ in S_H2 (Mundo Novo and Mundo Novo x Kent) were examined with respect to peroxidase activity of soluble leaf proteins after inoculation with uredospores of H. vastatrix. No increase in peroxidase activity was observed, neither in the resistant nor the susceptible variety, within 38 hours after inoculation. After prolonged times (several weeks) a twice higher enzyme was found in infected susceptible leaves.

Working with field plants in Colombia, we find significantly higher soluble peroxidase activity in healthy second leaf pairs of the Timor hybrid and C. canephora, than in C. arabica, lowest values being demonstrated by C. racemosa. The enzyme activity is about 6 times higher in the Timor hybrid (group A) than in C. racemosa (group F). No such difference is observed comparing polyphenoloxidase activities, Table 2.

10-20 g of second leaf pairs were taken from a intermediate altitude of the trees, washed with distilled water, dried and stored under liquid N₂ until used. The frozen leaves were homogenized in the presence of 10 volumes of cold acetone (-20°C), filtered by suction and repeatedly washed with an excess of acetone. The residue was dried in the cold (+4°C) and stored at -20°C until further processed. The "acetone dry powders" were solved in phosphate buffer 0.1M, pH 7.5, for peroxidase 6.8 for polyphenoloxidase, 0.1% Na₂ S₂ O₅ and the soluble proteins obtained by ammonium sulfate precipitation of the supernatant after centrifugation (30 min, 20000 x g, 4°C). Protein was determined with the Folin reagent. Enzyme activities were spectrophotometrically estimated, using 60mM guaiacol (and additionally 0-dianisidine 0.01%) 0.06% H₂O₂ in citrate buffer (0.05 M, pH 5.5) with 0.1 mg of protein (room temperature) for peroxidase and for polyphenoloxidase using 0.08% L-Dopa and 0.1M pyruvate in 0.1 M phosphate buffer pH 6.8 with 1 mg of protein (37°C, aerated with oxygen. H₂O₂ evolution was inhibited using 0.1M sodium pyruvate): The latter method was standardized by Patricia Martínez and Patricia Restrepo, students of the National University, Bogotá, and is subject of their thesis.

The plant material was kindly provided by Dr. Castillo-Z., director of the plant breeding section of CENICAFE, Chinchiná (Colombia).

TABLE 2: Peroxidase and Polyphenoxidase activities in leaves from individual trees.

Cultivar	Peroxidase		Polyphenoxidase	
	a	b	c	d
Híbrido de Timor	12.2	13.5	3.65	3.9
I 574	16.3	12.9	3.2	
	8.2	8.8	2.1	
	16.1	17.2	2.25	
	10.9	10.3	1.4	
I 571	9.0	11.0	2.1	
	8.6	10.7	2.0	
	8.5	11.3	1.45	
C. canephora	6.2		2.65	2.85
	5.8			
C. arabica var. típica	3.14		1.15	1.35
"	1.78			
caturra	2.21			
"	4.9		1.50	1.9
Caturra x H. de Timor	1.72			
"	1.95			
"	2.77			
74/8-712 (E)	4.3		2.0	
75/1-1048 (A)	3.2		1.25	
C. racemosa	0.95		1.1	1.5
	1.3	1.29	1.5	
	1.34			
I345/1	3.2	3.26	1.35	
	2.72	2.53	1.85	
	1.13	1.9	2.5	
I345/3	1.6	1.75		
	4.9	5.1	1.85	
	1.15		1.1	
	2.29			

The values are given as specific activities, peroxidase a) with guaiacol $\Delta A_{470}/\text{mg} \times \text{min}^{-1}$; b) with ortho-dianisidine $\Delta A_{460}/\text{mg} \times \text{min}^{-1}$; polyphenoxidase with L-Dopa $\Delta A_{410}/\text{g} \times \text{min}^{-1}$ c) with pyruvate d) without pyruvate. Protein was estimated using the Folin reagent.

These experiments will be repeated with more homogeneous plant material, which has not been available up to now.

The methods for recording other enzymes of phenol and oxygen metabolism are being standardized and the effect of inoculation with *H. vastatrix* on these enzymes will be studied in collaboration with Dr. Moraes in Brazil, due to the absence of the pathogen in Colombia.

Coffee Tissue Culture

The most adequate conditions for the culture of *Coffea* callus and cell suspensions were determined, using explants of stems and leaves from *C. arabica*, varieties Caturra rojo and Borbon amarillo. The explants were cultured in basal medium (Murashige and Skoog, 1962) which was supplemented with B5 vitamins (Gamborg et. al., 1968), 8 mg/l of kinetin and 1 mg/l of 2,4 - dichlorophenoxyacetic acid, and were incubated in the dark at 28°C. Subcultures were done every 25-35 days. A good callus production was achieved.

Moreover, tissue cultures were obtained from leaf explants of several other *C. arabica* varieties, as well as other *Coffea* species and hybrids, which differ in their reaction towards coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) belonging to the physiological groups:

- A) (totally resistant, factors unknown): Híbrido de Timor, Caturra x Híbrido de Timor, *C. canephora* (resistance not proven).
- C) (SH1/SH5): *C. arabica* var. Kent's, Mattu S-7.
- D) (SH2/SH5): *C. arabica* var. Kent's 198
- E) (SH5/SH5): *C. arabica* var. Mundo Novo, Catuay, Tipica, Borbon (resistant to *Ceratocystis fimbriata*) Caturra x Híbrido de Timor, Kent's, Kent's 198, BA-8, Cioccie S.6 Mattu S-7.
- F) (no vertical resistance): *C. racemosa*
- G) (SH3/SH5): *C. arabica* var. BA-8.
- J) (SH4/SH5): *C. arabica* var. Kaffa T.I., Cioccie S.6

This material was kindly supplied by Dr. J. Castillo Z., director of the plant breeding section of Cenicafé, Caldas, Colombia (Castillo, et.al., 1976).

A program on plant regeneration (Söndahl and Sharp, 1976) was initiated in order to provide us with homogeneous plant material for biochemical investigations.

Conclusions

Methods have been studied and partly established which allow the estimation of overall chemical composition, bioelement contents, volatile compounds, oxidative enzymes and tissue culture of samples from coffee leaves. More work in collaboration with other laboratories is needed to understand the problem of coffee leaf rust resistance and how coffee as a mayor crop plant can be better protected.

References

- Castillo, Z.J., Moreno, R.G., López, D.S.: Uso de resistencia genética a *Hemileia vastatrix* Berk y Br. existente en germoplasma de café en Colombia. Cenicafé (Colombia) 27 (1), 3-25 (1976).
- Elstner, E.F., Konze, J.R.: Effect of point freezing on ethylene and ethane production by sugarbeet leaf discs. Nature 263, 351-352 (1976).
- Eshuis, W., Kistemaker, P.G., Meuzelaar, H.L.C.: Some numerical aspects of reproducibility and specificity. In: "Analytical Pyrolysis", eds. C.E.R. Jones and C.G.A. Cramers; publ. Elsevier Scientific Publ. Cy., Amsterdam (1977), pp. 151-166.

- Ferreira, L.A.B., Fragoso, M.A.C., Peralta, M.F. et.al.: Constituentes minerais dos cafés de Angola. 5th. Colloquium of ASIC, Lissabon (1971).
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K.: Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50, 151-158 (1968).
- Grambow, H.J.: The influence of volatile leaf constituents on the in vitro differentiation and growth of Puccinia graminis f. sp. tritici. *Z. Pflanzenphysiol.* 85 (4), 361-372 (1977).
- Meuzelaar, H.L.C.: Potential applications of pyrolysis mass spectrometry in coffee rust research. In: Coffee rust control, report on a seminar held in Paipa, Colombia; Eschborn, West Germany, 1979, p. 181-193.
- Murashige, T., Skoog, F.: A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497 (1962).
- Quijano-Rico, M.: Scientific research program of LIQC on the so-called coffee rust disease (1977). In: Coffee rust control, Report on a Seminar held in Paipa, Colombia. Ed. by German Agency for Technical Cooperation (GTZ) Eschborn, FRG, 1979.
- Quijano-Rico, M., Spettel, B.: Determinación del contenido en varios elementos en muestras de cafés de diferentes variedades. 7o. Coloquio de la ASIC, Hamburgo (1975).
- Söndahl, M.R., Sharp, W.R.: High frequency induction of somatic embryos in cultures leaf explants of Coffea arabica. *Z. Pflanzenphysiol.* 81 (5), 509-514 (1976).
- Yamamoto, H., Hokin, H., Tassi, T.: Peroxidase and polyphenoloxidase in relation to crown rust resistance in oat leaves. *Phytopath. Z.* 91, 193-202 (1978).

THE MECHANIZATION OF COFFEE PRODUCTION

A. G. WATSON, Phd

Director of agricultural development

FMC do Brasil, 13100 Campinas, S.P.

INTRODUCTION

FMC do Brasil decided in 1978 to embark on a program of design and testing in order to be able to produce equipment which would be useful in the mechanization of operations involved in the production of coffee.

This decision was taken after a thorough study which convinced us that the coffee crop in Brazil and probably in other countries, will become progressively more mechanized and intensified (technified) in future years.

OBJECTIVES

Our first objective was the development of machinery capable of harvesting coffee in a commercially acceptable manner in Brazilian coffee plantations as they exist in Brazil today.

PROTOTYPES

Accordingly, two prototypes were built and tested in 1979. These were the model MC 3500, "over-the-row" machine, depicted in figures 1) and 2) and the model MC 1500 T, semi-mounted, tractor-pulled machine.

The MC 3500 machine straddles the coffee row. It has an external height of 3.8m and can accommodate coffee trees up to 3.5m high. It has an external width of 3.0 and an internal width of 1.5m. It is 6.2m long and weighs 6.500Kg.

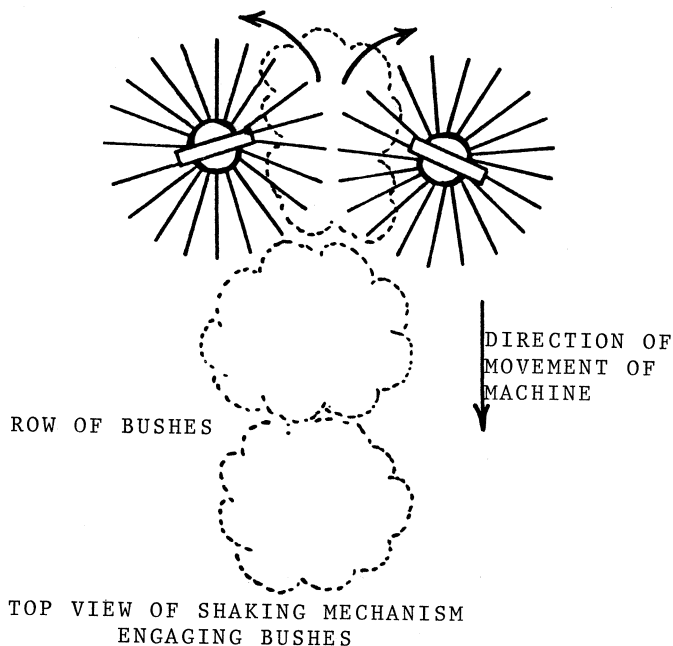
The machine is powered by a 105hp Diesel engine with 4 wheel hydrostatic drive. It can be leveled in all direction, hydraulically, and has a turning circle of 3.5m.

The mechanism for fruit removal consists of two cylinders, about 2m long, bearing a variable number of rings of fiber glass fingers, 60cm long, projecting into the coffee bushes from opposite sides. These cylinders are

borne on the "over-the-row" frame, one of each side of the bushes and they impart an oscillation, adjustable in cycles per minute and amplitude to the fingers, through rotation of eccentric weights on one end. The cylinders rotate freely and are turned by contact with the bushes as the machine travels down the row. This fruit removal system is illustrated in diagram 1.

DIAGRAM NO 1

ROTATION OF CYLINDERS CARRYING VIBRATING
FINGERS

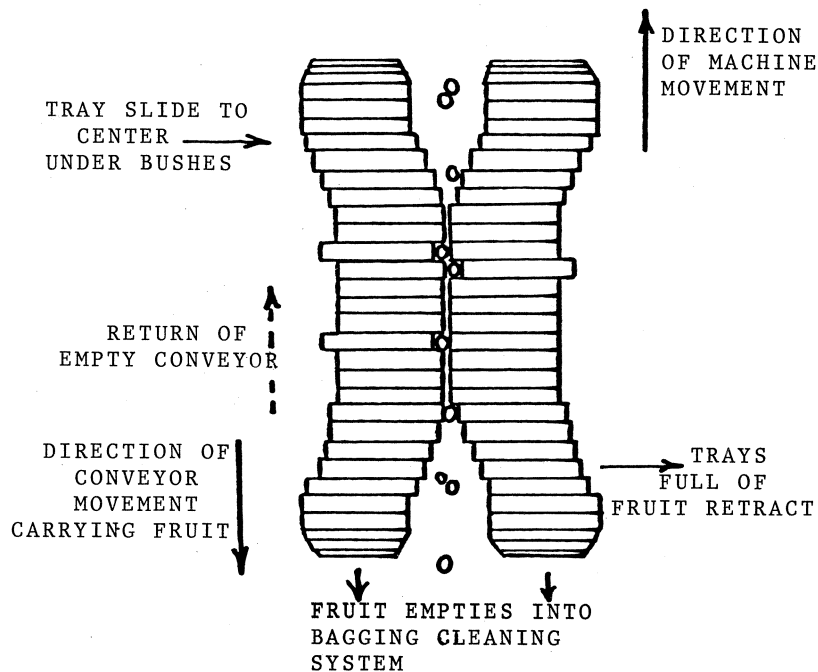


Coffee fruit removed from the bushes by the shaking fingers are caught by a sliding tray conveyor which forms an almost complete catching carpet under the branches. The two halves of the conveyor are carried at a height of about 25cm above the ground, one half of each side of the bushes. The individual trays making up the conveyor slide towards each other, joining around the main stems of the bushes being shaken. As the machine moves forward, the upper section of the conveyor in contact with the bushes moves backwards, and the trays retract and empty the fruit into a cleaning-bagging system. The speeds of the conveyor and the machine are synchronized so that the forward movement of the machine and the lower, return section of the retracted conveyor are the same; the speed of the upper-section of the conveyor is therefore equal but in a reverse direction to the machine movement and the conveyor trays in contact with the bushes have a zero movement in relation to the bushes. The conveyor is illustrated in diagram 2.

The MC 1500 T machine is a semi-mounted, tractor pulled machine which carries a continuous tree shaker along the row of coffee bushes shaking one side only.

The fruit removal mechanism is almost identical to that used in the "over-the-row" machine, except that there is only one cylinder borne on semi-mounted trailer.

DIAGRAM Nº 2



TOP VIEW OF FRUIT CATCHING MECHANISM IN OPERATION

PERFORMANCE TESTS

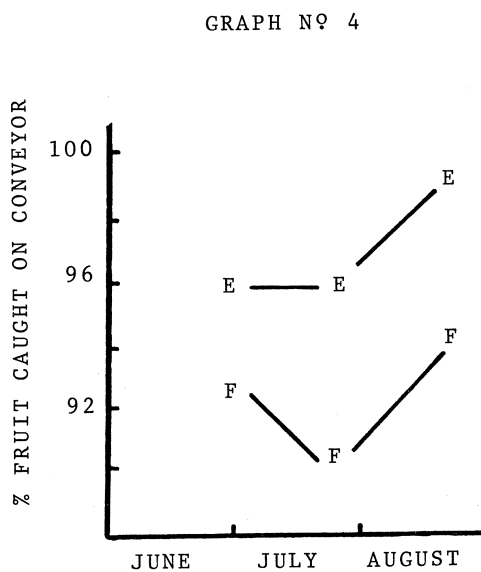
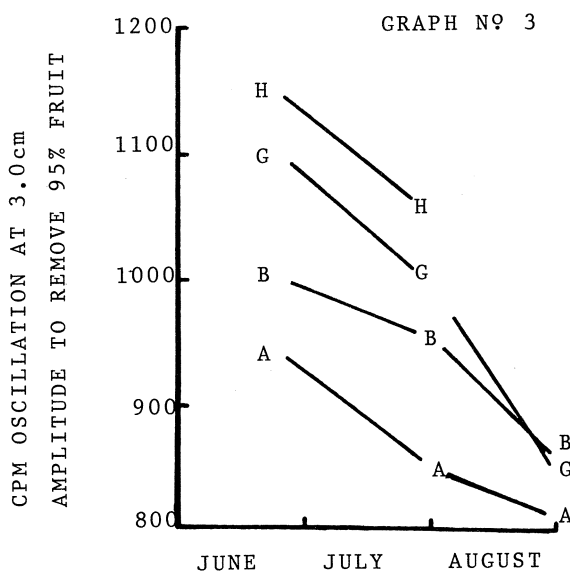
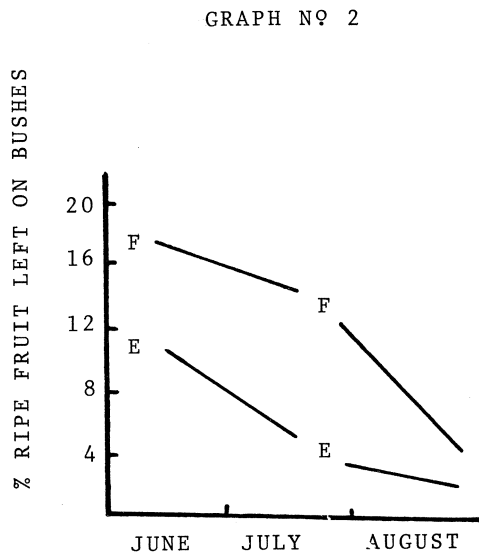
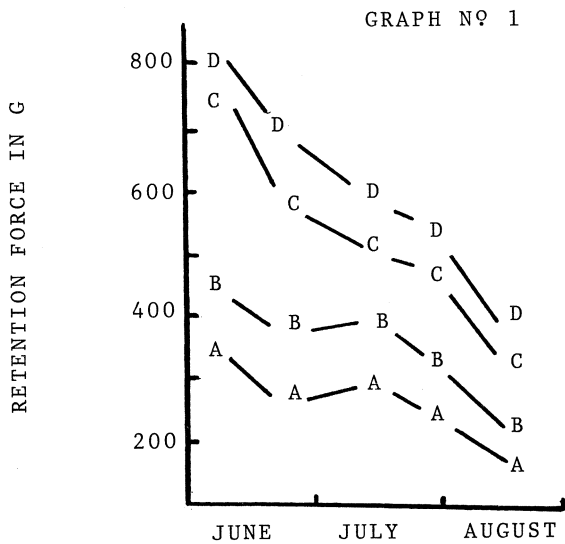
The retentive forces holding green and ripe coffee fruit to the branches in varieties Catuaí and Mundo Novo were measured using a sensitive dynamometer during the period June through August 1979 in three locations in São Paulo State. The results of these measurements are shown in graph 1.

The percentage of ripe fruit removed by the shaker mechanism on the MC 1500 T machine operating to apply an oscillation of 3.0cm amplitude at 850cpm at a "down-the-row" speed of 2.200 to 3.000m per hour at different times in the season was measured. The results are shown in graph 2.

The twin shaker mechanism on the MC 3500 was even more effective.

The different number of oscillations per minute (cpm) at an amplitude of 3.0cm required to remove 95% of ripe fruit and 95% of all fruit (including green fruit), from Catuaí and Mundo Novo, at "down-the-row" speeds of 1.200 meters/hour with the MC 3500 at the beginning of the season and 3.000m/hour at the end of the season, was measured. The results are shown in graph 3.

The efficiency of the catching conveyor on the MC 3500 is affected primarily by the efficiency of closure of the trays round the coffee stems and slightly by the distance of "throw" of the fruit during the shaking process. The results of measurements made in unpruned Catuaí and Mundo Novo during the 1979 season at "down-the-row" speeds of 900 to 1.200m/hour are shown in graph 4.



KEY TO GRAPHS 1 AND 3: A= RIPE NOVO MUNDO, B= RIPE CATUAÍ, C= GREEN MUNDO NOVO, D= GREEN CATUAÍ, G= RIPE AND GREEN MUNDO NOVO, H= RIPE AND GREEN CATUAÍ.

KEYS TO GRAPHS 2 AND 4: E= MUNDO NOVO, F= CATUAÍ.

The percentage of fruit removed, and the proportion of "secho" and "cereja" plus green fruit in the removed fruit, and in the fruit left on the bushes, was measured after applying oscillations of different cpm at an amplitude of 3.0cm with the MC 3500. These measurements were made in São Carlos, São Paulo State on August 16, 1979 at a "down-the-row" speed of 2.100m/hour. The results are shown in the table nº 1. ("Cereja"= mature, ripe, cherry fruit; "Secho"= fruit at various stages of drying from the "cereja" condition).

TABLE Nº 1: PERCENTAGE REMOVAL OF FRUIT AND PROPORTION OF "SECHO" AND "CEREJA" PLUS GREEN IN REMOVED AND REMAINING FRUIT AT DIFFERENT CPM AT 3.0cm AMPLITUDE.

CYCLES PER MINUTE	850	900	950	1000
AMPLITUDE cm	3.0	3.0	3.0	3.0
TOTAL % REMOVED	96.9	97.3	98.05	98.6
% "SECHO" IN REMOVED	93	93	92	91
% "CEREJA" AND GREEN IN REMOVED	7	7	8	9
TOTAL % REMAINING	3.10	2.7	1.95	1.4
% "SECHO" IN REMAINING	62	60	67	63
% "CEREJA" AND GREEN IN REMAINING	38	40	33	37

CONCLUSIONS OF PERFORMANCE TESTS

- 1) Fruit of variety Catuaí is slightly more difficult to remove than Mundo Novo fruit.
- 2) "Secho" fruit is the most easily removed followed by "cereja" with green fruit the least easily removed.
- 3) The shaker mechanism operating with an oscillation of 3.0cm amplitude, within a range of cpm from 800 to 1.150 and at a "down-the-row" speed of between 1.200 and 3.000m/hour removed 95% of coffee at all stages of maturity in varieties Catuaí and Mundo Novo during the period June through August 1979.
- 4) The shaker-mechanism was selective, and by adjusting the cpm of the oscillation green fruit could be left on the bushes while ripe fruit were shaken off.
- 5) 96 to 99% of coffee shaken from unpruned Mundo Novo was collected on the sliding tray at an operating speed of up to 1.200m/hour.
- 6) 90 to 94% of coffee shaken from unpruned Catuaí was collected at the same operating speed.
- 7) The low, spreading skirt-branches in unpruned Catuaí tend to prevent complete closure of the sliding tray conveyor causing the higher percentage loss of fruit in this variety. Undoubtedly pruning of bushes to remove all lateral branches up to 25cm above the ground would improve the percentage of fruit collected.
- 8) The MC 3500 had a working capacity of about 3ha per day and the MC 1500 T had a working capacity of about 1.5ha per day. This was in coffee with 4m between the rows and about 1.200 "covas" (= groups of 2-3 trees) per ha.

PLANS FOR 1980 AND BEYOND

Work is continuing on an improved "over-the-row" model, MC 4000 and the MC 1500 T with some commercial harvesting taking place even as this paper is being presented.

Plans for producing equipment to mechanize other operations using the self propelled "over-the-row" frame and the semi-mounted trailer as the basic vehicles are at a late design stage.

Tests are underway to evaluate the long term affect on the coffee crop, both in terms of quality and total yield, of the application of the integrated mechanization system which has been designed.

The fully, or partially mechanized operations which are envisaged are spraying, trimming, selective pruning, cultivation, mulching and application of granular fertilizers and insecticides.

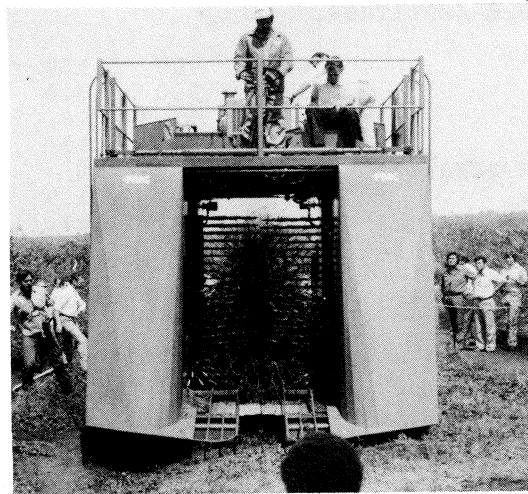


Fig. N° 1) Front view of harvester leaving a row of coffee.



Fig. N° 2) Rear view of harvester turning into a row showing bagging-stations on each side.

ESTUDIO POR ESR DE LA EXTRACCIÓN DE CAFÉ A ALTAS TEMPERATURAS

J. DÍAZ S., P. RUIZ O.

Departamento de Física

Universidad Nacional

Bogotá, Colombia

1. INTRODUCCION

Actualmente no se sabe con absoluta certeza si el proceso de extracción del café es solamente un proceso físico o si en él ocurren también reacciones químicas.

El Profesor H. Streuli ha encontrado que los extractos caseros y los industriales se diferencian claramente en cuanto al contenido de mono y oligosacáridos. Además, el pH de los extractos líquidos industriales es siempre más bajo que el pH de los extractos normales del mismo café. Estos hechos constituirán un indicio de que efectivamente en el proceso de extracción ocurrirán reacciones químicas.

Ya que en el proceso de extracción se generan Radicales Libres RL (La Concentración de Radicales Libres CRL en la bebida es del orden de 10^{12} spins/g), se puede estudiar la CRL en función de los diferentes parámetros de extracción (especialmente de la temperatura) con el fin de obtener información acerca de posibles cambios químicos que pudieran ocurrir en dicho proceso.

2. METODO EXPERIMENTAL

Las muestras de café verde utilizadas en estos experimentos (Clase Arábica, variedad Caturra ; zona de cultivo : Mesitas (Cundina-marca) nos fueron suministradas por el Laboratorio de Investigaciones Científicas sobre la Química del Café, de la Federación Nacional de Cafeteros.

El proceso de extracción se realizó de la siguiente manera : El café se tostó en condiciones controladas (240°C, 15 min. y temperatura del horno estabilizada), se molió y se tamizó. Para preparar los extractos se escogieron partículas con tamaños entre 0.5 y 1.0 mm. Se introdujeron en el extractor 50 gramos de café y 200 ml. de agua bidestilada.

En este trabajo mostramos solamente resultados obtenidos variando la temperatura de extracción desde 100°C hasta 200°C y dejando fijos otros parámetros tales como la cantidad de

café (50 grs.), la cantidad de agua (200 ml.), el tiempo de contacto (5 minutos) y el tamaño del grano. En otros trabajos que están en preparación se varían los demás parámetros.

El dispositivo de extracción es un cilindro de acero inoxidable (Figura 1) dividido en dos cámaras por un diafragma en donde opera una válvula (4). En la cámara superior, cuya capacidad es de 500 ml., se calienta el agua a la temperatura deseada mediante un calentador de alambre termocoax. Al accionar la válvula, el vapor de agua desciende y entra en contacto con el café depositado en la cámara inferior con capacidad para 500 ml.. Al entrar el café en contacto con el vapor de agua la temperatura desciende. Sin embargo, es posible subirla nuevamente gracias a dos calentadores coaxiales de termocoax dispuestos en la cámara inferior. El producto de salida se evacua a través de otra válvula hacia un recipiente cilíndrico. La cámara de extracción dispone de medidores de temperatura (Termoelementos) y del equipo necesario para el control automático de temperatura. De inmediato se efectúan mediciones (5) con el producto de salida (Extracto) tales como el pH, la concentración de sólidos solubles, el rendimiento, la tensión superficial y la señal ESR. El cuncho es recogido en su totalidad y secado en un horno a 55°C durante 10 horas. La figura 2 muestra el comportamiento de la temperatura del extracto en función del tiempo de contacto para dos temperaturas de extracción (120°C y 150°C).

3. RESULTADOS Y DISCUSION

La figura 3 muestra el comportamiento de la amplitud relativa de la señal ESR con la temperatura de extracción. Para T 140°C se observa un crecimiento fuerte de la amplitud de la señal debido a que a estas temperaturas hay generación de Radicales Libres, probablemente por rompimiento de cadenas moleculares (Cracking) (4) o porque es posible que ocurran también reacciones pirolíticas.

En la figura 4 se observa el comportamiento del rendimiento en la extracción en función de la temperatura de extracción. El rendimiento es obtenido al hacer la fracción entre el peso del cuncho seco (3 % de humedad) y el producto de entrada o sea el café torrefactado y molido (2 % a 3 % de humedad), por cien (6). Como se vé en la figura 4, los rendimientos obtenidos oscilan entre 30 % y 44 % correspondiendo los valores más altos a temperaturas por encima de 140°C.

La figura 5 muestra los valores del pH en función de la temperatura de extracción. Se observa un descenso más o menos fuerte del pH para temperaturas de extracción por encima de los 140°C. Es razonable pensar que a medida que aumentamos la temperatura de extracción, el pH disminuye debido a que más cantidad de ácidos son arrastrados hacia la bebida durante el proceso. Extractos realizados a temperaturas por debajo de 100°C tienen siempre un valor del pH mucho mayor que los realizados a temperaturas altas.

La figura 6 muestra el comportamiento de la concentración de sólido soluble en función de la temperatura de extracción. Se observa una variación muy clara de la pendiente de la curva a partir de los 140°C.

Los resultados obtenidos se pueden resumir así :

Se observa un aumento pronunciado de la CRL, del rendimiento y de la concentración de sólidos solubles en función del aumento de la temperatura de extracción, a partir de los 140°C. Por el contrario, se observa una clara disminución del valor del pH de los extractos con el aumento de la temperatura de extracción especialmente a partir de los 140°C. Dichos resultados nos permiten adoptar las siguientes conclusiones :

1. Sin despreciar la variación de la solubilidad por efecto del aumento de temperatura, se podría pensar que el aumento medido en la concentración de sólidos solubles se debería a un incremento de fracciones solubles producidas durante el proceso de calentamiento. Posiblemente una parte de dichas fracciones está constituida por Radicales Libres ya que se observa un cambio en la pendiente de la curva de solubilidad en el intervalo comprendido entre los 140°C y 150°C, que coincide precisamente con el punto de inflexión observado en la curva CRL vs. T.

2. Los resultados experimentales indican la posible existencia de una "Temperatura Crítica" de Extracción, a partir de la cual se modificaría notoriamente la composición química del extracto líquido. Esta "Temperatura Crítica" parece estar alrededor de 140°C.
3. La notoria variación de la CRL y del pH a partir de la "Temperatura Crítica" sería un indicativo de que en el proceso de extracción existe no sólo un proceso físico sino también uno químico.

4. LITERATURA

- (1) STREULI, H.- "Der heutige Stand der Kaffechemie". 6th Int. Coll. on Coffee Chemistry. Bogotá, junio 1973.
- (2) COSTE, R.- "Cafetos y Cafés en el Mundo". Tomo II, vol. I. G.P. Maisonneuve y Larose, 11 rue Victor Cousin, Paris, 1959.
- (3) DIAZ, J.- "Análisis de propiedades fisico-químicas del café por medio de Espectroscopía de Resonancia Magnética". Tesis Doctorado. U. Münster, julio 1977.
- (4) DIAZ, J., NINO, V., FRITSCH, G.- "ESR en la Tecnología del Café". II Simposio Latinoamericano de Resonancia Magnética e Interacciones Hiperfinas. Bogotá, julio 1976.
- (5) SIVETZ, M. and FOOT, M.E.- "Coffee Processing Technology". Vol. II, The Avi Publishing Comp. Inc., 1963.
- (6) STREULI, H.- "Kaffee". In : Handbuch der Lebensmittelchemie. Bd VI, Pags. 56 y ss. Springer-Verlag, Berlin, 1970.

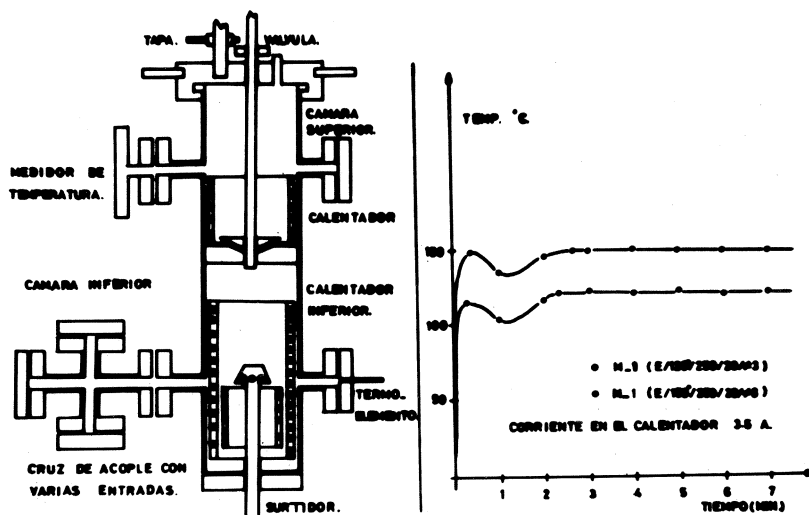


FIG. 1 EXTRACTOR: CORTE TRANSVERSAL MOSTRANDO ALGUNOS DETALLES DE CONSTRUCCION.

FIG. 2 TEMP. DEL EXTRACTO EN FUNCION DEL TIEMPO DE CONTACTO.

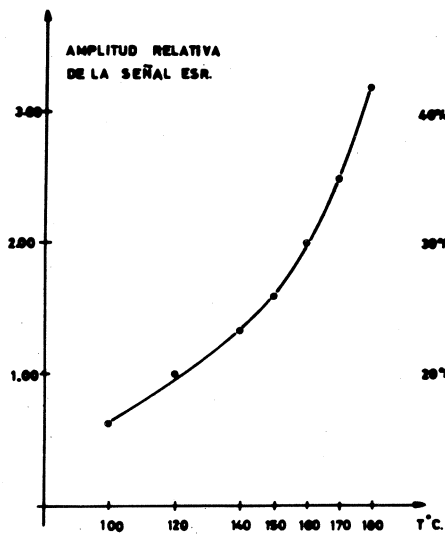


FIG. 3 AMPLITUD RELATIVA DE LA SEÑAL ESR EN FUNCION DE LA TEMP. DE EXTRACCION.

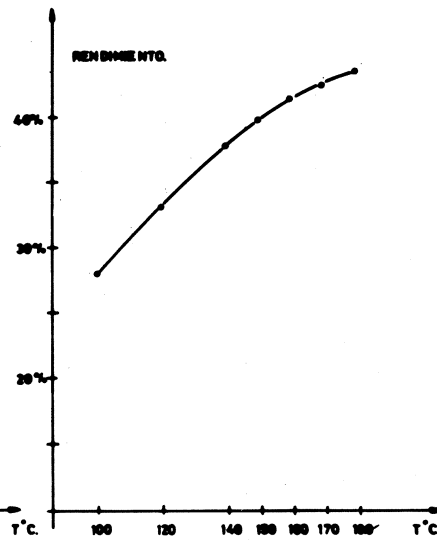


FIG. 4 RENDIMIENTO DE LA EXTRACCION. EN FUNCION DE LA TEMP. DE EXTRACCION.

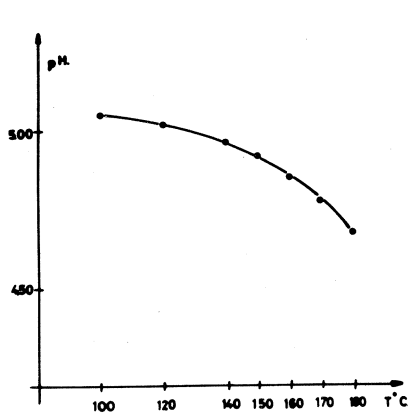


FIG. 5 pH EN FUNCION DE LA TEMP. DE EXTRACCION MEDIDO A 25°C.

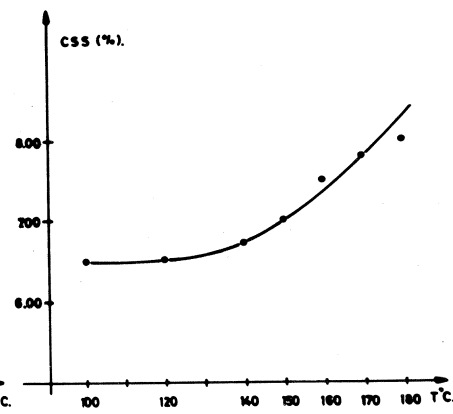


FIG. 6 CONCEN. DE SOLIDO SOLUBLE EN FUNCION DE LA TEMP. DE EXTRACCION MEDIDO A 20°C.

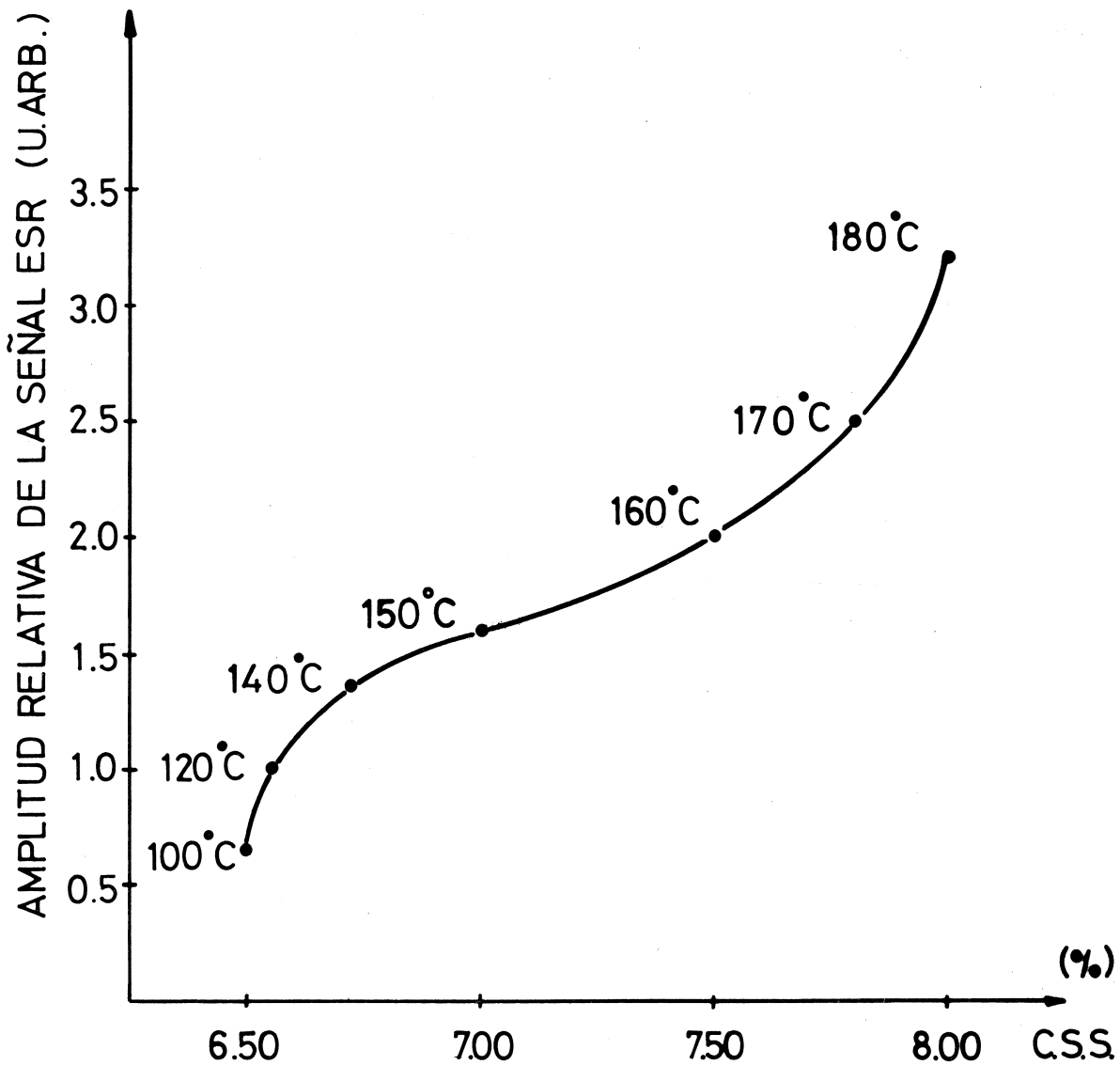


FIG.7 AMPLITUD RELATIVA DE LA SEÑAL ESR EN FUNCION DE LA CONCENTRACION PARA TEMPERATURAS DE EXTRACCION DIFERENTES.

PRODUCTION DE GAZ MÉTHANE PAR DIGESTION ANAÉROBIE DE LA PULPE DE CAFÉ

M. JACQUET, J.-C. VINCENT

Laboratoire de Chimie-Technologie de l'IFCC,
B.P. 5035, 34032 Montpellier cedex (France)

L. CAYLA, S. ELMALEH, L. GBAHOUE

Laboratoire de Génie Chimique, Traitement et Epuration des Eaux,
USTL, Place Eugène-Batallon, 34000 Montpellier (France)

J. HAHN

Centre de Recherches de l'IFCC en Côte d'Ivoire
01 BP 1827, Abidjan 01

1. INTRODUCTION

La présente étude est consacrée à la valorisation énergétique de la pulpe de café, sous-produit obtenu au cours du traitement des cerises de café par "voie humide". Dans le cas de ce traitement, les cerises de café sont amenées dans un atelier où elles subissent successivement les trois opérations suivantes : dépulpage, démulcination et séchage du café par voie humide.

Le fonctionnement de ces ateliers nécessite un apport d'énergie mécanique (machines) et calorifique (séchage).

La digestion anaérobie des pulpes de café avec production de méthane peut fournir une partie de l'énergie nécessaire au fonctionnement de ces ateliers.

Le gaz est, en effet, utilisable pour entraîner les moteurs des groupes électrogènes.

Après digestion les résidus sont utilisables comme compost. Les ateliers de dépulpage sont toujours proches des plantations.

2. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Plusieurs utilisations ont été préconisées pour la pulpe (1) :

- engrais et conditionneur de sol,
- alimentation animale,
- substrat de fermentation pour la production de levures, d'alcool ou d'acide acétique,
- enfin, production de gaz combustible.

CALLE (2) utilise en 1957 un digesteur discontinu de capacité 50 litres. Il produit, en 72 jours, 670 l de gaz de pouvoir calorifique 6 000 Kcal/m³ à partir de 30 kg de pulpe humide. HUTCHINSON (3) traite dans un digesteur comprenant 4 compartiments de 13 m³ chacun, l'ensemble des sous-produits de sa ferme (fumier de bovins, pulpe de café, déchet de maïs). Chaque compartiment contient 8 m³ de matière organique et produit 151 m³ de gaz en 56 jours. Les composts résiduels sont épandus dans la plantation.

CALLE (4) réalise en 1974 un digesteur gazomètre de capacité 5,60 m³ fonctionnant en semi-continu. Il introduit 500 kg de pulpe humide partiellement dégradée tous les 40 jours. Le gaz produit correspond à 10 000 Kcal/jour. Ces travaux sont cités par d'autres auteurs (5,6). MATHEU (7) décrit une installation analogue et suggère l'utilisation des résidus comme compost.

Ces travaux ont l'avantage de proposer des solutions technologiques simples adaptées à des installations de petite taille. Ils restent partiels car ils ne précisent ni les cinétiques de production du gaz, ni la stoechiométrie du processus. L'évolution du substrat au cours de la digestion n'a pas été étudiée.

3. TECHNIQUE EXPERIMENTALE

Deux séries d'expérimentation ont été conduites parallèlement

3-1- A la station I.F.C.C. de Bingerville (Côte d'Ivoire)

On a utilisé une série de cinq digesteurs de capacité unitaire 5,25 litres. Chaque digesteur est muni d'un gazomètre (fig. 1).

Ces appareils sont disposés dans un laboratoire à température ambiante (variant entre 28 et 31°C). Ils ne possèdent pas de dispositif d'agitation.

On a procédé aux opérations suivantes :

- aération préalable de la pulpe en la laissant reposer à l'air libre sur un grillage,
- mesure de la teneur en matière sèche de la pulpe avant introduction dans le digesteur,
- relevé de la quantité de gaz produite en fonction du temps,
- enfin, quand la fermentation est achevée, analyse des résidus.

3-2- Au laboratoire de Génie Chimique et Epuration des Eaux (U.S.T.L.)

On a utilisé des digesteurs analogues à ceux décrits précédemment (fig. 1) mais placés dans un bain thermostaté avec agitation éventuelle.

Les mêmes opérations que ci-dessus ont été effectuées.

L'équipement du laboratoire permettait l'analyse chromatographique du gaz et la mesure du pH du milieu en cours de digestion.

Sur la pulpe et les résidus, on a effectué l'analyse élémentaire et la détermination des teneurs en cellulose, lignine, glucose, sucres réducteurs libres, sucres réducteurs totaux.

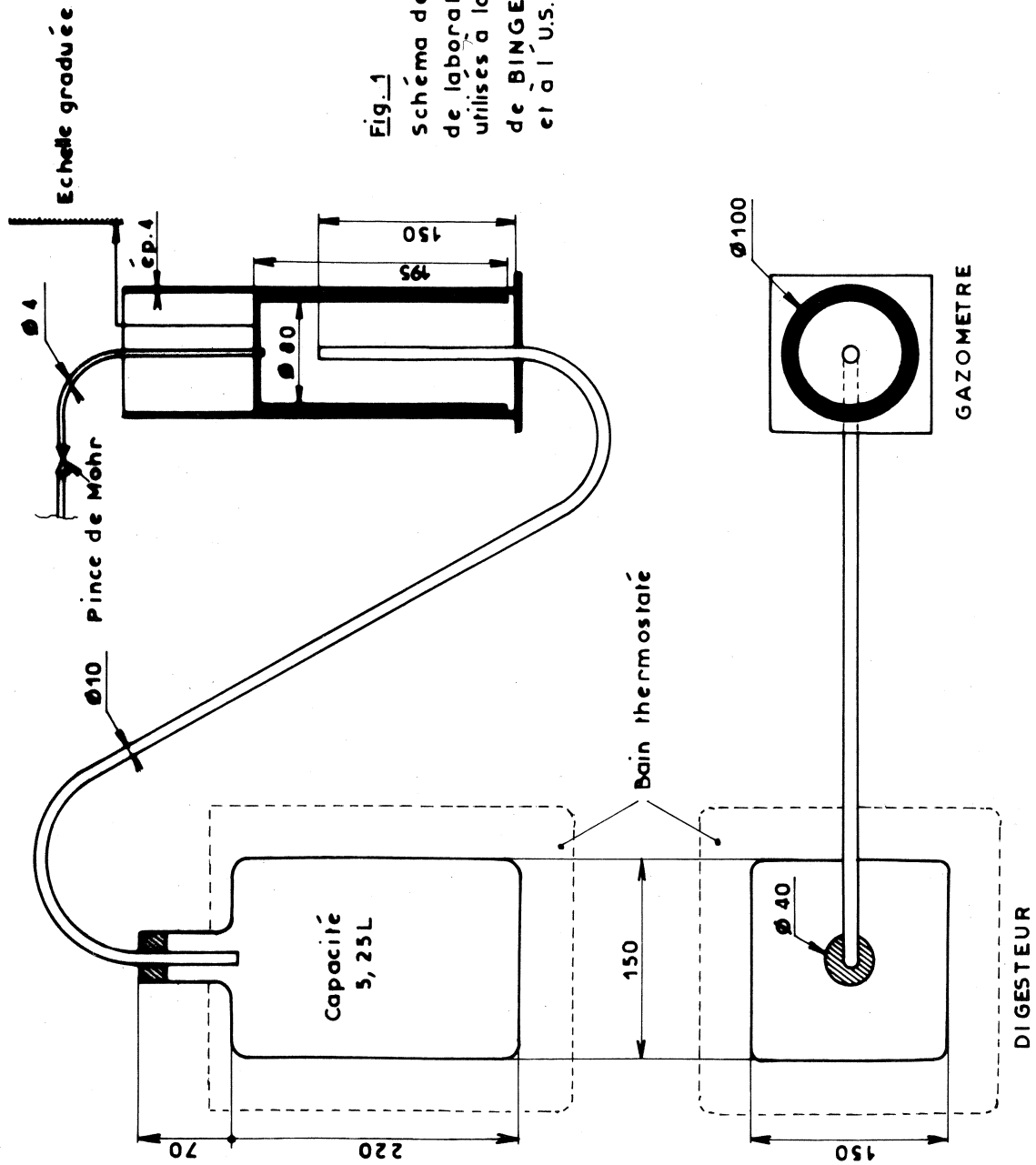


Fig. 1
 Schéma des digesteurs
 de laboratoire
 utilisés à la station I. F. C. C.
 de BINGERVILLE
 et à l'U.S.T.L.

4. RESULTATS EXPERIMENTAUX

4-1- Analyses effectuées sur la pulpe de café (Arabusta)

- . teneur en eau moyenne (pulpe essorée) : 87,4 % m.h. *
- . analyse élémentaire (en % m.s. **)

C	N	P	K	Ca	Mg
45,80	2,31	0,18	3,01	0,59	0,16

- . analyse organique (en % m.s.)

Glucose	Sucres réducteurs libres	Sucres réducteurs totaux	Lignine	Cellulose
1,15	4,09	4,42	4,65	45,35

Ces analyses permettent de calculer le rapport C/N qui vaut ici 19,8. L'apport azoté est donc théoriquement suffisant. Le milieu est particulièrement riche en potassium.

4-2- Essais réalisés à Bingerville

Une première série d'essais a confirmé qu'il est nécessaire de soumettre la pulpe à une aération préalable. Les pulpes non aérées fermentent mal par suite d'une acidification excessive du milieu.

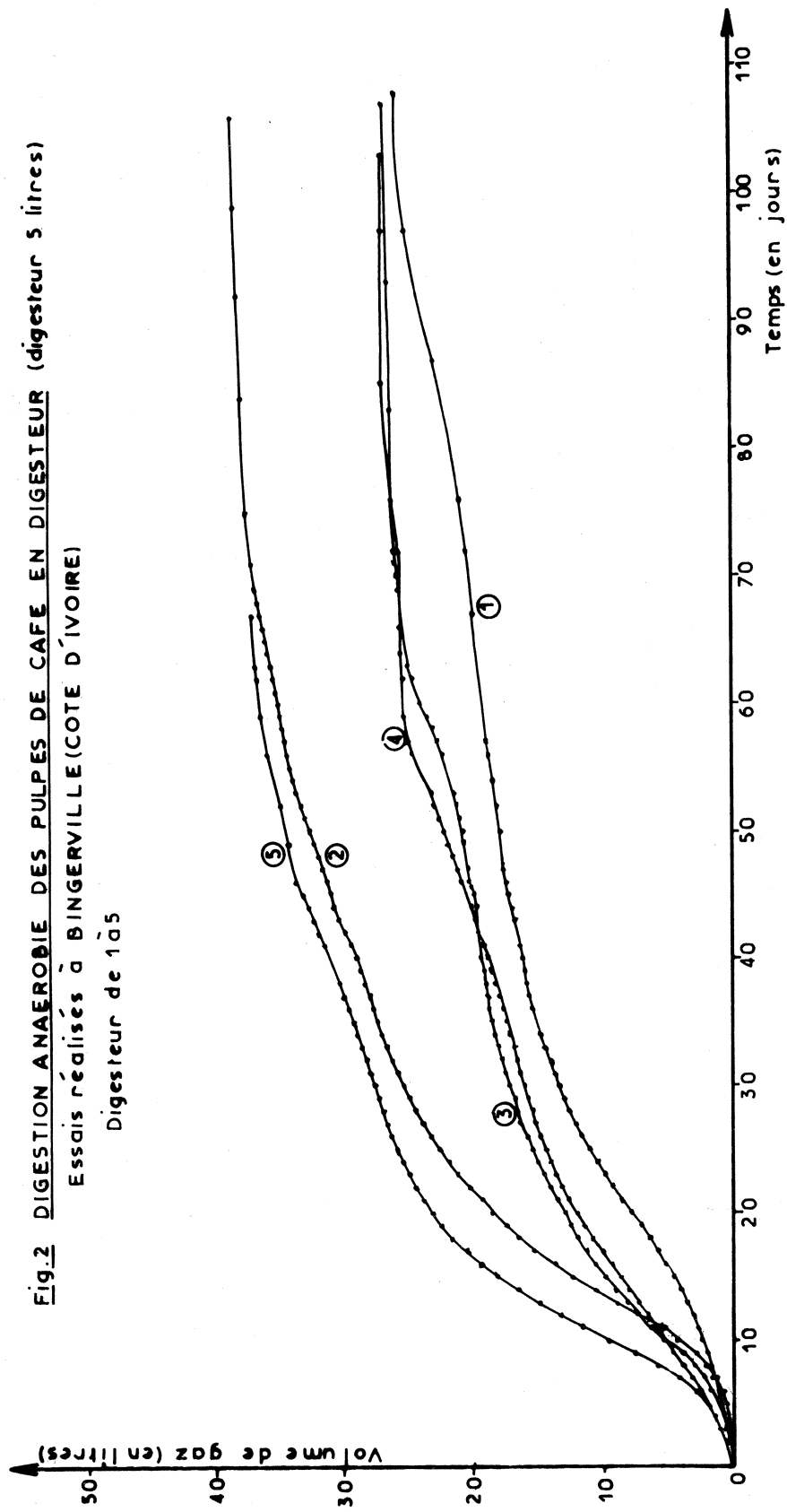
On introduit dans les digesteurs un mélange 1/1 d'eau et de pulpe préalablement aérée. La pulpe n'est ni broyée niensemencée en début d'expérience. On a donc laissé se développer une microflore spécifique du milieu. On ajoute parfois de l'acétate d'ammonium afin d'accélérer la mise en route de la digestion :

- . les conditions expérimentales sont consignées au tableau 1
- . les courbes de production de gaz sont présentées à la fig. 2 ; on a pris pour origine des temps l'instant où commence le dégagement de méthane.

* m.h. : par rapport à la matière humide
** m.s. : par rapport à la matière sèche

TABLEAU N° 1 - ESSAIS DE BINGERVILLE - Conditions expérimentales
Principaux résultats

N° du digesteur	1	2	3	4	5
Durée d'aération préalable de la pulpe (en jours)	5	7			9
Quantité de pulpe dans le digesteur (en kg)	2,36				
Quantité d'eau ajoutée dans le digesteur (en l)	2,36				
Température de travail (en °C)	Ambiante entre 28 et 31°C				
Etat de la pulpe	non broyée				
Agitation	pas d'agitation				
Teneur de la pulpe introduite en m.s. (en %)	13,94	11,64	12,62	12,62	12,62
Ajout d'acétate d'ammonium (en g)	0	11,8	23,6	0	23,6
Durée de la phase de latence (en j)	31	21	11	24	29
Durée de dégagement gazeux (en j)	100	75	80	70	65
Quantité de gaz produite par le digesteur (en l)	25	38	27	26	37
Quantité de gaz produite par kg de m.s (en l)	76,0	138,2	90,7	87,2	124,2
Débit maximum de gaz par digesteur (en l/j)	0,7	1,7	0,7	1,4	1,975
Débit maximum de gaz par kg de m.s. (en l/j)	2,13	6,19	2,35	4,70	6,63
Concentration moyenne du gaz en CH ₄ (en %)	environ 65 %				



La production de gaz se poursuit pendant 70 jours environ dans chaque cas.

La période de latence est relativement longue (une vingtaine de jours) ; l'adjonction d'acétate d'ammonium tend néanmoins à la raccourcir.

Les conditions expérimentales adoptées dans le cas du digesteur 2 apparaissent les plus favorables : production de gaz la plus importante pour un faible ajout d'acétate d'ammonium.

TABLEAU N° 2 - ANALYSE ELEMENTAIRE EFFECTUEE SUR LES RESIDUS DE PULPE (résultats en % m.s.)

Résidu du digesteur N°	1	2	3	4	5
C	48,4	49,3	50,9	50,2	49,9
N	2,94	3,19	2,93	3,11	3,12
P	0,13	0,16	0,11	0,19	0,22
K	3,55	2,95	2,86	4,58	4,80
Ca	0,58	0,64	0,58	0,63	0,62
Mg	0,15	0,23	0,17	0,18	0,18
Na	0,06	1,57	0,09	0,07	0,06
SiO ₂	0,10	1,2	0,20	0,15	0,20

L'analyse élémentaire des résidus de pulpe après digestion permet de déterminer la proportion du carbone disponible effectivement transformé en gaz (tableau 3)

TABLEAU N° 3 - PROPORTION DU CARBONE DISPONIBLE TRANSFORME EN GAZ PAR LA DIGESTION.

Digesteur	1	2	3	4	5
Volume de gaz qui serait théoriquement produit si tout le C était transformé (en l/kg m.s.)	854,9				
Volume de gaz effectivement produit (en l/kg m.s.)	76	138,2	90,7	87,2	124,2
Production de C transformé en gaz (en %)	8,89	16,16	10,61	10,2	14,53

Nous constatons ici que dans le cas le plus favorable, seulement 16 % du carbone total est transformé en gaz.

TABLEAU N° 4 - ANALYSES ORGANIQUES EFFECTUEES SUR LES RESIDUS DE PULPE (en % sur m.s.)

Résidu du digesteur N°	1	2	3	4	5
Glucose	n.d.	0,66	0,35	0,59	0,47
Sucres réducteurs libres	n.d.	1,23	0,66	0,86	0,95
Sucres réducteurs totaux	n.d.	1,23	0,68	0,85	0,95
Lignine	14,20	18,38	15,66	11,44	9,86
Cellulose	58,18	58,22	55,94	55,5	64,01

4-3- Essais réalisés à l'U.S.T.L.

Les conditions expérimentales sont décrites dans le tableau 5. Chaque digesteur a étéensemencé avec un inoculum de 100 ml de boue urbaine en stabilisation anaérobie.

Les trois digesteurs A, B et C sont soumis à des conditions identiques de température, dilution et aération préalable de la pulpe.

On a donc comparé l'évolution de la pulpe :

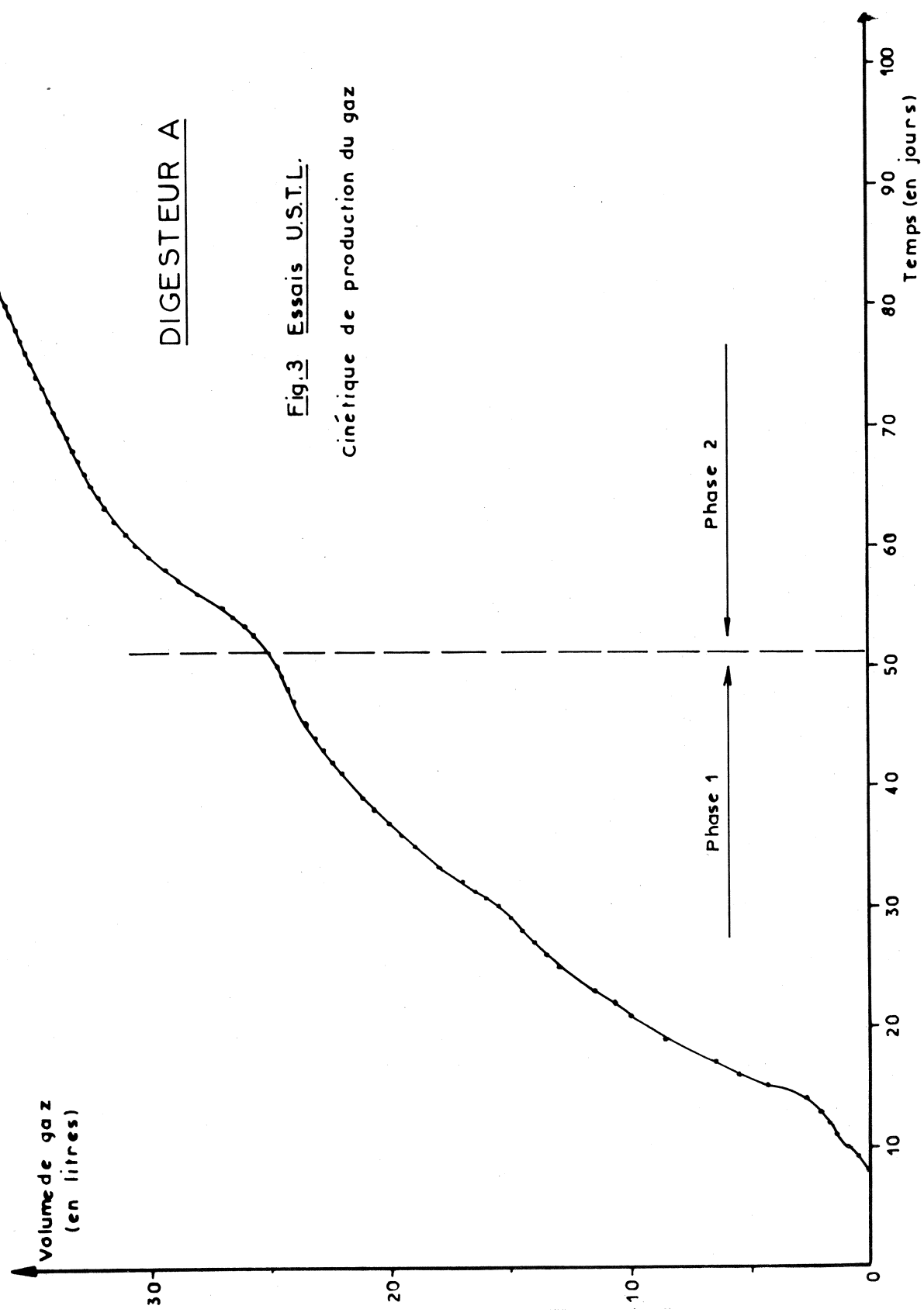
- préalablement broyée (A)
- non broyée (B)
- préalablement broyée et soumise à une agitation en cours de digestion (C)

On a tracé les courbes :

- de production du gaz,
- d'évolution du pH du milieu,
- d'évolution de la composition du gaz produit.

TABLEAU N° 5 - ESSAIS U.S.T.L - Conditions expérimentales
Principaux résultats

	Digesteur A		Digesteur B	Digesteur C
	phase 1	phase 2		
Durée d'aération préalable (en j)	6			
Quantité de pulpe introduite dans le digesteur (en kg)	2	1	2	2
Quantité d'eau introduite dans le digesteur (en l)	2	0	2	2
Température de travail (en °C)	37 (régulée)			
Etat de la pulpe	broyée	non broyée	non broyée	broyée
Agitation	non agité	non agité	non agité	agité
Teneur en m.s. de la pulpe (en %)	11,00			
Ajout d'acétate d'ammonium (en g)	0			
Durée de la phase de latence (en j)	6	-	-	7
Durée du dégagement gazeux (en j)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quantité de gaz produit par digesteur (en l)	29	10	22	17
Quantité de gaz produite par kg de m.s. (en l)	131,8	90,9	100	72,2
Débit maximum de gaz par digesteur (en l/j)	1,5	0,7	0,9	1,9
Débit maximum de gaz par kg de m.s. (en l/j)	6,8	6,3	4,0	8,6
Concentration du gaz en CH ₄ (en %)	70 constant au 29 ^e j	75	70 constant au 29 ^e j	70 constant au 5e j



DIGESTEUR B

Fig. 4 Essais U.S.T.L.

Cinétique de production du gaz

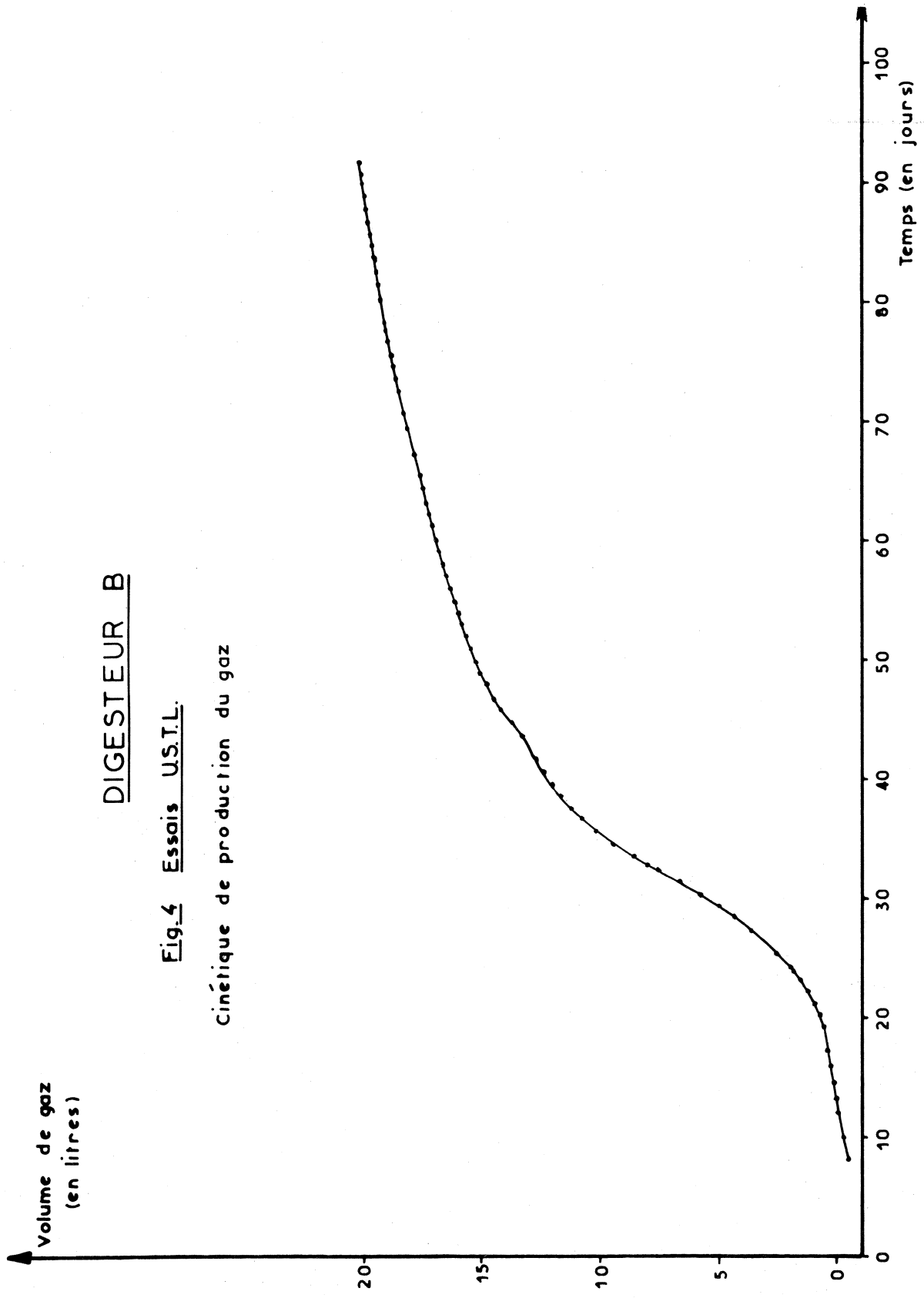


Fig. 5 Essais USTL.
Evolution du PH du milieu

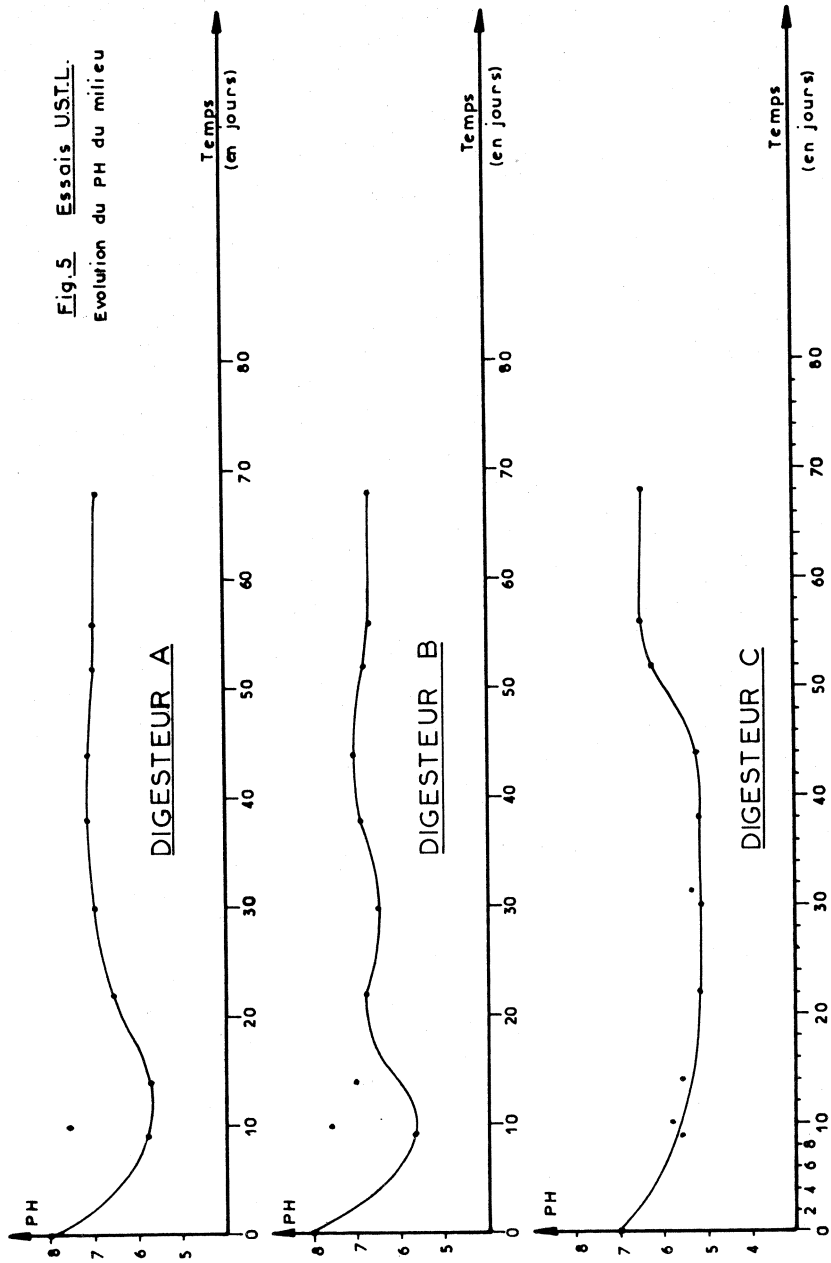
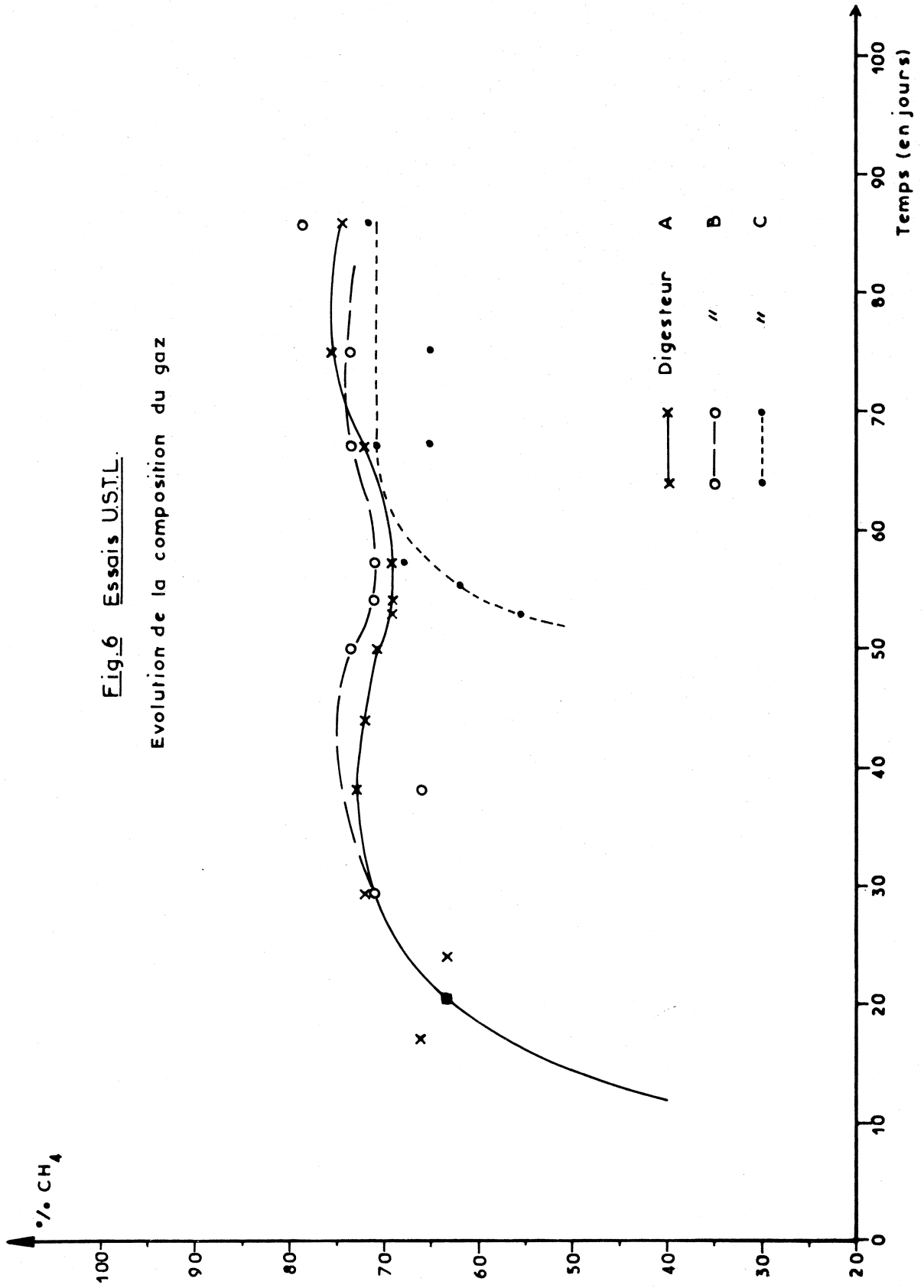


Fig.6 Essais U.S.T.L.

Evolution de la composition du gaz



a) Production du gaz (fig. 3 et 4)

La phase de latence est beaucoup plus brève que dans les essais précédents (point 4) grâce à l'apport d'un inoculum ; par contre les quantités de gaz produites sont analogues.

On a laissé le réacteur A évoluer durant 50 jours (1^e phase). On a ensuite soutiré 2 kg de mélange pulpe - eau pour le remplacer par 1 kg de pulpe fraîche aérée, non broyée, et on a laissé la digestion se poursuivre (2^e phase).

Dans ce cas, la production de gaz à partir de la pulpe broyée (1^e phase) est plus importante qu'à partir de la pulpe non broyée (2^e phase). On tire la même conclusion si on compare les productions des digesteurs.

Le digesteur C ne donne pas des performances supérieures aux deux autres (des problèmes d'étanchéité s'étant posés au niveau du dispositif d'agitation, il sera nécessaire de vérifier ces résultats).

On peut donc conclure de ces essais que le broyage préalable de la pulpe, l'agitation et l'élévation de température à 37°C n'apportent pas d'avantages significatifs.

b) Evolution du pH du milieu (fig. 5)

Au cours des essais le pH varie peu et reste proche de la neutralité. On note une légère acidification en début de digestion.

c) Evolution de la composition du gaz (fig. 6)

La teneur du gaz en méthane augmente en fonction du temps. Elle est généralement supérieure à 60 % (pouvoir calorifique 5 400 Kcal/m³) et atteint 75 % (pouvoir calorifique 6 750 Kcal/m³).

d) Analyse des résidus de pulpe

. Analyse élémentaire (en % m.s.)

C	N	P	K	Ca	Mg	Na	SiO ₂
51,6	3,54	0,20	3,31	0,81	0,24	0,08	0,32

. Analyse organique (en % m.s.)

Glucose	Sucres réducteurs libres	Sucres réducteurs totaux	Lignine	Cellulose
0,55	0,84	0,84	2,36	60,96

e) Proportion du carbone initial transformé en gaz

	Digesteur A		Digesteur B	Digesteur C
	Phase 1	Phase 2		
Volume de gaz qui serait théoriquement produit si tout le C était transformé (en l/kg m.s.)	854,9			
Volume de gaz effectivement produit (en l/kg m.s.)	131,8	90,9	100	72,27
Proportion de C transformé en gaz (en %)	15,42	10,63	11,7	8,45

5. CONCLUSIONS GENERALES

Cette étude a permis de préciser quelques éléments sur la stoechiométrie et la cinétique du processus de méthanisation des pulpes de café.

On peut tirer les conclusions suivantes :

- il est nécessaire de prévoir une fermentation aérobie avant digestion ;
- les essais conduits dans des conditions rustiques (pulpes non broyées, pas d'agitation, température ambiante en milieu tropical) fournissent des résultats analogues à ceux qui ont été obtenus en laboratoire.
- la teneur du gaz en méthane est forte (70 % en moyenne)
- la proportion du carbone initial transformé en gaz reste faible ; la limitation provient de la difficulté à dégrader les celluloses.

Cette dernière considération nous amène à orienter la suite de cette étude vers la recherche de méthodes de prétraitements chimique ou biochimique de la pulpe et d'adaptation de la microflore permettant d'obtenir un avancement plus important des réactions.

Considérons, à titre d'exemple, l'usine de préparation du café Arabusta par voie humide implantée à SOUBRE (Côte d'Ivoire). Cette unité, dont la conception a été assurée par le Service Technologie de l'I.F.C.C. est prévue pour traiter 750 Tonnes/campagne de café vert Arabusta. Elle assure l'ensemble des opérations technologiques conduisant de la cerise au café marchand.

Ces premiers résultats permettent de préciser la part de l'énergie nécessaire au fonctionnement de cette usine qu'il est possible de fournir grâce à la méthanisation.

Les disponibilités en pulpe étant de 2 025 Tonnes de matière humide par an, on pourrait fournir grâce au méthane produit 50 à 55 % de besoins en énergie mécanique de l'usine (soit l'équivalent de 26 Tonnes de fuel/an).

BIBLIOGRAPHIE

1. CLAUDE (B.) - "Etude bibliographique : utilisation des sous-produits du café", Café, Cacao, Thé (Paris), vol. XXIII, n° 2, janv-mars 1979, p. 146-152
2. CALLE (V.H.) - "Combustible methane gas from coffee pulp" - Indian Coffee Board (Bangalore), vol. 21, n° 7, juil. 1957, p. 208-209
3. "How gas helps coffee growers" - Indian Coffee Board (Bangalore), vol. 22, n° 10, 1958, p. 411-412
4. CALLE (V.H.) - "Como producir gas combustible con pulpa de café" - Boletin tecnico, Cenicafe (Chinchina), n° 3, 1974, 11 p.
5. AGUIRRE (F.) - "Café : utilizacion industrial del grano y los subproductos" - Instituto Centroamericano de investigacion et tecnologia industrial (ICAITI), Guatemala, s.d., 40 p.
6. TANGO (J.S.) - "Utilizaçao industrial do café e dos seus subproductos" - Boletin do Instituto de Tecnologia de Alimentos (Campinas, Sao Paulo), n° 28, déc. 1971, p. 49-73.
7. MATHEU (M.A.W. de) - "Informaciones sobre la importancia de los abonos organicos y su aplicacion en las fincas de café". II, Revista Cafetelera Anacafé (Guatemala), n° 134, juil. 1974, p. 31-36.

BIOTECHNOLOGY IN GREEN COFFEE PROCESSING

C. ROLZ

Head, Applied Research Division

Central American Research Institute for Industry (ICAITI)

Apartado Postal 1552

Guatemala City, Guatemala

1. INTRODUCTION

More than a third of the world coffee production is processed by the wet method. In this process the natural fermentation of the depulped grain and the drying of the fermented and washed grain are key unit operations. Good controls in them will signify high quality grains which demand better prices.

As with many other agroindustrial activities all over the world, coffee processing plants have been facing two major problems : i) waste disposal, approximately 3 tons of byproducts are generated and 7 tons of water are required to produce 1 ton of dried dehulled coffee, and ii) energy for drying, roughly a rotating drum batch drier requires 10.000 GJ/ton of dried dehulled coffee produced.

Combined waste treatment with fuel generation is potentially attractive in this specific situation. Hence a definition and description of different alternatives available or in need of development is useful for further general and particular analysis. Only one answer suitable for every case is not expected in this case, as coffee processing units vary widely in capacity, techniques employed, energy requirements, technology available, management capabilities and general infrastructure to successfully market the upgraded different byproducts.

Three byproducts are generated during processing : the pulp, the mucilage and the hulls in ratios of 40,20 and 3.4 per 100 weight of fresh fruit. The pulp is separated from the fruit in depulpers that squeeze the fruit fed suspended in water. In this operation the pulping waste waters are generated which carry most of the soluble compounds present in the pulp. The mucilage is degraded by enzymatic and microbial action into lower molecular weight compounds during the natural fermentation step.

Operation that is carried out in open rectangular cement tanks. The fermented grain is washed with water, producing the waste washed waters that are dumped. The hulls are separated mechanically from the dried grains.

Small farms depulp, ferment and dry. Then sell their product to central dehulling units.

Larger holdings usually have the whole processing sequence.

2. PREVIOUS ICAITI WORK

A literature review on byproducts utilization was published by Aguirre (1). The use of fluidized beds in drying and roasting were published by Rolz et al (2) (3). Studies on the natural coffee fermentation were carried out by Rolz et al (4) and Menchú and Rolz (5).

Experiments for producing fungal biomass from coffee waste waters were reported by de Cabrera (6), Rolz et al (7), Rolz (8), Maldonado et al (9), Espinoza et al (10) (11), Rolz et al (12). From these results various drawbacks in the utilization of the waste waters became apparent : i) their great daily variation in availability and chemical composition, ii) their relatively high microbial contamination (mainly bacteria and wild yeast), and iii) their relatively low substrate concentration, which caused a low biomass productivity resulting in high production costs.

A continuous system to remove mechanically 70-80 % of the mucilage from the grain was developed and operating conditions reported (13). A filamentous fungi Penicillium crustosum, was shown to be able to use as a source of carbon and energy, chlorogenic acid and as a source of nitrogen, caffeine, when cultured in shake flasks at 30 C, 200 rpm, for 72 h (13). Chlorogenic acid and caffeine are present in the pulp and in the coffee waste waters.

3. PROCESSING ALTERNATIVES

In order to satisfy the need to i) treat solid and liquid effluents, ii) up grade byproducts and iii) obtain possibly energy, modifications are needed in the management of water and coffee processing done at the beneficio. The modifications will vary according to the different alternatives available and they should be chosen according to the local capabilities and the characteristics of the specific beneficio. Some general ideas on the strategies to follow have been already presented (14).

The usual coffee processing flow diagram and water handling practice in the beneficio is shown in Figure 1. The pulping waters might be used once through or they can be recycled. Wash waters are used only once through. The beneficio operation is not continuous. Coffee is depulped usually in the evening and night and the fermentors are filled. Fermentation takes place from 24 to 90 h. depending on climatic conditions (temperature) and ripening degree of the coffee fruit (from tinges of green to deep dark red fruits). Washing is done usually in the mornings. Drying is always going on and the bean circulates between solar drying in patios to mechanical dryers operating with heated air. Once dried the beans can be stored and dehulling is done continuously. Pulp is stored in open piles. The waters are usually dumped in the rivers or in some cases treated in open ponds.

The following alternatives are proposed :

- 3.1. Alternative 1. Reduce the water usage in pulping. Recycle the waters. Treat the waters in a combined system : a photosynthetic high rate oxidation pond and an anaerobic digester. Algae biomass and biogas could be obtained. This system is being explored mainly with animal wastes as discussed by Calvert (15).
- 3.2. Alternative 2. Continuously press the pulp as obtained in alternative 1. Pressing will produce two products : a pulp juice and a pressed solid. The basic idea in pressing is to extract from the original material the soluble compounds leaving behind mostly the fiber and insoluble materials. An alternative to pressing is liquid-solid extraction ; however pressing is preferred in this case because : i) it is more adaptable to low capacity batch or continuous operation, ii) it requires less sophisticated control for its proper operation, and iii) equipment could be designed and built locally. Continuous screw pressing is the basic step in the production of leaf protein concentrates (16, 17) and is used commercially in the citrus industry to produce citrus molasses and citrus dried pulp (18). We

have reported recently the results of coffee pulp pressing (19). The trials were carried out with a batch hydraulic press and evaluated by calculation of two parameters, juice yield and extracted solids. Several pulp pretreatments, before pressing, were experimented with, among were agitation, heating with live steam and adding commercial pectic enzymes. If a combination of pectic enzymes and temperature is employed in pretreatment, juice yields are close to 60 % of the initial fresh weight of the pulp, extracting with it about 35 % of the total solids present. The resulting juice has about 14 Brix, 75 % of the total hot water extractable sugars present in fresh coffee pulp, all of the polyphenols, about 50 % of the nitrogen and 30 % of the caffeine. The pressed solid has a final moisture content of about 70 %. Pressing trials in a beneficio have also been done employing a continuous screw press of 1.1 tons/h capacity. The juice yields without any pulp pretreatment have been in the order of 42 % when the press has been operated with a pressure between 0.44 to 0.51 MPa (50-60 psi'g).

3.3. Alternative 3. Decompose the pressed pulp aerobically in a pile in order to produce a good quality organic fertilizer to be used in plant breeding and coffee seedlings operations. We have adapted the Beltsville aerated pile method (20, 21) to successfully decompose fresh pulp to a stable product in a period from 3 - 5 weeks. The pulp is piled and air is sucked intermittently through the pile, so as to maintain an adequate oxygen concentration in the air voids of the pile. In such a method and due to the aerobic microbial activity, the pile temperature increases in less than 3 days to values close to 60 C. At this temperature range thermophilic aerobic microbes decompose carbohydrate polymers (cellulose, hemicellulose) at higher rates than their mesophylic counterparts.

3.4. Alternative 4. Use the pressed pulp as an animal feed. Here two options are available ; the first is to dry and mill the pulp to a fine powder and the second is to ensile the coffee pulp and then feed it from the silo directly to the animals. The latter assumes that the feedlots are quite near the beneficio, which is not usually the case. The former option is the one that has been chosen to design production alternative was recommended for scale up : fermentation is stopped after 12 - 13 h (when usually logarithmic grow ends). The whole broth is concentrated to obtain a protein enriched molasses to be used as a liquid animal feed. With this technique the biomass recuperation and drying steps could be eliminated, and hopefully some of the detrimental compounds found in fresh coffee pulp unfermented molasses could be transformed or metabolized by the microorganisms. Animal feeding data is required. It is necessary to point out that if the syrup alternative is chosen, yeasts might be also used and these microorganisms have been subjected to more chemical, biological and nutritional evaluation studies than filamentous fungi. Candida utilis grows well in CPJ (ICAITI, unpublished data). The production of fodder yeast enriched sugar cane syrups is commercially done in Cuba, where sugar juice is divided into two processing parallel schemes. In one a syrup is obtained by evaporation ; the other is used to grow aerobically yeast. Then the two are mixed and further concentrated. The ratio carbohydrate : protein is variable according to the animal feeding requirements (24). The concentrated syrups could also be mixed with powdered grains, pelletized and dried to have a dry animal feed.

CPJ could also be fermented anaerobically into acids (mainly lactic or lactic plus acetic) employing a mixed bacterial population, following the techniques developed by Michigan State University where animal wastes and wastes rich in carbohydrates (corn molasses, corn) and built the first factory in Centralamerica (Costa Rica) to process pulp ; however fossil fuels are being employed to dry the pulp and this might not be the best route for the long term economical utilization.

3.5. Alternative 5. Continuous evaporation of the pressed juices in order to produce coffee pulp molasses for animal feeding. This again is an analogy to what is usually done in the citrus industry (18). Two points are worth considering, however. More energy is needed to concentrate the juices and more important no data exists of its benefits as an animal feed ingredient. On the contrary evidence exists from animal

feeding experiments that soluble compounds from fresh coffee pulp are detrimental in feeding formulations containing a high percentage of fresh coffee pulp (22). Situation that would be analogous to employing coffee pulp molasses.

- 3.6. Alternative 6. Use the pressed juices as a fermentation substrate. Two different routes are here available. The aerobic growth of yeasts and filamentous fungi and the anaerobic growth of a mixed bacterial flora on one hand and yeasts on the other. We have completed a study that shows that coffee pulp juice (CPJ) is a good substrate for the growth of Aspergillus oryzae, Trichoderma harzianum, Penicillium crustosum and Gliocadium deliquescens. Biomass production and total sugar consumption were not significantly different for all fungal species tested when the initial C/N ratio was varied (by adding inorganic nitrogen). However biomass protein content was an inverse function of initial C/N ration. An optimum value seems to be around 12 (23). A possible biomass starch, sweet and acid whey have been transformed into organic acids and neutralized with NH_3 to form ammonium salts. The fermentations were batch at pH7 and around 43 C. About 70 to 80 % of the nitrogen added ended up in the final product as ammonium salts of acetic, propionic and butyric acids. The rest was part of the bacterial biomass (25, 26). The acid fermented juice could be evaporated to a stable syrup and used in animal feeding as mentioned above. Another stage, could be added where under anaerobiosis methanogenic bacteria could convert the acids formed into methane and CO_2 . The second fermenter should operate close to neutral pH or slightly alkaline in order to have an adequate biogas productivity. We have a two stage mesophilic-anaerobic system operating at ICAITI, being fed intermittently CPJ diluted to 3 % total sugars. Retention times have been in the order of 10 days and gas productivities are in the range of 0.5 to 1 vol/vol day. Methane contents are around 55 %. Total sugars are about 70 % converted into acids in the first stage where the pH drops to values around 4.0. The experiments are geared towards developing a stable continuous system.

Finally anaerobic yeast fermentation of CPJ for ethanol production is quite feasible. Productivity, yields and inhibition studies are underway at ICAITI.

- 3.7. Alternative 7. Treat the coffee wash water by a separator - anaerobic digestion - photosynthetic system. ICAITI has developed a system to treat coffee wash waters as intermittently produced in the beneficios. The waters are sent to rockfilled channels where flocs tend to coagulate and float. These then are collected and sent to anaerobic digestors where biogas is generated. Both effluents are sent to high rate oxidation ponds where waters are finally treated. A pilot unit is in operation in a Guatemalan beneficio.
- 3.8. Alternative 8. The biogas generated from alternatives 1, 6 and 7 could be employed as a fuel in the coffee dryers. ICAITI is developing a locally constructed shallow bed coffee dryer which will be able to use methane gas, dried coffee pulp, hulls and firewood as a source of energy. The unit be in operation for the 1980 - 1981 coffee crop in a Guatemalan beneficio.
- 3.9. Alternative 9. Use the microbial systems described in alternative 6 to remove the mucilage from the coffee grains. Laboratory tests have been done in order to develop trickle bed fermentors where a broth rich in hydrolyzing enzymes is recirculated through a bed of parched depulped coffee grains. Enzymes will degrade the mucilage and the sugars produced will be used as substrates for further microbial biomass formation. Preliminary laboratory tests have been done at ICAITI employing yeasts and filamentous fungi with good results ; no organoleptic changes have been introduced into the coffee beans fermented in that way.

4. CONCLUSIONS

A list of alternatives has been given that are available to implement combined waste treatment systems with byproducts upgrading and fuel production. As mentioned in the introductory part a set of alternatives that will fit every coffee processing unit is not the best solution. On the contrary each beneficio should evaluate all the options available. Figure 2 is again a coffee flow diagrams in a beneficio but we have added blocks identifying the alternatives discussed in the text.

5. ACKNOWLEDGMENT

The work done by ICAITI in coffee processing and byproduct utilization has been funded by the Scientific Department of the Organization of American States (OAS), the International Development Research Centre (IDRC, Canada), the Interamerican Development Bank (IDB), the UNEP/UNESCO/ICRO and the International Foundation for Science (IFS, Sweden) which is greatly appreciated. We have also received the collaboration of the following Guatemalan coffee beneficios : Cafosa, S.A., Fedecocagua and Intercafé to whom thanks are expressed.

6. REFERENCES

1. Aguirre, F.- "Utilización industrial del grano y los subproductos del café". Investigaciones Tecnológicas del ICAITI, No. 1, 1966.
2. Rolz, C., Menchú, J.F., Sandoval, J., Simon, P.- "La tostación continua del café en cama fluida". Café (IICA, Perú), 9 (3), 3-26, (1968).
3. Rolz, C., Menchú, J.F., Arimany, E.- "The fluidized bed drying of coffee". Quatrième Colloque Int. Chimie des Cafés (ASIC), 166-173, (1969).
4. Rolz, C., Menchú, J.F., Espinosa, R., Garcia-Prendes, A.- "Coffee fermentation studies". Cinquième Colloque Int. Chimie des Cafés (ASIC), 259-269, (1971).
5. Menchú, J.F., Rolz, C.- "Coffee fermentation technology". Café, Cacao, Thé, 17 (1), 53-61, (1973).
6. de Cabrera, S., Mayorga, H., Espinosa, R., Rolz, C.- "Fungal protein production in agro-industrial wastes". Proc. IV Int. Congress Food Sci. Technol., IV, 296-301, (1974).
7. Rolz, C., Mayorga, H., Schneider, S., Cordero, L., Menchú, J.F., Espinosa, R., Church, B.- "Producción de Fungi imperfecti a partir de las aguas de desecho de los beneficios húmedos de café". Sixième Colloque Int. Chimie des Cafés (ASIC), 260-267, (1973).
8. Rolz, C.- "Utilization of cane and coffee processing by-products as microbial protein substrates" in Tannenbaum, S., Wang, D.I.C., (Eds), Single Cell Protein II, The MIT Press, Cambridge, (1974).
9. Maldonado, O., Cordero, M., Mayorga, H., Espinosa, R., Menchú, J.F., Schneider, S., Rolz, C., Church, B.- "El crecimiento de A. oryzae en aguas de desperdicios del beneficiado del café". Rev. Microbiol. (S. Paulo), 6 (2), 27-34, (1975).
10. Espinosa, R., de Cabrera, S., Maldonado, O., Rolz, C., Menchú, J.F., Aguirre, F.- "Protein from waste". Chem. Tech., 6 (10), 636-642, (1976).
11. Espinosa, R., Maldonado, O., Menchú, J.F., Rolz, C.- "Aerobic non aseptic growth of Verticillium on coffee waste waters and cane blackstrap molasses at a pilot plant scale". Biotech. Bioeng. Symp., No. 7, 35-44, (1977).
12. Rolz, C., Espinosa, R., de Cabrera, S., Maldonado, O., Menchú, J.F.- "Growth of filamentous fungi on agricultural waste" in A.C.R., Dean, D.C. Elwood, C.G.T. Evans, J. Melling (Eds), "Continuous culture 6 : Applications and new fields", Ellis Horwood Ltd., p. 100-115, (1976).

13. Rolz, C.- "Particular problems of solid waste reclamation in developing countries". J. Appl. Chem. Biotechnol., 28, 321-339, (1978).
14. Rolz, C.- "Strategies for developing small-scale fermentation processes in developing countries". in Bioconversion of Organic Residues for Rural Communities, p.36-40, The UN University IPWN-I/UNUP-43 Food and Nutrition Supplement 2, 1979.
15. Calvert, C.C.- "Use of animal excreta for microbial and insect protein synthesis". J. Anim. Science 48, 178, (1979).
16. Pirie, N.W.- "Leaf protein" in Food Protein Sources, Pirie, N.W. (Ed), p.133, Cambridge U. Press, 1975.
17. Kohler, G.O., Wildman, S.G., Jorgensen, N.A., Enochian, R.V., Bray, W.J., in Protein Resources and Technology : status and research, Milner, M., Scrimshaw, N.S., Wang, D.I.C. (Eds), p.543, Avi Publishing Co, 1978.
18. Kesterson, J.W., Braddock, R.J.- "Byproducts and Specialty Products of Florida Citrus". Institute of Food and Agricultural Sciences, Bulletin 784, U. Florida, 1976.
19. Rolz, C., Menchú, J.F., de Arriola, M.C., Micheo, F. de.- "Pressing of Coffee Pulp". Agric. Wastes, to be published in Vol.2, (1980).
20. Epstein, E., Willson, G.B., Burge, W.D., Mullen, D.C., Enkiri, N.K.- "A forced aeration system for composting waste water sludge". J. Water Poll. Control Fed., 48 (4), 688-694, (1976).
21. Willson, G.B., Epstein, E., Parr, J.R.- "Recent advances in compost technology". Proc. Third National Conf. Sludge Management Disposal Utilization, p.167-172, Information Transfer, Inc., (1977).
22. Braham, J.E., Bressani, R.- "Coffee Pulp Composition Technology and Utilization". IDRC-108e, 1979.
23. de León, R., Calzada, F., Rolz, C.- "Fungal biomass production from coffee pulp juice", accepted for publication by J. Ferm. Technol.
24. Almazán, O., Kibans, M.- "La producción de proteína unicelular a partir de la caña de azúcar". Tecnología (Geplacea, Mexico), Vol. 11, (1979).
25. Reddy, C.A., Erdman, M.D.- "Production of a ruminant protein supplement by anaerobic fermentation of feedlot waste filtrate". Biotech. Bioeng. Symp., 7, 11-22, (1977).
26. Reddy, C.A., Erdman, M.D.- "Fermentative conversion of swine and poultry wastes into nitrogen-enriched feedstuffs for ruminants". Biotechnol. Letters, 1, 331-336, (1979).

Fig. 1. - Coffee processing by the wet method

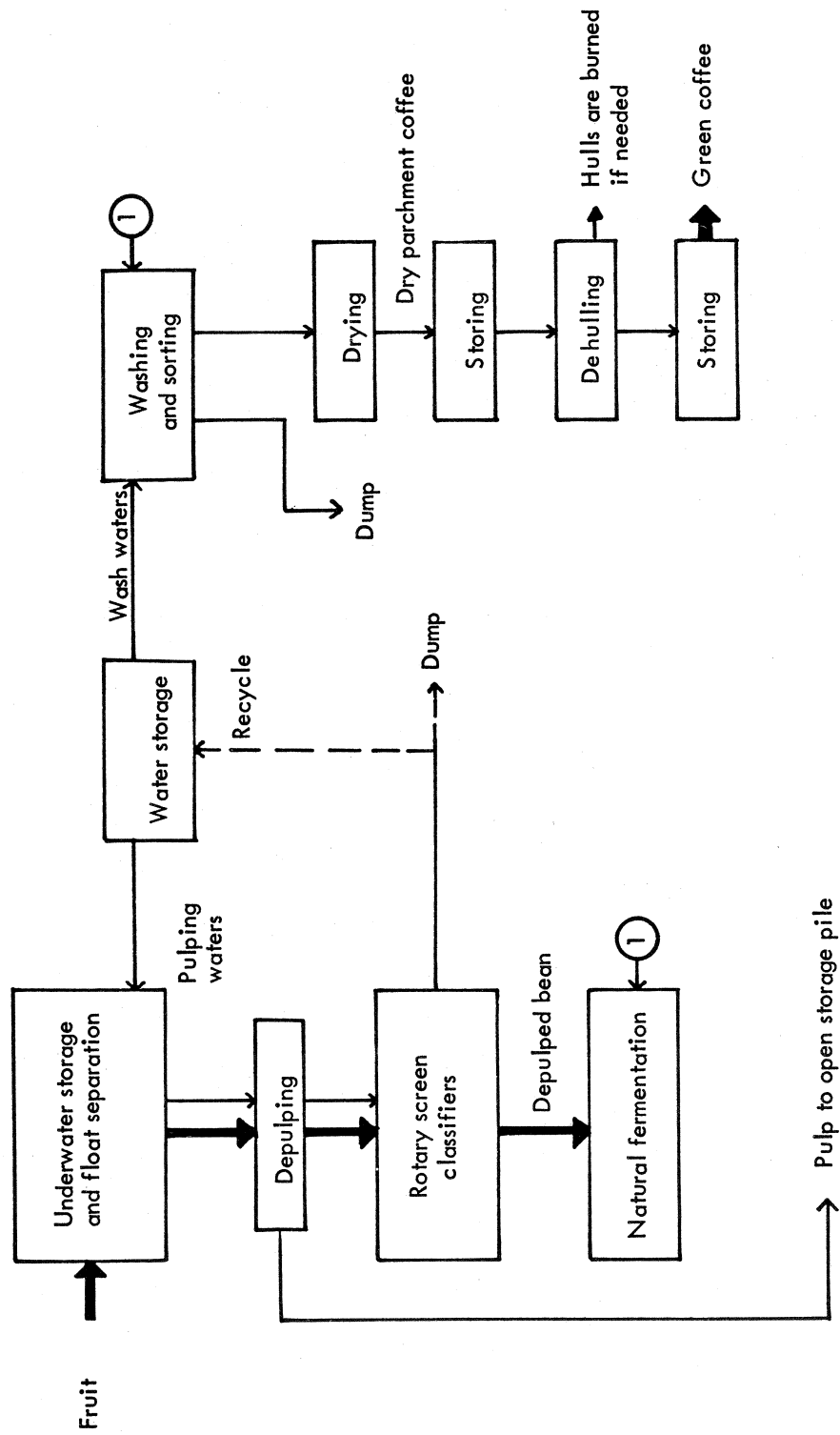
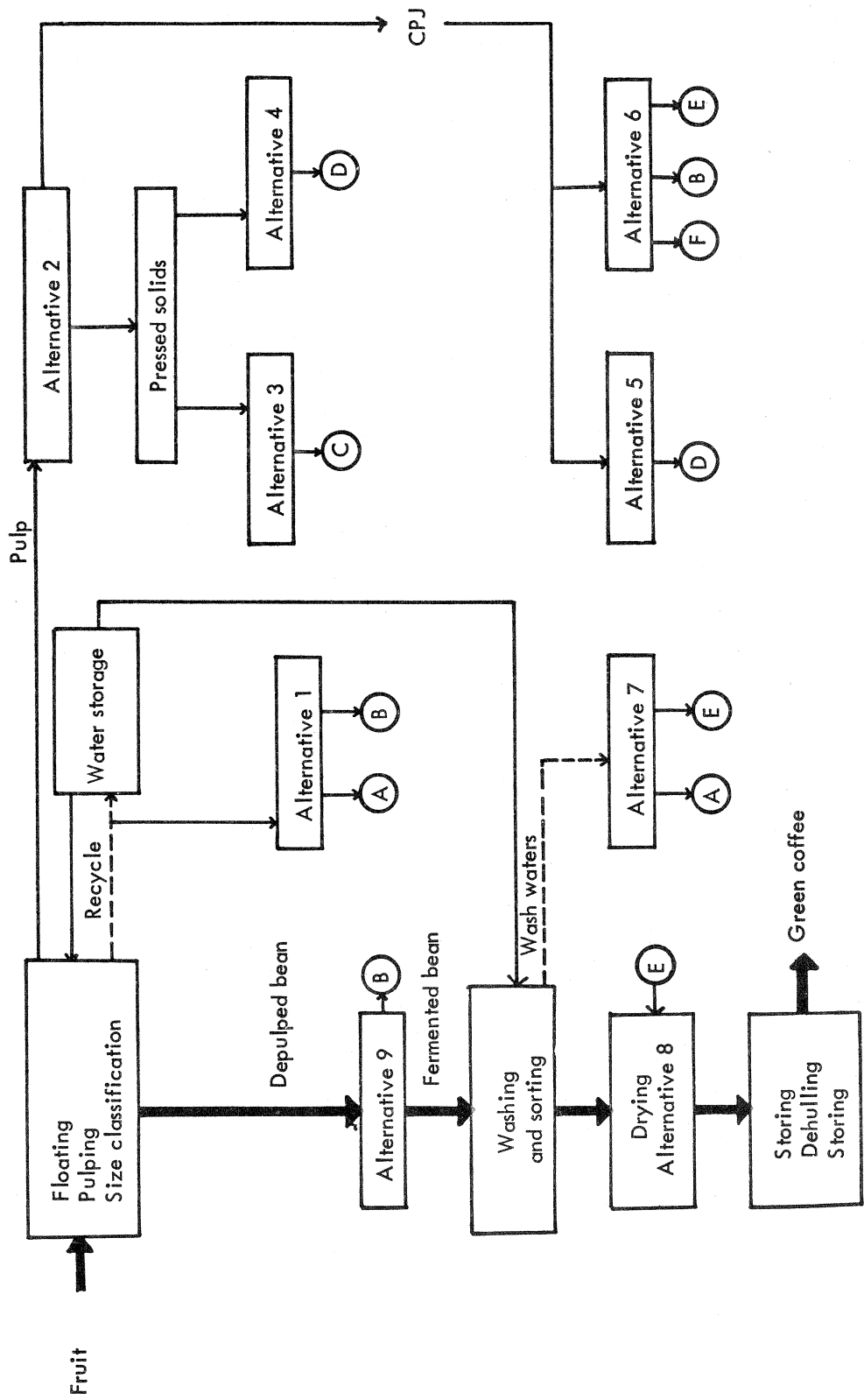


Fig. 2. - Coffee processing and alternatives for byproducts utilization - A : Cleaned water effluents ; B : Microbial biomass ; C : Organic fertilizer ; D : Byproducts for animal feeding ; E : Biogas ; F : Ethanol.



SUR LE COMPORTEMENT MÉIOTIQUE DES DIHAPLOÏDES DE *COFFEA ARABICA* L.

P. KAMMACHER

Laboratoire de Cytogénétique Végétale,

Université de Nancy I

C.O. 140, 54037 Nancy, France

Introduction

D'après la définition qu'en donne LEROY (14), le genre *Coffea* englobe les caféiers spontanés originaires du continent africain (*Eucoffea*) et de la région malgache (*Mascarocoffea*), ce qui représente une centaine d'espèces holotypiques. Malgré sa grande diversité morphologique et physiologique, ce genre présente peu de variation sur le plan de la structure chromosomique. Tous les *Coffea* connus sont en effet des espèces diploïdes ($2n = 22$), à la seule exception du caféier d'Arabie (*C. arabica* L.), tétraploïde naturel à $2n = 44$. On s'interroge encore sur le problème de l'origine botanique de *C. arabica* et de sa parenté avec les *Coffea* diploïdes. L'espèce tétraploïde provient d'Éthiopie, partie de l'Afrique située marginalement par rapport à l'aire géographique naturelle des *Coffea* à $2n = 22$, l'hérédité de ses caractères étudiés génétiquement suit un mode disomique, et l'appariement de ses chromosomes révèle peu d'anomalies, se conformant au mécanisme de la méiose habituellement observé chez les Végétaux supérieurs diploïdes. CARVALHO (3) avait émis en 1952 l'hypothèse d'une origine allotétraploïde pour *C. arabica* pour rendre compte de tels faits. Les progrès récents de la recherche permettent de tenir pour acquis que *C. arabica* est bien un allotétraploïde dont la garniture chromosomique est faite de l'assemblage de deux génomes de onze éléments, dont l'un ressemble étroitement au génome de base des *Coffea* diploïdes, alors que le second en diffère de façon importante. *C. arabica* est donc à ranger dans la catégorie des allotétraploïdes dits segmentaires ((KAMMACHER et CAPOT (11), KAMMACHER (12), CHARRIER (4)). Afin d'obtenir des informations complémentaires sur la structure génétique de ce second génome, il était indiqué d'examiner la méiose chez des haploïdes de *C. arabica*, d'après diverses considérations. Selon KIMBER et RILEY (13), "pairing in allopolyploids can be compared with that of hybrids between the putative diploid parents of the species concerned." Pour MALIK et TRIPATHI (17), "haploids, because of their unique genetic constitution,..... offer new vistas in unravelling cytogenetical problems. In their meiosis, since each chromosome lacks its normal homologue, new and ordinarily undetected pairing affinities are revealed. Moreover, reliable

information pertaining to the amount of potential hetero- or homogenetic pairing of a polyploid species are also obtained."

Il se trouve que jusqu'ici les seuls travaux publiés sur la méiose chez des haploïdes de *C. arabica* ne sont relatifs qu'à trois plantes obtenues et étudiées dans des conditions différentes ((MENDES et BACCHI(18), VISHVESH - WARA (22), BERTHAUD (1)). De nos jours on a pu mettre au point des techniques efficaces de détection des haploïdes chez *C. arabica*, fondées sur l'observation qu'il existe une relation entre l'haploïdie et le phénomène de polyembryonie dans le cas de cette espèce ((DUBLIN et PARVAIS (6)). Le présent travail a pu être effectué grâce à ces méthodes qui ont permis de rassembler des groupes de caféiers haploïdes dans un même environnement.

Matériel et méthode d'étude

Grâce à l'aimable collaboration de l'Institut Français du Café et du Cacao nous avons pu examiner une collection d'une vingtaine d'haploïdes de *C. arabica* mise en place à Bingerville (Côte d'Ivoire) à la suite des travaux mentionnés ci-dessus. Il s'agissait d'haploïdes obtenus par tri dans des fèves polyembryonnées, qui provenaient elles-mêmes de la récolte en mélange de divers cultivars. Une variabilité assez importante était à remarquer dans cette collection, et notre étude s'est plus particulièrement adressée à cinq de ces plantes qui étaient de loin les plus aptes à la floraison au moment de notre intervention. Le prélèvement de boutons floraux, après induction de la mise à fleur, et leur fixation dans le Carnoy ont été effectués d'après des techniques décrites précédemment, et le comportement méiotique a été étudié par la méthode indiquée sur des frottis de cellules-mères de pollen colorés à l'hématoxyline et au carmin acétique (8,11). Le déroulement de la méiose a été examiné dans son ensemble chez ces haploïdes, mais nous avons fait porter notre attention de manière particulière sur les stades susceptibles de fournir le plus d'informations sur l'affinité entre les génomes constitutifs de *C. arabica*. Sous ce rapport la Méta-phase I nous a semblé plus digne d'intérêt que la Prophase I de la méiose, parce que les petits chromosomes de *Coffea* y sont plus clairement observables. On sait aussi maintenant que contrairement à des idées reçues, l'examen des chromosomes prophasiques à la méiose des haploïdes végétaux n'apprend que peu de choses sur la structure du génome. Malgré les efforts de nombreux chercheurs, on n'a pas réussi à trouver un parallèle entre les appariements visibles chez des haploïdes aux stades Pachytène, Diplotène et Diacinèse d'une part, et les configurations de bivalents et d'univalents de la Métaphase I d'autre part (KIMBER et RILEY (13), SADASIVIAIAH et KASHA (21)). Comme il y a été fait allusion plus haut l'étude de la méiose chez des haploïdes provenant d'une espèce allotétraploïde peut donner des indications sur les relations entre les génomes ancestraux de l'espèce en question. Comme on l'a déjà montré pour l'étude méiotique d'hybrides d'espèces chez *Gossypium* (BROWN (2)), le point crucial n'est pas la capacité de chromosomes hétérologues à se mettre en paires en Prophase, mais leur aptitude à former des chiasmas à la Métaphase I. Pour ces raisons il nous a paru important de recenser la formation de bivalents caractéristiques à la Métaphase I des haploïdes de *Coffea*.

Résultats expérimentaux

Dans ses grandes lignes, le comportement méiotique du matériel biologique examiné ici se présente de la façon suivante.

Dans les diverses plantes haploïdes dont la méiose a été étudiée ici le nombre chromosomique des cellules-mères de pollen s'est révélé rigoureusement constant et égal à $n = 22$ toutes les fois qu'il a été possible de le compter, sans manifestation du phénomène de cytomixie. La répartition des chromosomes en Métaphase I montre que ces méioses sont marquées par la tendance à la formation d'un fuseau achromatique ainsi que d'une plaque équatoriale. A ce stade la plus grande partie des chromosomes est dispersée

dans toute la cellule, et est observable à l'état d'univalents dépourvus d'activité centrique, à de rares exceptions près. Ces univalents peuvent se grouper en associations secondaires qui forment des amas plus ou moins compacts. Il peut arriver que des univalents disposés aléatoirement à la hauteur de la plaque équatoriale forment des paires par des liaisons matricielles, parfaitement achiasmatisques, lesquelles sont parfois capables de coorienter leurs centromères. De telles images sont très semblables à ce qui a été décrit sous l'appellation de pseudobivalents par WALTERS (23) et de quasibivalents par OSTERGREN et VIGFUSSON (19) dans le fonctionnement des univalents à la méiose dans les genres Bromus et Secale. Selon ces auteurs de telles liaisons entre chromosomes sont fortuites, dépourvues de signification génétique, et résultent soit de cassures spontanées suivies de réunion, soit d'adhérences superficielles au niveau de la matrix. Nous avons aussi pu observer que des univalents occupant une position isolée dans le plan équatorial à la Métaphase I se clivent comme s'ils étaient virtuellement engagés dans un processus mitotique.

Par contraste avec les mouvements désordonnés de la majorité des chromosomes dont il vient d'être question, on voit se former dans presque toutes les cellules en Métaphase I des paires de chromosomes tout à fait analogues aux bivalents droits ou en anneau identifiables à la méiose des caféiers euploïdes (Fig. 2,3,4). Nous reviendrons plus loin sur ces configurations auxquelles nous accordons une réelle signification génétique.

Dans le matériel étudié ici la distinction est difficile à établir entre les stades de Métaphase I et d'Anaphase I, en raison de la dispersion des chromosomes dans toute la cellule (Fig. 1). Au cours de l'ascension anaphasique des chromosomes attardés ou précocement clivés ne parviennent pas à s'incorporer aux noyaux-fils. Le déséquilibre de la balance chromosomique s'accroît encore au cours de la seconde division de la méiose, où s'observe une tendance marquée des chromosomes à se constituer en groupes de sept à dix. En définitive les produits d'une telle méiose sont constitués par des microspores vides et non fonctionnelles.

Cependant les haploïdes de C. arabica ne se montrent pas complètement stériles malgré les irrégularités de leur méiose. On observe en effet qu'une faible proportion de leur grains de pollen (1 pour cent environ) est de constitution apparemment fonctionnelle à l'examen microscopique. Il est aussi d'observation courante que les caféiers haploïdes peuvent former de rares fruits pouvant contenir une graine viable. Ces rares manifestations de fécondité pourraient être mises en parallèle avec les particularités suivantes de biologie cellulaire. Nous avons en effet pu observer qu'au début de la Prophase méiotique des cellules-mères de pollen voisines peuvent exceptionnellement fusionner jusqu'à réunir leurs noyaux en un seul. Le processus de la méiose n'en est probablement pas altéré, car une plaque équatoriale sur cinq cents environ, dispersée parmi les cellules à 22 chromosomes décrites plus haut, montre la présence de 22 bivalents. On peut en conclure que la formation d'un petit nombre de gamètes fonctionnels chez les haploïdes de C. arabica est liée au rétablissement fortuit du niveau normal de ploïdie en début de méiose. On avait d'ailleurs déjà observé que les embryons des rares graines viables produits par ces organismes possèdent 44 chromosomes somatiques (BERTHAUD(1)).

Les différents aspects de la méiose de ces caféiers haploïdes sont liés au fait que, mis à part des retours spontanés à l'euploïdie, les chromosomes réduits à la condition d'univalents se répartissent au hasard dans le fuseau en se regroupant de façon très aléatoire. Dans certains cas, par contre, il se forme de véritables bivalents, ce qui donne à penser qu'au niveau de l'haploïdie chez Coffea subsiste un certain degré de duplication de matériel génétique, ce qui permet à certains chromosomes ayant encore des structures communes de se reconnaître lors des processus méiotiques et de former des chiasmatisques. Il peut ainsi apparaître jusqu'à six bivalents dans une même plaque équatoriale de Métaphase I, mais le degré de conjugaison chromosomique ne va pas plus loin. On ne voit jamais se constituer de trivalents ou de quadrivalents dans ces méioses, à moins de ranger dans cette

rubrique des groupements d'univalents qu'on qualifie généralement d'associations secondaires, auxquelles il est difficile d'attribuer une signification génétique.

Le Tableau I résume les données obtenues par le recensement des bivalents observés dans le cours de ce travail.

TABLEAU I. Fréquence de formation de bivalents chez les haploïdes arabica

Types de cellules observées	Fréquence des catégories de cellules chez cinq haploïdes					Total
	H 5	H 9	H 12	H 14	H 19	
22 I	6	9	9	9	5	38
20 I-1 II	21	33	22	15	23	114
18 I-2 II	31	33	25	26	17	132
16 I-3 II	21	19	29	25	28	122
14 I-4 II	15	6	12	21	19	73
12 I-5 II	5		3	4	6	18
10 I-6 II	1				2	3
	<u>100</u>	<u>100</u>	<u>100</u>	<u>100</u>	<u>100</u>	<u>500</u>
Fréquence moyenne de bivalents par cell.	2.37	1.80	2.22	2.46	2.59	moyenne 2.29
Fréquence moyenne de chiasmas par cell. (estim.)	3.16	2.51	3.02	3.77	3.47	moyenne 3.19

Discussion des faits et conclusion

Il n'y a pas lieu de revenir ici sur la question des groupements d'univalents à la méiose des haploïdes de C. arabica, ni sur les connections sans chiasmas qui peuvent apparaître dans ces conditions. Il s'agit d'une situation très classique chez les haploïdes de plantes supérieures, qui a été abondamment décrite dans la littérature consacrée au sujet, et dont la causalité apparaît de nature aléatoire.

D'une toute autre essence est la formation, dans une grande majorité de cellules en Métaphase I, de bivalents bien coorientés sur une plaque équatoriale et paraissant correspondre à la conjugaison de chromosomes équivalents de forme et de taille (Tableau I, Fig. 2,3,4). Ces images traduisent certainement l'existence d'une parenté entre des chromosomes qui ne sont pas homologues, situation à propos de laquelle le terme d'homéologie a été défini par HUSKINS (10). Chez les espèces nées par allotétraploïdie, l'étude de la méiose d'haploïdes constitue un moyen efficace de mise en évidence des homéologies encore présentes chez les génomes juxtaposés dans l'organisme. En effet l'appariement hétérogénétique peut s'y exprimer librement, sans être masqué par l'appariement homogénétique qui prévaut dans tout environnement chromosomique euploïde. La détermination la plus précise du niveau d'homéologie des espèces allotétraploïdes, par l'intermédiaire de l'analyse méiotique d'haploïdes, s'obtient encore par la mesure des fréquences de bivalents hétérologues, comme on l'a fait ici, plutôt que par l'examen des appariements à la prophase méiotique des haploïdes. Ce point de vue a été récemment confirmé par des recherches sur le complexe

synaptolémaux de végétaux haploïdes. Dans le cas des haploïdes de Hordeum, par exemple, 60 pour cent des chromosomes peuvent réaliser à ce stade des appariements très précis malgré un manque total d'affinités de structure, et ces liaisons qui ne subsistent pas au delà de la prophase méiotique ne donnent pas d'information sur les possibilités de crossing over entre des chromosomes (SADASIVAI AH et KASHA (21), FEDAK (7)). Les travaux de microscopie électronique ont donc permis de confirmer et de préciser ce que la microscopie photonique avait déjà permis d'entrevoir, c'est à dire que les notions d'appariement chromosomique et de conjugaison chromosomique ne se superposent pas exactement. Ce n'est là qu'un des dogmes relatifs à la méiose que les progrès des connaissances conduisent à réviser périodiquement (HOLIDAY (9), MAGUIRE (16), RILEY et FLAVELL (20)). On considère par exemple actuellement que des chromosomes homéologues parviennent à la méiose non seulement à s'apparier mais à former des chiasmats même s'ils n'ont plus en commun que quelques sites homoséquentiels d'ADN.

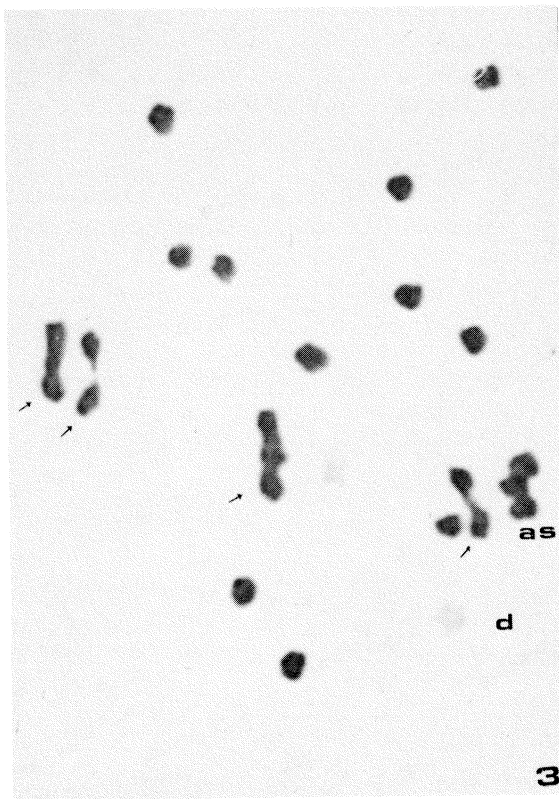
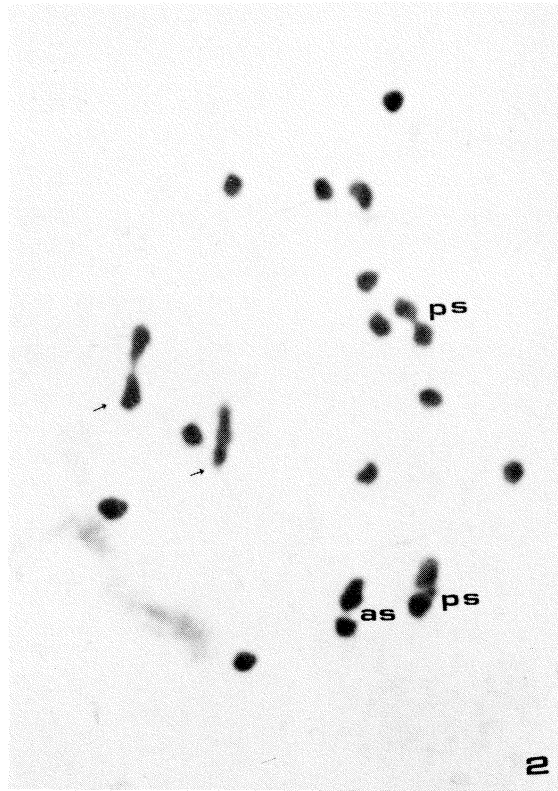
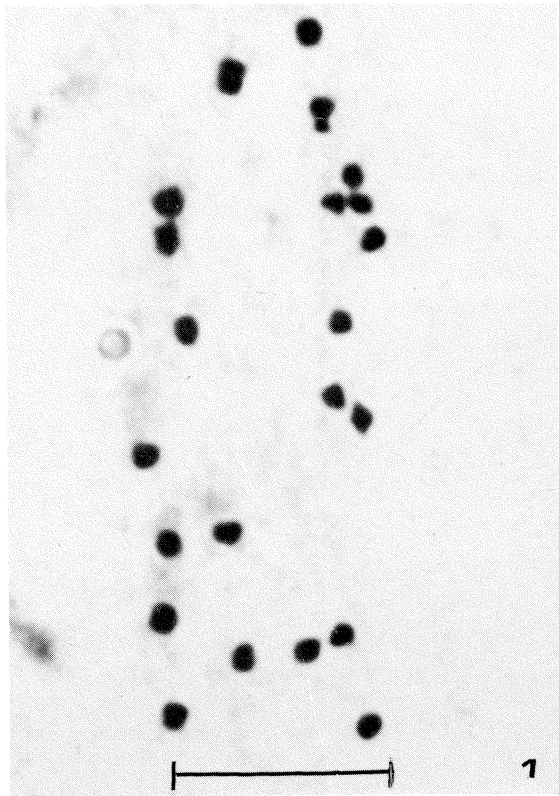
Le Tableau I permet d'évaluer le degré d'homéologie entre les deux génomes présents chez C. arabica. D'un haploïde à l'autre la fréquence de bivalents varie de 1.80 à 2.59. Cette fluctuation indique que l'expression de l'homéologie varie d'un haploïde à l'autre, ce qui peut être lié à la diversité des origines du matériel d'étude. On doit cependant prendre en considération la moyenne de ces résultats, d'après laquelle on peut estimer un indice de conjugaison chromosomique pour les haploïdes de C. arabica de $17.42 \text{ I} + 2.29 \text{ II}$. La valeur élevée de la fréquence de bivalents est un critère valable d'une structure d'allopolypléide segmentaire pour l'espèce C. arabica, comme on a pu le montrer à propos d'autres Angiospermes (MALIK et TRIPATHI (17)). Les haploïdes de C. arabica, porteurs de deux génomes qui ne sont pas complètement indépendants sont donc bien à considérer comme des dihaploïdes segmentaires. D'après le Tableau I il est apparent que trois chromosomes dans chacun des génomes se correspondent encore de très près et sont restés hautement homoséquentiels comme ils devaient l'être à la naissance de l'allotétraploïde ancêtre du caféier d'Arabie. De plus ces génomes manifestent aussi une affinité résiduelle dans les structures de trois autres chromosomes, ce qui explique pourquoi peuvent se former jusqu'à six bivalents à la méiose haploïde. Ces conclusions confirment de manière étroite le résultat de l'analyse caryologique faite directement sur la méiose de C. arabica (GRASSIAS et KAMMACHER (8)), ce qui peut être tenu pour preuve de ce que chez cette espèce la régulation de la synapsis n'est pas encore assurée aussi fermement que chez les Triticum dotés d'un système de type 5B bien connu. A la suite de ces considérations, il serait permis de supposer que le caféier d'Arabie, qui a rejoint le cortège des plantes cultivées seulement au cours de la période historique, il n'y a sans doute guère plus d'un millénaire, est un allotétraploïde d'origine relativement récente dont la diploïdisation n'est pas encore parvenue à son terme. Ceci repose le problème de l'ascendance de C. arabica. Il est hors de doute que l'un des génomes constitutifs de l'espèce est le génome C que se partagent sans modifications importantes tous les Coffea diploïdes sensu stricto (DEMARLY (5)). La présente étude renforce l'hypothèse que le second génome impliqué dans la synthèse de C. arabica n'a pas d'équivalent dans les Coffea actuels. En effet, les hybrides obtenus par le croisement des Coffea diploïdes les plus différenciées ont une conjugaison chromosomique beaucoup plus étroite que les dihaploïdes de C. arabica (CHARRIER (4)). LEROY (15) a envisagé qu'il existe une filiation directe entre les genres Paracoffea et Coffea. Il est possible que la séparation se soit accomplie dans l'est de l'Afrique, près du centre d'origine botanique de C. arabica, territoire où se rencontrent encore de nos jours des Rubiacées à 11 paires de chromosomes. Il est acquis que le génome C. de C. arabica est issu d'un Coffea diploïde. Par contre le génome qui lui est associé dans une structure allotétraploïde n'a pas d'équivalent dans les Coffea connus actuellement. Il a pu provenir d'un taxon situé dans un genre affine de Coffea, dont il n'existe peut-être plus de représentants dans la nature actuelle.

Bibliographie

1. BERTHAUD J. 1976. Etude cytogénétique d'un haploïde de Coffea arabica. Café, Cacao, Thé, XX, 2, 91-96.
2. BROWN M.S. 1954. A comparison of pachytene and metaphase pairing in species hybrids of Gossypium. Abstract. Genetics, 39, 962-963.
3. CARVALHO A. 1952. Taxonomia de Coffea arabica L. VI. Caracteres morfológicos dos haploides. Bragantia, XII, 4-6, 201-212.
4. CHARRIER A. La structure génétique des caféiers spontanés de la région malgache. 1968. Publ. ORSTOM (Paris), 224 pp.
5. DEMARLY Y. 1975. Amélioration du café liée aux progrès génétiques. 7e Coll. Int. Chimie Café (ASIC), Hambourg, 423-436.
6. DUBLIN P. et PARVAIS J.P. 1975. Sur la recherche des haploïdes issus de polyembryons chez le C. arabica. 7e Coll. Int. Chimie Cafés (ASIC), Hambourg, 505-511.
7. FEDAK G. 1977. Haploids from barley x rye crosses. Canad. J. Genet. Cyt., 19, 15-19.
8. GRASSIAS M. et KAMMACHER P. 1975. Observations sur la conjugaison chromosomique de Coffea arabica L. Café, Cacao, Thé, XIX, 3, 177-190.
9. HOLIDAY R. 1977. Recombination and meiosis. Philosoph. Transactions Roy. Soc. London. B 277 (955) 359-370.
10. HUSKINS. 1932. A cytological study of Vilmorin's unfixable dwarf wheat. J. Genet., 25, 113.
11. KAMMACHER P. et CAPOT J. 1972. Sur les relations caryologiques entre Coffea arabica et C. canephora. Café, Cacao, Thé, XVI, 4, 289-294.
12. KAMMACHER P. 1977. Utilisation des ressources génétiques du genre Coffea pour l'amélioration des caféiers cultivés. 8e Coll. Scient. Int. Café (ASIC), Abidjan, 335-357.
13. KIMBER G. et RILEY R. 1963. Haploids Angiosperms. Bot. Rev. 29, 490-531.
14. LEROY J.F. 1967. Recherches sur les Caféiers. Sur la classification biologique des Caféiers et sur l'origine et l'aire du genre Coffea. C.R. Acad. Sci., Paris, 265, 1043-1045.
15. LEROY J.F. 1968. Notice sur les Titres et Travaux scientifiques de J.F. LEROY. Imp. MONNOYER (Le Mans) fascicule II, 38 p.
16. MAGUIRE M.P. 1977. Homologous chromosome pairing. Philosoph. Transactions Roy. Soc. London. B 277 (955), 245-258.
17. MALIK C.P. et TRIPATHI R.C. 1970. Mode of chromosome pairing in the polyploid tall Fescue (Festuca arundinacea Schreb. $2n = 42$). Zeit für Biol., 116, 332-339.
18. MENDES A.T.J. et BACCHI O. 1940. Observações citológicas em Coffea: Uma variedade haploide (dihaploide) de Coffea arabica L. Jornal de Agronomia, 3 (3), 183-206.
19. OSTERGRÉN G. et VIGFUSSON E. 1953. On position correlation of univalents and quasibivalents formed by sticky univalents. Hereditas, 39, 33-50.
20. RILEY R. et FLAVELL R.B. 1977. A first view of the meiotic process. Philosoph. Transactions Roy. Soc. London, B 277 (955), 191-199.
21. SADASIVIAH R.S. et KASHA K.J. 1971. Meiosis in haploid barley. An interpretation of non-homologous associations. Chromosoma, 35, 247-263.
22. VISHVESHVARA S. 1960. Occurrence of a haploid in Coffea arabica L. cultivar "Kents". Indian Coffee, 24, 123-124.
23. WALTERS M.S. 1950. Spontaneous breakage and reunion of meiotic chromosomes in the hybrid Bromus trinii x Bromus maritimum. Genetics, 35, 11-37.

Explication des illustrations

4 microphotographies de plaques équatoriales de Métaphase I à la méiose haploïde de Coffea arabica L. Le grossissement est indiqué par le trait mis sur la photographie N°1, qui représente une longueur de 10 microns. N° 1: 22 univalents séparés. N° 2: 1 bivalent droit et 1 bivalent en anneau (flèches), 2 pseudobivalents (ps), 1 association secondaire (as). N° 3: 2 bivalents droits, 2 bivalents en anneau (flèches), association secondaire de 3 univalents (as). N° 4: 1 biv.droit, 3 biv. anneau (fl.).



CARACTERISTICAS DE LA VARIEDAD ERECTA-CENICAFE, NUEVA VARIEDAD DE *C. ARABICA*

F. J. OROZCO-CASTAÑO

Asistente de la Sección de Fitomejoramiento del Centro Nacional de Investigaciones de Café,
CENICAFÉ, Chinchiná, Caldas, Colombia

INTRODUCCION

Desde hace muchos años se conoce la característica erecta en *Coffea arabica*, descrita como una mutación originada en la variedad Típica (1, 2, 4, 5). Se anota como diferencia fundamental entre las variedades Típica y Erecta, el hábito de crecimiento casi vertical que muestran las ramas laterales primarias de esta última, las cuales forman un ángulo agudo con el tallo, dándole a sus árboles una forma cerrada, característica. Los demás órganos son similares a los de Típica.

Los estudios genéticos hechos en la variedad Erecta atribuyen esta característica a un par de factores genéticos (denominados Er er). La dominancia del alelo Er es completa, su expresividad es constante y la penetrancia es completa (2, 4).

Dentro de las variedades de porte pequeño no se han descrito mutaciones con el carácter Erecta.

En las colecciones de Cenicafé no se tiene la variedad Erecta ni se conocen registros de su introducción a Colombia. Se tiene en la colección la introducción denominada Vertical Branches pero sus árboles no muestran crecimiento erecto de sus ramas, como los descritos por Jones (3) para este cultivar, en Kenya.

Dentro de un ensayo experimental hecho con plantas de la variedad Caturra se encontraron dos plantas con crecimiento vertical en sus ramas laterales y con características fenotípicas similares a las de la variedad Caturra.

Árboles de Caturra con este tipo de crecimiento erecto en sus ramas pueden ofrecer ventajas respecto a los caturra normales, si conservan la productividad de éstos. Estos árboles permitirían siembras más densas y facilitarían el control de enfermedades, especialmente la roya, por el porte y forma del árbol y por presentar, debido a su hábito de crecimiento una copa alta. La disposición de ramas y hojas podría también ofrecer ventajas fisiológicas en cuanto a un mejor aprovechamiento de la luz.

Finalmente, algunos autores (2) coinciden en recomendar los árboles con este tipo de crecimiento para regiones con vientos fuertes.

Debido a que no existen en las introducciones de café hechas a Colombia, árboles con el gen erecta, que pudieran haber dado origen a un cruzamiento natural, y a que no se conocen registros de plantas con sus ramas erectas en la variedad Caturra, se programó el estudio genético y morfológico de las plantas encontradas en Cenicafé, cuyo análisis se describe a continuación.

MATERIALES Y METODOS

En dos árboles de una población de la variedad Caturra de *C. arabica*, de tres años de edad, que presentaban crecimiento vertical de sus ramas, se hicieron autofecundaciones y cruzamientos con árboles normales de la variedad Caturra. Para los cruzamientos se usaron las plantas de Caturra como progenitor femenino.

Se estudiaron las progenies de cada árbol y del cruzamiento y en cada una de ellas se determinó el número de plantas con ramas erectas y el número de plantas normales. En 20 plantas de cada progenie se hicieron las siguientes medidas: en plantas de 7 meses de edad se midió el ángulo de salida de las ramas primarias; posteriormente en plantas con 20 meses, después de su traslado al sitio definitivo, se midió la altura, el número de pares de ramas primarias y el ángulo de salida de éstas. En 40 hojas por progenie, del tercero y cuarto par, a partir del brote, se midió el largo, el ancho y el ángulo de la base de la hoja y se calculó el producto largo por ancho de la hoja (tamaño) y largo sobre ancho (forma). También se midió el peso fresco y seco de las hojas.

Para describir en una muestra mayor, las características de las plantas de la variedad Erecta-Cenicafé, se midió en 600 plantas, progenie del árbol homocigoto, la altura, el número de pares de ramas primarias y el diámetro de la copa o anchura del árbol, en plantas con un año de sembradas en el campo. En 800 hojas del tercero y cuarto par, a partir del brote terminal de las ramas primarias, se midió la longitud, anchura y el ángulo de la base de la hoja y se determinó el peso fresco y seco. Se calculó el tamaño (largo por ancho) y la forma (largo sobre ancho) de la hoja. Además, se hicieron observaciones microscópicas de la nervación y de las domacias.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla 1, se presenta el número de plantas con ramas erectas y normales obtenido en cada progenie de autofecundación o cruzamiento.

Se observa que en el primer árbol el carácter erecta está en forma heterocigota ($Er\ er$) por estar segregando en su progenie plantas erectas y normales. La prueba de X^2 (Ji cuadrado) indica que la segregación está ocurriendo en la proporción esperada (3:1) para un par de factores.

El segundo árbol, al autofecundarlo artificialmente, produjo únicamente plantas con ramas erectas. En la misma forma, la progenie del cruzamiento de este árbol con plantas de Caturra normales, estuvo constituida totalmente por plantas con sus ramas erectas. Estos resultados indican que en el segundo árbol el carácter erecta (Er) está en condición homocigótica ($Er\ Er$) y que el comportamiento de este factor genético es similar al observado en la variedad erecta de porte alto de *C. arabica*, completamente dominante y altamente expresivo (2).

Tanto en las progenies de autofecundación como en los cruzamientos, las plantas producidas son de porte pequeño, entrenudo corto y aspecto de Caturra; se concluye, entonces, que los árboles estudiados tienen también el factor Caturra en forma homocigótica ($Ct\ Ct$). Esta es la característica principal de los árboles encontrados en Cenicafé, pues hasta ahora en los reportes conocidos se registra el carácter erecta solo en plantas de porte alto como las de la variedad Típica.

Puede decirse, entonces, que estos árboles son el producto de una mutación en la variedad Caturra pudiéndose denominar a la planta que reúne estos dos caracteres ($CtCt\ ErEr$) como *C. arabica* variedad Erecta-Cenicafé.

CARACTERISTICAS BIOMETRICAS DE LAS PROGENIES

En la tabla 2, se presentan los promedios obtenidos en el ángulo de los dos primeros pares de ramas primarias en plantas con 7 meses de edad, en el vivero. El ángulo medido es aquel que forman las dos ramas primarias opuestas en su inserción en el tallo.

Se observa un ángulo promedio mayor a los 80 grados en los Caturra normales (recesivos por el gen erecta), mientras en las erectas el promedio solo alcanza 42 grados. El ángulo de la rama es menor en la progenie del árbol homocigoto que en el heterocigoto y los cruzamientos tienen ángulos similares al heterocigoto.

Al comparar los registros de la primera y segunda cruz se puede apreciar, además, que a medida que se lignifican las ramas, el ángulo de salida se reduce en los erectas mientras en los normales tiende a ensancharse (tabla 2).

Los árboles originales de la variedad Caturra-Erecta difieren en vigor siendo más vigoroso el árbol homocigoto; ambos producen frutos y semillas normales con una forma similar a los de la variedad Caturra.

Por las observaciones hechas en el árbol homocigoto original, puede esperarse una producción normal en las progenies. En la cosecha de 1977, este árbol produjo 1.200 gramos de semilla seca (15⁰/₀ de humedad).

En la tabla 3, se presentan los promedios generales, para cada progenie de las medidas de altura, número de pares de ramas primarias y ángulo de la rama en plantas con 20 meses de sembradas en el campo.

Se observa que no hubo diferencia entre los valores medidos en las progenies de los árboles homocigoto y heterocigoto; la progenie del cruzamiento muestra cierto vigor híbrido, altura un poco mayor y mayor número de pares de ramas primarias. Las diferencias con las plantas de la variedad Caturra son notorias; mayor altura en el Erecta y sus progenies y menor ángulo de las ramas.

El ángulo de la rama en plantas con mayor desarrollo es un poco más amplio, tanto en los erectas como en el Caturra, pero se conservan las diferencias entre los dos grupos de plantas.

En cuanto a las dimensiones de la hoja, en la tabla 4 se presentan los promedios generales para cada una de las medidas tomadas en las hojas y sus pesos fresco y seco.

Puede observarse que no hubo diferencias sobresalientes entre las medidas de las hojas de las progenies de los árboles homocigoto, heterocigoto y del cruzamiento a excepción del ángulo de la hoja y del peso fresco y seco un poco menores en los cruzamientos. Las diferencias fueron notorias cuando se compararon las hojas de las progenies del Erecta con las de la variedad Caturra; éstas hojas son de menor tamaño pero de forma similar, el ángulo de la base de la hoja es menor y los pesos fresco y seco son mucho menores.

Características de las progenies del árbol homocigoto.

Con el propósito de caracterizar la variedad Erecta-Cenicafé, se tomaron medidas en un mayor número de individuos (600) provenientes de la progenie de polinización libre del árbol homocigoto y un año después de plantadas en el campo.

En la tabla 5, se presentan los promedios obtenidos y se comparan con las medidas en 200 plantas de la variedad Caturra.

Pueden observarse diferencias sobresalientes entre las dos variedades así: mayor altura en las plantas de Erecta-Cenicafé; 16 cm de diferencia en plantas de un año; mayor número de pares de ramas primarias en la variedad Caturra entre 2 y 3 pares más; y un diámetro de la copa o anchura del árbol y sus ramas, mayor en Caturra, 27 cm en un año.

En cuanto a los medidas en las hojas los resultados se resumen en la tabla 6.

Como se observó en la comparación de progenies, existen diferencias en las dimensiones de las hojas. En los datos comparados en la tabla 6, los valores para ambas variedades fueron mayores a los registrados en las progenies (Tabla 4); ésto debido posiblemente a diferencias ambientales y en las características del suelo.

Como ya se había hecho notar el tamaño de las hojas de la variedad Erecta-Cenicafé es mayor, aún cuando la forma de la hoja es similar, el ángulo de la base de la hoja es más amplio y los pesos fresco y seco son mayores.

La variedad Erecta-Cenicafé es un poco más alta y vigorosa que el Caturra pero no alcanza un porte intermedio, es entonces una variedad de porte bajo, un poco mayor al Caturra.

Características anatómicas de las hojas de la variedad Erecta-Cenicafé.

En la variedad Erecta-Cenicafé las hojas tienen forma similar a las de la variedad Caturra, su limbo es más ondulado, de color verde intenso, las nervaduras más delgadas y finas.

Las domacias en la variedad Caturra están situadas sobre el ángulo que forma la nervadura secundaria en la unión a la nervadura central, tiene una cavidad amplia, el poro u orificio es de forma circular u ovalado, a veces con algunos pocos pelos grandes. En la variedad Erecta-Cenicafé las domacias tienen localización similar, son aparentemente más pequeñas, el poro es de forma variable pero más frecuentemente ovalado alargado, sin pelos.

Estudio y utilización de la variedad Erecta-Cenicafé.

Teniendo en cuenta las buenas características que han mostrado los árboles de la variedad Erecta-Cenicafé, se ha iniciado el estudio de la capacidad productiva, de las características del grano y del manejo de las plantaciones. Simultáneamente se ha iniciado el programa de introducción de la resistencia a roya (*Hemileia vastatrix* Berk y Br.) proveniente del Híbrido de Timor a esta nueva variedad.

Se tienen 40 árboles F1 de Erecta-Cenicafé por Híbrido de Timor con 6 meses de sembrados en el campo, posteriormente se obtendrán progenies F2 y F3 de los árboles seleccionados y probados por resistencia a roya.

Conclusión.

Por las características genéticas y morfológicas diferentes a las de la variedad Caturra y no descritas antes en ninguno de los materiales de la especie *C. arabica* conocido o introducido a Colombia, se consideró ésta como una nueva variedad la cual se denominó inicialmente como Caturra-Erecta por provenir de una plantación de esta variedad y por su porte bajo similar al Caturra; después de los estudios morfológicos se consideró adecuado denominarla *C. arabica* variedad Erecta-Cenicafé.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- CARVALHO, A. Recent advances in our knowledge of coffee trees. 2. Genetics. Coffee and Tea Industries (EE. UU.) 81(11):30-36. 1958.
- 2.- CARVALHO, A.; KRUG, C. A. Genética de *Coffea*. XIII. Hereditariedade do caracteristico erecta en *Coffea arabica* L. Bragantia (Brasil) 10(11):321-328. 1950.
- 3.- JONES, P. A. Notes on the varieties of *Coffea arabica* in Kenya. Coffee Board of Kenya monthly Bulletin 21(251):305-309. 1956.
- 4.- KRUG, C. A. and CARVALHO, A. The genetics of *Coffea*. Advances in Genetics (EE. UU.) 4:127-158. 1951.
- 5.- KRUG, C. A.; MENDES, J. E. T. e CARVALHO, A. Taxonomia de *Coffea arabica* L. 62:59. Campiñas (Brasil) Instituto Agronómico do Estado, 1939. 59 p. (Boletín Técnico N° 62).

TABLA 1.- RESULTADOS DE LAS AUTOFECUNDACIONES Y CRUZAMIENTOS EN DOS PLANTAS DE LA VARIEDAD CATURRA CON RAMIFICACION ERECTA.

Características	Autofecundaciones		Cruzamientos con el árbol homocigoto
	Arbol Heterocigoto	Arbol Homocigoto	
Plantas erectas	77	155	134
Plantas normales	28	0	0
Total progenie	105	155	134
Valor X ²	0,16**	—	—

** Segregación 3:1 significativa al 10/0.

TABLA 2.- MEDIDAS EN EL ANGULO DE LAS RAMAS EN PROGENIES DE AUTOFECUNDACION Y CRUZAMIENTO EN ARBOLES DE ERECTA Y CATURRA, CON 7 MESES DE EDAD.

Progenie	Primer par		Segundo par		Genotipo
	Promedio	Límites	Promedio	Límites	
Arbol Nº 1	37,8	(24-68)	42,4	(28-68)	Er er
Arbol. Nº 2	27,9	(14-48)	35,1	(18-67)	Er Er
Caturra x Erecta Nº 2	40,4	(30-58)	47,0	(35-64)	Er er
Caturra Testigo	88,7	(80-100)	83,8	(74-94)	er er

TABLA 3.- COMPARACION DE LAS PROGENIES DE ERECTA EN CUANTO A LA ALTURA, NUMERO DE PARES DE RAMAS PRIMARIAS Y ANGULO DE LA RAMA, EN PLANTAS CON 20 MESES.

Progenie	Altura cm	Nº de pares de ramas	Angulo de la rama
Del árbol homocigoto	132,7	18,5	61,3
Del árbol heterocigoto	131,2	19,7	64,4
Cruzamiento (Caturra x Erecta)	140,1	21,9	62,8
Caturra normal (Testigo)	107,3	21,0	105,9

TABLA 4.- DIMENSIONES Y PESOS DE LAS HOJAS EN PROGENIES DE ERECTA.

Progenie	Largo cm	Ancho cm	Tamaño L X A cm ²	Forma L/A	Angulo de la hoja	Pesos	
						Fresco g	Seco g
Del homocigoto	13,4	6,8	91,1	2,0	88,3	1,86	0,63
Del heterocigoto	12,9	6,4	82,2	2,1	85,7	1,75	0,57
Cruzamiento	13,1	6,4	83,3	2,1	82,5	1,60	0,54
Caturra (Testigo)	11,7	5,7	67,3	2,1	80,8	1,28	0,43

TABLA 5.- COMPARACION DE LAS MEDIDAS EN EL ARBOL ENTRE LAS VARIETADES ERECTA-CENICAFE Y CATURRA.

Variedad	Altura cm	Nº de pares de ramas primarias	Diámetro copa
Erecta-Cenicafé	97,9	12,1	55,2
Caturra (Testigo)	81,5	14,7	82,4

TABLA 6.- COMPARACION DE LAS DIMENSIONES DE LAS HOJAS ENTRE LAS VARIETADES ERECTA-CENICAFE Y CATURRA.

Variedad	Largo cm	Ancho cm	Tamaño L x A cm ²	Forma L/A	Angulo de la hoja	Pesos	
						Fresco g	Seco g
Erecta-Cenicafé	14,1	7,3	102,5	2,0	91,3	2,18	0,79
Caturra (Testigo)	11,9	6,1	72,1	2,0	83,5	1,47	0,58

SELECCIÓN DE CRUZAMIENTOS DERIVADOS DEL HÍBRIDO DE TIMOR EN LA OBTENCIÓN DE VARIEDADES MEJORADAS DE CAFÉ PARA COLOMBIA

J. CASTILLO-ZAPATA

Jefe de la Sección de Fitomejoramiento

G. MORENO-RUIZ

Asistente de la Sección de Fitomejoramiento

Centro Nacional de Investigaciones de Café, CENICAFÉ,

Chinchiná, Caldas, Colombia

INTRODUCCION

La uniformidad genética de las variedades comerciales de café en América Latina es un hecho reconocido, aunque poco documentado sobre base experimental (24). La producción y otros caracteres agronómicos son marcadamente homogéneos dentro de esas variedades, lo cual se explica por el origen restringido de las primeras plantas importadas a América (7, 9, 15, 24). La resistencia a enfermedades es otro carácter que presenta pocas variaciones. Con relación a la roya del cafeto, causada por Hemileia vastatrix B. & Br., por ejemplo, se ha comprobado que en esas variedades solo existe el gen de resistencia SH5 (10).

Uno de los objetivos básicos del programa de mejoramiento en Colombia es, en consecuencia, la creación y explotación de suficiente variabilidad genética, no solamente con relación a las características agronómicas asociadas con la producción, sino también en cuanto a la resistencia a diversos patógenos. Contra la roya del cafeto, enfermedad no detectada en el país hasta el momento, se está utilizando la resistencia conocida como vertical, la cual se evalúa por medio de pruebas efectuadas en el CIFC de Portugal, en los materiales de origen híbrido producidos en Colombia.

Una amplia experiencia sobre el uso de la resistencia vertical ha demostrado que ésta aparece asociada a cambios espectaculares en las poblaciones de los patógenos y a una extrema uniformidad genética de los cultivares resistentes. Los ciclos de auge y depresión de estos cultivares y sus consecuencias económicas han sido ampliamente demostrados(6) y han llevado a la conclusión de que el problema fundamental con este tipo de resistencia es el de darle un manejo adecuado (17). Van der Plank (18) ha analizado extensamente las bases científicas de ese manejo y cuestionado su empleo en cultivos perennes. Robinson examina con detalle este problema (19) y analiza especialmente el caso del café (20). Este autor, al igual que Bingham (4), destacan las limitaciones de algunos sistemas propuestos para el manejo de la resisten-

cia vertical, cuando se aplican en cultivos perennes de ciclo económico prolongado y rotaciones con largos períodos.

La "coexistencia" ha sido propuesta por Bingham (4) como criterio para el manejo de la resistencia vertical, apoyándose en el estudio de los sistemas naturales en que huésped y parásito han alcanzado un equilibrio patológico. Según este criterio, los sistemas naturales en equilibrio se emplean como "modelos" para el manejo de la resistencia. La de tipo vertical actúa en forma de una multilínea natural, que está respaldada por suficiente resistencia horizontal (4, 5). Cuando el equilibrio se rompe a favor del patógeno, una ligera presión selectiva en el huésped es suficiente para restablecer el equilibrio (4).

La manera de emplear en forma prudente y eficaz la resistencia vertical en los cultivos perennes, seguramente continuará siendo tema de controversia. Sin embargo, la disponibilidad de variación genética parece ser la condición básica para el desarrollo de cualquier sistema de manejo. Por otra parte, una amplia experiencia indica que la "vulnerabilidad" de los cultivos a las epidemias de carácter explosivo está asociada a la uniformidad genética de los cultivares (12). Parece, pues, prudente atenerse al criterio de Browning, para aplicarlo al caso del café: "la diversidad es la clave de la estabilidad contra las pestes de las plantas y, por ello, la única protección contra lo desconocido" (5).

En el programa de mejoramiento de café que se adelanta en Colombia, se está usando germoplasma de diverso origen con el propósito de ampliar la base genética de las variedades comerciales (8). Entre el germoplasma utilizado ha recibido especial atención el Híbrido de Timor, una población tetraploide ($2n = 44$) de origen interespecífico (*C. arabica* x *C. canephora*) que es muy apropiada para la explotación de esquemas de mejoramiento cuya base sea la diversidad genética, debido a su riqueza de factores de resistencia vertical (4) y a la aparente presencia de resistencia general (13).

En este trabajo se discuten algunos de los principales resultados obtenidos en 10 años de labores utilizando el Híbrido de Timor como progenitor resistente en cruzamientos con variedades comerciales de tipo Caturra. Se hace énfasis en los caracteres agronómicos de la descendencia que se consideran de mayor importancia, tales como la producción, la adaptabilidad, los defectos en las semillas y obviamente, la resistencia a Hemileia vastatrix.

Producción

Los cruzamientos del Híbrido de Timor con la variedad Caturra originan progenies F3 con altos niveles de producción, similares a los de esta variedad y, ocasionalmente más altos.

La aseveración anterior se deduce del análisis de la producción en dos series de materiales que se muestran en la Tabla 1. La serie 1 está compuesta por 7 progenies F3, observadas en 3 localidades, durante 3 cosechas. La serie 2 está formada por 16 progenies F3 estudiadas en una sola localidad durante 4 cosechas. Las progenies F3, cuyos progenitores F2 no fueron seleccionados, pueden considerarse como una muestra aleatoria de la tercera generación del cruzamiento. En ambas series se emplean como testigos los cultivares Caturra y Catuaí, cuyo porte bajo está con-

TABLA 1. Producción media de progenies F3 de Caturra x Híbrido de Timor y variedades testigo, obtenida en 3 localidades durante 3 cosechas (serie 1) y en una localidad durante 4 cosechas (serie 2).

Progenies F3 P.L. #	Producción *					
	Serie 1			Serie 2		
	Localidad			Localidad		
C**	L**	A**	\bar{X}	C**		
989	3808	3808	4256	3957	3680	
1000	4872	2744	3360	3659	4760	
1302	-	-	-	-	4594	
1304	-	-	-	-	4694	
1313	4200	3696	4088	3995	4214	
1372	-	-	-	-	4586	
1378	4424	3920	4032	4125	4303	
1382	-	-	-	-	3706	
1386	-	-	-	-	4434	
1392	-	-	-	-	4078	
1402	4200	3304	3584	3696	4170	
1404	4368	4088	2856	3771	4477	
1406	4592	4312	4424	4443	4670	
1407	-	-	-	-	3899	
1409	-	-	-	-	4150	
1429	-	-	-	-	4707	
\bar{X} progenies	4352	3696	3800	3949	4320	
<u>Variedades Testigos</u>						
Caturra rojo	4088	4592	3920	4200	3937	
Caturra amarillo	4088	4144	3472	3901	3923	
Catuaí rojo	4368	4032	3864	4088	4047	
Catuaí amarillo	3528	4032	2968	3509	3224	
\bar{X} testigos	4018	4200	3556	3925	3783	
\bar{X} localidades	4230	3879	3735	3940	4212	

* / En Kg de café pergamino seco Ha/año

** C : Chinchiná, Caldas - L : Líbano, Tolima - A : Albán, Valle.

trolado por el gen Caturra (Ct), dominante, que reduce el tamaño de los entrenudos (14). La variedad Caturra se ha sembrado extensamente en Colombia en los últimos 15 años, obteniéndose altos rendimientos por unidad de superficie en diversas áreas del país.

Como se aprecia en la tabla citada, en cada localidad existen progenies F3 cuya producción es comparable o superior al promedio de las variedades testigo. Sin embargo, el análisis combinado de la producción de los materiales de la serie 1, que se muestra en la Tabla 2, indica que las diferencias entre las progenies, y entre éstas y las variedades testigo, no son significativas, mientras que sí lo son las diferencias entre localidades y la interacción genotipo x localidad. Esto explica el porqué en algunos sitios se detectan claramente progenies con mayor producción que los cultivos testigo, pues, cuando la producción se analiza en cada localidad, separadamente, el efecto de la interacción no es percibido.

TABLA 2. Análisis de varianza combinado de la producción acumulada durante 3 cosechas, para 7 progenies F3 de Caturra x Híbrido de Timor y 4 variedades testigo, estudiadas en 3 localidades. Datos en Kg/parcela.

Fuente de variación	G.L.	C.M.	F.
Genotipos	10	88.59	
Localidades	2	328.10	3.9*
Genotipos x localidades	20	83.97	2.86**
(Gen. x rep.) en localidad	30	29.37	
Total	65	64.64	

* $P \geq 95 \%$

** $P \geq 99 \%$

En resumen, el nivel de producción de las progenies F3 del cruzamiento Caturra x Híbrido de Timor, es similar al de la variedad Caturra, que ha tenido amplia aceptación en Colombia. Esto significa que se parte de un material muy productivo para la selección posterior.

Posibilidad de aumentar la producción con selección

Una variación amplia en la producción "dentro" de las progenies F3 es otra característica observada en los materiales estudiados. Esta variación se analizó en los materiales de la serie 2 que contiene una muestra más amplia de 16 progenies F3, observadas por un período más prolongado, de 4 cosechas. El análisis de varianza (Tabla 3) demostró que la mayor variación es la originada por los árboles dentro de las parcelas (Va), que aportan el 79 % de la variación fenotípica.

TABLA 3. Análisis de varianza y componentes de la variación de la producción acumulada durante 4 cosechas, para 7 progenies F3 de Caturra x Híbrido de Timor y 4 variedades testigo estudiadas en Chinchiná. Datos en Kg/planta.

Fuente de variación	G.L.	C.M.	C.M.E.	Componente	
				Magnitud	Contribución 1/ %
Replicaciones	1	4.63			
Genotipos	19	138.64**	Va + a Vgr + ar Vg	Vg = 7.70	21
Gen. x Repl.	19	15.46	Va + a Vgr	V gr = -1.67 (0)	0
Arboles en (Gen. x Repl.)	280	28.87	Va	Va = 28.87	79
Total	319				

Replicaciones = r = 2 ; Genotipos = g = 20 ; Arboles en parcela = a = 8

1/ a la varianza fenotípica = Va + V gr + Vg

** F significativo al nivel de P = 0.01

$$H = \frac{\text{Var. genética}}{\text{Var. genética} + \text{Var. ambiental}} = \frac{Vg}{Vg + (Va + V gr)} = \frac{7.7}{7.7 + (28.87 + 0.00)} = 0.21$$

El valor del coeficiente de heredabilidad, en sentido amplio, calculado con los componentes de varianza de la tabla anterior, puede considerarse bajo ($H = 0.21$). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que en este cálculo de la heredabilidad solamente se considera como variación genética la componente de genotipos ($V_g = 7.7$), mientras que es preciso tomar toda la varianza entre árboles ($V_a = 28.37$) como ambiental. En este caso, la heredabilidad calculada es característica de una población homogénea, pero no lo es de una población en segregación, tal como la generación F3, en la cual parte de la variación entre árboles debe ser de naturaleza hereditaria.

El uso de variedades homogéneas como testigos, ofrece la oportunidad de hacer un segundo estimativo de la heredabilidad (23). Para ello se supone que la varianza dentro de los testigos es estrictamente ambiental, suposición basada en la marcada uniformidad de las variedades Caturra y Catuaí, mientras que la varianza dentro de las progenies F3 se considera compuesta por una fracción ambiental y por otra hereditaria.

Las varianzas medias que se obtuvieron " dentro " de las progenies F3 y " dentro " de los testigos fueron de 33,60 y 13,58, respectivamente. La diferencia, 20,08, constituye una medida de la variación genética observada entre árboles, que debe ser adicionada al componente de genotipos para calcular el nuevo estimativo de la heredabilidad :

$$H = \frac{7,70 + 20,08}{(7,70 + 20,08) + (13,58 + 0,0)} = 0.67$$

Este nuevo valor de H representa mejor la situación analizada y, al ser usado para predecir la ganancia genética (1), indica que habría un aumento probable en la producción del 29 % si se selecciona el 5 % superior en la población de árboles. En consideración a lo anterior se deduce que en la generación F3 existe una amplia variación genética en producción, especialmente entre árboles de las progenies, que explotada convenientemente debe aumentar la producción en futuras generaciones.

Adaptabilidad

Se considera que una variedad tiene un buen nivel de adaptabilidad cuando su comportamiento en una serie de ambientes es estable y su producción media es elevada.

Una variedad es estable, en términos estadísticos, cuando no interactúa con el ambiente, tomando como referencia el comportamiento promedio de las variedades estudiadas. Para el análisis de la estabilidad se han desarrollado varias técnicas descritas por Freeman (11), basadas en la estimación de la influencia de cada variedad o genotipo en la interacción genotipo x localidad. En este trabajo se analizó la estabilidad de la producción de los materiales de la serie 1, mencionados antes, utilizando dos sistemas : la ecovalencia desarrollada por Wrike (citado por Freeman, 11) y la varianza de estabilidad, propuesta por Shukla (22). La primera consiste en la contribución de cada genotipo a la suma de cuadrados de la interacción de genotipo por localidad. La segunda es una estimación imparcial del cuadrado medio de la contribución de cada genotipo, calculado a partir de su ecovalencia y teniendo en cuenta el comportamiento en todas las localidades. Este criterio permite una prueba estadística de la magnitud de la varianza de estabilidad, por la cual se juzga si un genotipo es estable.

En la Tabla 4, se presentan las ecovalencias y las varianzas de estabilidad, cuyos valores indican que las progenies PL.989, PL.1000, PL.1404 y la variedad Catuaí amarillo fueron inestables, mientras el resto de materiales presenta índices que denotan estabilidad.

TABLA 4. Ecovalencia y varianza de estabilidad de la producción acumulada durante 3 cosechas, de 7 progenies F3 de Caturra x Híbrido de Timor y 4 variedades testigo estudiadas en 3 localidades. Datos en Kg/parcela.

Genotipos	Interacción G x L		Varianza de estabilidad
	Ecovalencia	%	
PL # 1000	638.13	38.00	380.64*
PL # 1404	269.64	16.06	155.45**
Catuaí amarillo	217.94	12.98	123.86**
PL # 989	201.64	12.01	113.90*
Suma	1327.35	79.05	
Caturra rojo	136.27	8.11	73.95
PL # 1402	64.36	3.83	29.99
PL # 1313	62.05	3.70	28.59
Caturra amarillo	51.42	3.06	22.09
PL # 1406	27.51	1.64	7.48
PL # 1378	9.55	0.56	3.49
Catuaí rojo	0.78	0.05	8.86
Suma	351.94	20.95	
Total	1679.29	100.00	

* $P \geq 95 \%$

** $P \geq 99 \%$

Error para medir la varianza de estabilidad = 29.37

Se observa que los siete genotipos estables solo contribuyen con el 21 % de la suma de cuadrados de la interacción, mientras el 79 % restante es aportado por los cuatro materiales inestables. Las varianzas de estabilidad presentan también notables contrastes dentro de materiales inestables (380,6 a 113,9) y estables (73,9 a 3,4). Se deduce que existe una amplia variabilidad en la estabilidad de las progenies F3, que permitirá la selección posterior de genotipos con amplia adaptación.

Otro aspecto importante es la asociación positiva que se encontró entre estabilidad y producción. En efecto, las variedades más estables, con menor ecovalencia, tienden a ser las más productivas. La correlación de rangos de Spearman dió un valor de -0,68, altamente significativa, cuando se correlacionaron las ecovalencias y las producciones de las variedades. La figura 1 representa esa relación.

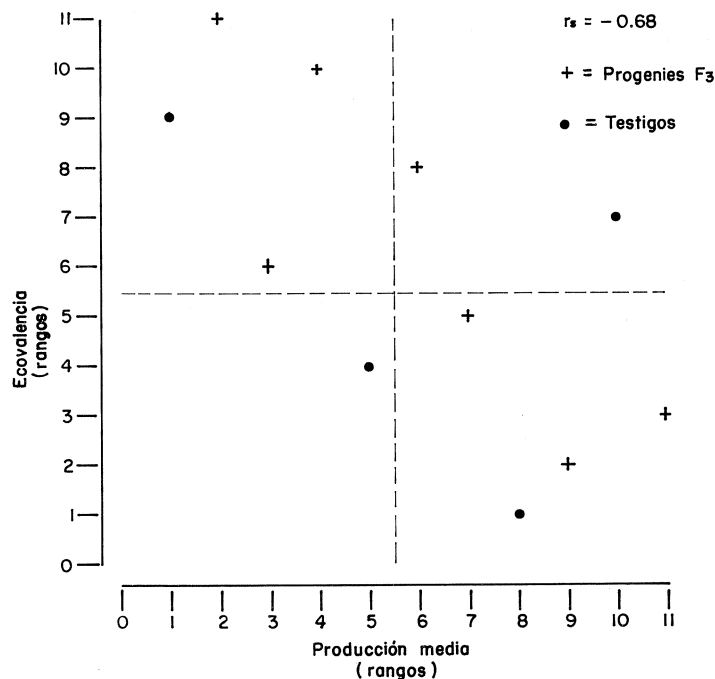


Figura 1.- ADAPTABILIDAD DE 7 PROGENIES F₃ DE CATURRA POR HIBRIDO DE TIMOR Y 4 VARIEDADES TESTIGO, MEDIDA EN 3 AMBIENTES DURANTE 3 COSECHAS.

En los materiales aquí estudiados no se notó una relación aparente entre el grado de heterogeneidad genética y la estabilidad, tal como se observa en otras especies (2). Puede especularse que en café, especie autógama, la estabilidad depende de alguna combinación genotípica particular.

Características de crecimiento de las plantas

Un grupo de características relacionadas con el crecimiento vegetativo y el vigor de las plantas se midieron en los materiales de la serie 2, con la finalidad de conocer su variabilidad, medir la relación con la producción y explorar la posibilidad de efectuar una selección temprana.

En cuanto a la altura de los árboles y el diámetro de su copa, se aprecia en la Tabla 5, que los grupos de progenies F₃ y de variedades de tipo Caturra tienen características similares. La incorporación del gen Caturra (Ct) en condición homocigótica en las progenies F₃, es la causa de que las diferencias mencionadas sean de poca magnitud, lo cual significa que las progenies F₃ pueden recibir en el campo las mismas prácticas culturales que las variedades de porte bajo.

Entre las progenies F₃ se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de pares de ramas primarias y en el vigor por planta. Sin embargo, estas diferencias también carecen de importancia práctica.

Similarmente a lo observado en la producción, la variación "entre" árboles tiene mayor importancia que la variación "entre" parcelas, lo cual se refleja en los valores de heredabilidad, calculados sobre las bases correspondientes (Tabla 5). Sin embargo

TABLA 5. Promedios por planta de algunas medidas biométricas en progenies F3 de Caturra x Híbrido de Timor y variedades de tipo Caturra estudiadas en Chinchiná, y valores de algunos parámetros relacionados.

Progenie o Variedad	Material estudiado		Característica			
	Progenies No.	Plantas No.	No. pares de ramas primarias/pl. <u>1/</u>	Altura/pl. (cm) <u>1/</u>	Diámetro/pl. (cm) <u>1/</u>	Vigor veg./pl. (puntos) <u>2/</u>
F3 de Cat. x H. de T.	16	256	48	201	187	5.3
Variedades	4	64	45	200	189	5.5
D.S.			3.8	24	18	0.9
C.V.			8.1	12.3	10.0	17.7
Hereditabilidad :						
plantas			0.31	0.21	0.28	0.10
parcelas			0.65	0.42	0.65	0.30

1/ A los 40 meses de edad

2/ Promedio de 5 calificaciones efectuadas entre los 12 y 40 meses de edad, utilizando una escala de puntos de 1 a 10.

la poca magnitud de las diferencias entre valores extremos resta interés práctico a un análisis más detallado de la variación.

Por otra parte, se utilizó un análisis de covarianza entre la producción y las características de crecimiento, para calcular las correlaciones fenotípicas y genotípicas. Se obtuvieron valores bajos y no significativos para los coeficientes r , lo cual indica que las características mencionadas son de poca utilidad para la detección precoz de los individuos más productivos.

Características de las semillas

En la población de Caturra x Híbrido de Timor comunmente se presentan defectos en las semillas en proporciones elevadas, especialmente de los denominados "vaneamiento" y "granos caracol". No obstante, si la selección es adecuada se pueden reducir esas proporciones a niveles comparables a los que exhiben las variedades comerciales en Colombia.

El éxito en la selección en semillas vacías y en granos caracol es una consecuencia de la notable variabilidad que ocurre en generaciones sin selección, atribuida a factores hereditarios (16). En los materiales que forman la serie 2 también se estudió la variación en estos defectos. Se encontró que las principales fuentes de variación se deben a diferencia de árboles y progenies y por tanto los valores de los coeficientes de heredabilidad y repetibilidad obtenidos fueron relativamente altos (Ver Tabla 6). Estos valores confirman la correlación estrecha y altamente significativa, calculada entre la cantidad de defectos observados en las progenies F3 y en sus respectivas plantas madres F2, que fue de $r = 0.89$ y $r = 0.69$ para semillas vacías y granos caracol, respectivamente.

TABLA 6. Componentes de la varianza en un análisis de las características de las semillas, en que se consideran muestras tomadas en cada árbol, árboles en cada parcela y genotipos como fuentes de variación; coeficientes de heredabilidad y repetibilidad.

Fuente de variación	Componente de la varianza	Característica		
		Vaneamiento	Granos caracoles	Grano mayor de 17/64 de pulgada
Muestras en árboles	(Vm)	9.52	4.57	65.39
Arboles en parcela	(Va)	55.55	5.83	12.23
Genotipos x Replicaciones	(Vgr)	4.35	1.97	-2.11 (0)
Genotipos	(Vg)	71.87	10.98	50.16
Varianza fenotípica	ΣVi	141.29	23.35	127.78
Heredabilidad	H	0.51	0.47	0.39
Repetibilidad	R	0.85	0.56	0.16

$$H = \frac{Vg}{\Sigma Vi}$$

$$R = \frac{Va}{Va + Vm}$$

Las consideraciones anteriores implican, en la práctica, la reducción de las proporciones de granos defectuosos a niveles comparables a los que presentan las variedades comerciales, lo cual significa una ganancia por selección, con relación a las proporciones iniciales, del 64 % para el "vaneamiento" y de 30 % para los granos caracol. En la Tabla 7 se aprecia claramente el efecto de la selección.

TABLA 7. Proporción de defectos en las semillas determinadas en diferentes generaciones del cruzamiento de Caturra x Híbrido de Timor y en variedades testigo durante varias cosechas, en Chinchiná.

Generación	Material analizado		Semillas vacías %	Granos caracol %
	Progenies No.	Arboles No.		
F1	17	383	19.7	17.6
F2 sin selección en F1	10	159	18.2	14.8
F3 sin selección en F2	16	288	17.2	14.9
F3 con selección en F2	11	205	6.2	10.5
Variedades testigo	4	54	4.6	8.5

Otra característica de interés es el tamaño de las semillas. Su variabilidad está influida considerablemente por factores ambientales que se reflejan en diferencias entre "muestreros", como se aprecia en la Tabla 6. En este caso los coeficientes H y R fueron menores que para los dos defectos de grano y por tanto, se espera menor ganancia por selección.

Resistencia a la roya

Las pruebas efectuadas por el CIFIC de Portugal en plantas de varias generaciones de cruzamientos de la variedad Caturra por el Híbrido de Timor, desarrolladas en Colombia, demuestran una amplia variación en resistencia. En ellas se han detectado seis fenotipos o grupos fisiológicos (A, R, 1, 2, 3 y E), al inocular nueve razas patogénicas a estos materiales. Los cinco primeros grupos son resistentes a las razas descubiertas hasta el momento en América, mientras que el grupo E, al cual pertenecen todas las variedades de *C. arabica* cultivadas en el continente, es atacado por todas ellas y por tanto se considera como un grupo "susceptible". La proporción de plantas del grupo E en generaciones F2, F3 y RC1F1, sugiere la presencia de tres o cuatro factores de resistencia, cuyas combinaciones forman una amplia gama de genotipos.

Pruebas efectuadas en la descendencia de 257 progenitores F3 (Ver Tabla 8), indican que solamente una proporción muy baja de ellos (1, 2 %) es "susceptible". Al contrario, en el 77,4 % de los progenitores toda su descendencia es resistente, mientras que el 21,4 % segrega descendientes resistentes y susceptibles. En conjunto sola -

TABLA 8. Segregación para la resistencia a *H. vastatrix* en plantas F3 del cruzamiento de Caturra x Híbrido de Timor y en su progenie F4, según pruebas efectuadas en el CIFC en materiales producidos en Colombia.

Clase	Plantas F3		Plántulas analizadas	Progenie F4		Susceptibles	
	No.	%		No. plántulas	%	No. plántulas	%
Resistentes no segregantes	199	77.4	9767	100	0	0	0
Segregantes	55	21.4	2851	2377	83.4	474	16.6
Homocigóticas susceptibles (SH5SH5)	3	1.2	381	0	0	381	100
Suma	257	100	12999	12144		855	
%			100	93.4		6.6	

mente el 6.6 % de la población F4 es susceptible, lo cual reduciría la necesidad de control químico en el campo. No obstante, la proporción de plantas del grupo E puede disminuirse a niveles insignificantes si se eliminan los progenitores homocigóticos susceptibles y los heterocigóticos.

En resumen, las generaciones F3 y F4 presentan una mezcla muy variada de diferentes genotipos de resistencia, provenientes de la recombinación de los genes que la controlan, entre los cuales el genotipo "susceptible" puede reducirse por selección a proporciones insignificantes.

CONCLUSION

Al estudiar las progenies F3 de cruzamientos de la variedad Caturra por el Híbrido de Timor, se destaca su amplia variabilidad en los aspectos más importantes que se contemplan en la selección : productividad, adaptación, tamaño de la semilla, defectos del grano y resistencia a la roya.

La productividad es tan alta como la observada en la variedad Caturra y presenta una amplia variación genética que hace muy probable un mejoramiento significativo en futuras generaciones. Existen también materiales con adaptación general a diversos ambientes, que parecen preferibles a los de buen comportamiento en ambientes restringidos. En cuanto a los defectos del grano, se ha demostrado que es posible reducirlos rápidamente por selección a niveles similares a los de los cultivares comerciales.

La resistencia a la roya es un aspecto de interés primordial. Dentro de las progenies se presentan numerosos genotipos, originados por la recombinación de los genes que controlan la resistencia. Estos genotipos forman una población muy diversa de la cual es posible eliminar, o reducir a proporciones insignificantes, las plantas susceptibles a las razas encontradas hasta el momento en América y que atacarían los cultivares predominantes en Colombia, que son Típica, Borbón y Caturra.

Con los materiales seleccionados se formará un cultivar compuesto, con alto nivel de producción y buenas características agronómicas, pero con amplia variabilidad por resistencia a la roya. Con ésto se pretende dar un empleo adecuado a la resistencia vertical encontrada en el Híbrido de Timor, acorde con la naturaleza del complejo café-roya y con las características de la caficultura nacional. Ese cultivar se denominará variedad "Colombia" y sus constituyentes se encuentran en etapa de multiplicación.

Agradecimientos: Los autores expresan sus agradecimientos a Lucelly Orozco G., Asistente de la Sección de Biometría, por su colaboración en los análisis estadísticos.

BIBLIOGRAFIA

1. ALLARD, R.W. 1967. Principios de la mejora genética de las plantas Ed. Omega, Barcelona 498 pp.
2. ALLARD, R.W. 1961. Relationship between genetic diversity and consistency of performance in different environments. *Crop. Sci.* 1(2):127-133
3. BETTENCOURT, A.J. 1974. Consideracoes gerais sobre o Híbrido de Timor. Brasil, Inst Agr. de Campinas. Cir. No. 23. 20 p.
4. BINGHAM, R.T., HOFF, R.J. and McDONALD, G.I. 1971. Disease resistance in forest trees. *Annual Review of Phytopathology* 9:433-452.
5. BROWNING, J.A. 1974. Diversity - the only assurance against genetic vulnerability to disease in major crops. *In* Central States Forest Tree Improvement Conference, 9^a october 10, 1974. Ames, Iowa. State University, 23 p.
6. BROWNING, J.A. and FREY, K.J. 1969. Multiline cultivars as a means of disease control. *Annual Review of Phytopathology* 7:355-382.
7. CARVALHO, A. and MONACO, L.C. 1969. The breeding of arabica coffee. *In* Ferwerda, F.P. and Wit, F., eds. *Outlines of perennial crop breeding in the tropics.* Wageningen, H. Veenman & Zonen. pp. 198-216 (Miscellaneous papers no. 4).
8. CASTILLO, Z.J., MORENO, R.G. y LOPEZ, D.S. 1976. Uso de resistencia genética a *H. vastatrix* existente en germoplasma de café de Colombia. *Cenicafé* 27(1):3-25.
9. CHEVALIER, A. 1947. Les caféiers du globe. III. Systématique des caféiers et faux-caféiers maladies et insectes nuisibles. Paris, Paul Lechevalier. 356 p. (Encyclopedie biologique no. 28).
10. CENTRO de Investigacao das Ferrugens do Cafeeiro, Oeiras. 1965. Progress report 1960-1965. Portugal. 144 p.
11. FREEMAN, G.H. 1973. Statistical methods for the analysis of genotype environment interactions. *Heredity* 31:339-354.
12. GENETIC vulnerability of major crops. 1972. Washington, National Academy or Sciences. 307 p.
13. GONCALVES, M.M. e RODRIGUEZ, M. 1976. Estudos sobre o café do Timor. II. Nota sobre as possibilidades de producao do "Híbrido de Timor" no seu habitat natural M.E.A.U. Comunicacoes No. 86 pp.31-72.
14. KRUG, C.A., MENDES, J.E.T. & CARVALHO, A. 1949. Taxonomia de *Coffea arabica* L. II. *Coffea arabica* L. var. caturra e sua forma *Xanthocarpa*. *Bragantia* (9-12):157-163

15. MONACO, L.C. 1977. Consequences of the introduction of coffee rust into Brazil. *Annals of the New York Academy of Sciences* 287:57-71.
16. MORENO, G.R. 1977. Variabilidad de semillas anormales de café en una población F2 de Caturra x Híbrido de Timor. *Cenicafé* 28(2):39-50.
17. NELSON, R.R. 1972. Stabilizing racial populations of plant pathogens by use of resistance genes. *Journal of Environmental Quality* 1(3):220-227.
18. PLANK, J.E. Van Der. 1968. Disease resistance in plants. New York, Academic Press, 206 p.
19. ROBINSON, R.A. 1971. Vertical resistance. *Review of Plant Pathology* 50(5):233-239.
20. ROBINSON, R.A. 1973. The search and need for horizontal resistance to coffee rust and prospects for similar resistance to CBD in Ethiopia. In Reunión de Consulta de Expertos sobre Prevención de la Roya del Cafeto, Turrialba, Costa Rica, 27-29 noviembre, 1973. Turrialba, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. pp. 25-35
21. RODRIGUEZ, C.J., BETTENCOURT, A.J. and RIJO, L. 1975. Races of the pathogen and resistance of coffee rust. *Ann. Rev. of Phy.* pp. 45-70.
22. SHUKLA, G.K. 1972. Some statistical aspects of partitioning genotype-environmental components of variability. *Heredity* 29:237-245.
23. VENCOVSKY, R. 1969. Genética quantitativa. In Kerr, W.E., comp. Melhoramento e genética. Sao Paulo, Edicoes Melhoramentos. pp.17-38
24. WELLMAN, F.L. 1961. Coffee ; botany, cultivation and utilization. London, Leonard Hill, 488 p.

EXPRESIÓN DE RESISTENCIA HORIZONTAL A LA ROYA (*HEMILEIA VASTATRIX* BERK. Y BR.) EN *COFFEA CANEPHORA* VARIEDAD CONILÓN

G. CADENA-GÓMEZ

Jefe de la Sección de Fitopatología del Centro Nacional de Investigaciones de Café, CENICAFÉ,
Chinchiná, Caldas, Colombia

P. BURITICÁ-CÉSPEDES

Coordinador nacional del Programa de Fitopatología del Instituto Colombiano Agropecuario ICA,
Tibaitatá, Bogotá, Colombia

Con el fin de identificar la forma de expresión de la resistencia a *Hemileia vastatrix* en la variedad Conilón, durante 1977 se realizaron observaciones bajo condiciones de campo y experimentos en el laboratorio y en el invernadero del Instituto Agronómico de Campinas, S.P., Brasil (5).

I - MATERIALES Y METODOS

1.1 Observaciones de campo

Se seleccionaron 16 plantas de la variedad Conilón y 5 de *C. arabica* var. Mundo Novo. En cada planta se seleccionaron 4 ramas localizadas en el tercio medio. Mensualmente se llevaron registros sobre cada una de las hojas presentes en las 4 ramas por planta para : número de lesiones por roya, número de pústulas, daño por el minador de las hojas, número de hojas nuevas y número de hojas caídas.

Con estos datos se elaboraron tablas mensuales sobre índice de infección por roya expresado por el número de pústulas, número de hojas con pústulas y número promedio de pústulas por hoja. También sobre porcentaje de defoliación por planta y por variedad y sobre las causas de la defoliación. Con estos datos y los correspondientes a las variables climáticas se realizaron los análisis estadísticos para evaluar el efecto de los factores ambientales sobre el proceso epidemiológico y determinar la contribución varietal sobre el índice de infección por roya y la defoliación.

1.2 En el invernadero

Bajo condiciones de invernadero se inocularon plantas de la var. Conilón y como testigo plantas de la var. Mundo Novo. Se desarrolló una metodología de inoculación cuantitativa para obtener el número de lesiones por centímetro cuadrado de área fo-

liar, determinar el período de incubación de H. vastatrix y conocer el número de uredosporas producidas por pústula. Como inóculo se emplearon uredosporas colectadas en el campo. Se utilizaron plantas obtenidas a partir de semillas y por enraizamiento de estacas de la variedad Conilón.

1.3 En el laboratorio

Se emplearon discos de hojas de la variedad Conilón y como testigo discos de hojas de la variedad Mundo Novo. Los discos se conservaron dentro de cajas de plástico y colocados sobre espuma de caucho humedecida. Cada disco se inoculó individualmente con una suspensión de uredosporas de H. vastatrix en la concentración de 0.5 mg/ml de agua. En los discos se determinó el número de lesiones, el período de incubación y el índice de esporulación expresado por la producción de uredosporas por disco.

II - RESULTADOS

2.1 Observaciones de campo

Los resultados obtenidos permitieron determinar la existencia de diferencias cuantitativas entre las 16 plantas de la variedad Conilón y las 5 de Mundo Novo utilizadas como testigo. Estas diferencias se expresan por un menor índice de infección por roya y un menor porcentaje de defoliación como consecuencia de la menor severidad de la enfermedad en la variedad Conilón. El promedio de pústulas en las plantas de la variedad Conilón fue de 3.5 mientras que en las plantas de la variedad Mundo Novo fue de 39.9. El número promedio de hojas con pústulas para Conilón fue de 1.5 y para Mundo Novo fue de 9.4. En relación con el número promedio de pústulas por hoja en las plantas de Conilón fue de 0.9 mientras que en las de Mundo Novo fue de 2.7 (Tabla 1). La variación mensual del índice de infección para las dos variedades y el porcentaje mensual de infección se presentan en la Tabla 2. Respecto al porcentaje mensual de infección en las plantas de Mundo Novo se registró un máximo de 45.5 % en el mes de junio, mientras que en las plantas de Conilón el máximo registrado fue de apenas 4.6 % para el mes de mayo, o sea diez veces menor. En las plantas de Conilón la roya fue la causa de la caída de 51 hojas que equivalían al 6.7 % del follaje inicial en las ramas seleccionadas, mientras que en las plantas de Mundo Novo la roya causó la caída de 224 hojas o el 71.8 % del follaje inicial, igualmente en las ramas seleccionadas al iniciarse las observaciones. En la Figura 1, se presenta gráficamente la relación entre el índice de infección por roya y la defoliación registrada mensualmente en las dos variedades.

En relación con el estudio de la influencia de las variables climáticas y la condición varietal sobre el índice de infección por roya y la defoliación por roya, se encontraron coeficientes de correlación altamente significativos, siendo la variedad el factor principal que determinó el comportamiento de la enfermedad bajo las condiciones estudiadas (Tabla 3).

2.2 En el invernadero

En el experimento con plantas de Conilón obtenidas a partir de semillas se registró

TABLA 1. Índice de infección por roya del café (*Hemileia vastatrix*) para las plantas de las variedades Conilón y Mundo Novo. Promedio de nueve meses de observaciones para las hojas presentes en las 4 ramas marcadas.

Planta No.	Calificación 1 - 6	Lesiones de roya		Hojas con Pústulas No.	Pústulas por hoja No.
		No.	Pústulas*		
66 - 1	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0
69 - 5	1.0	4.8	0.0	0.0	0.0
69 - 14	1.0	2.1	0.0	0.0	0.0
68 - 11	2.0	0.2	0.0	0.0	0.0
66 - 3	2.0	10.9	0.0	0.0	0.0
69 - 7	2.0	24.8	0.0	0.0	0.0
70 - 11	2.0	19.9	0.2	0.2	0.2
66 - 4	2.5	15.9	2.6	1.4	0.9
68 - 4	3.0	20.3	2.6	1.2	2.0
68 - 7	3.0	11.3	2.4	1.4	1.1
67 - 5	3.5	8.9	3.3	2.4	1.2
66 - 9	4.0	31.9	1.1	0.8	0.9
69 - 2	4.0	50.6	3.9	1.7	2.0
69 - 9	4.0	61.6	20.3	7.9	2.4
69 - 10	4.0	107.4	18.7	5.8	3.1
68 - 15	5.0	196.4	1.3	1.1	0.9
Promedio		35.4	3.5	1.5	0.9
MN - 1	6.0	25.7	19.0	5.7	1.5
MN - 2	6.0	48.7	37.0	9.0	2.3
MN - 3	6.0	64.1	55.8	9.7	3.5
MN - 4	6.0	37.1	27.6	8.2	2.9
MN - 5	6.0	80.4	60.0	14.3	3.3
Promedio		51.2	39.9	9.4	2.7

* Lesiones de roya en estado de esporulación.

TABLA 2. Índice de infección mensual por roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*) para las 16 plantas de la variedad Conilón (C) y 5 de la variedad Mundo Novo (MN). Lecturas en las cuatro ramas marcadas por planta.

Mes	Nº Lesiones por roya		Nº Pústulas		Nº Hojas con pústulas		Nº Pústulas/Hoja		% de infección mensual*	
	Variedad									
	C	MN	C	MN	C	MN	C	MN	C	MN
Abril	266	354	85	271	34	87	1.0	3.0	4.5	27.9
Mayo	420	654	102	516	33	88	1.2	6.2	4.6	31.7
Junio	734	694	81	502	29	95	1.2	4.9	4.2	45.2
Julio	721	338	75	326	30	76	1.4	4.0	4.5	45.5
Agosto	686	143	58	124	28	44	1.2	2.4	4.4	34.4
Septiembre	693	42	31	24	20	11	1.0	1.3	3.3	13.6
Octubre	554	29	14	11	12	10	0.3	0.8	2.0	16.9
Noviembre	519	25	20	9	13	6	0.3	0.9	2.4	14.0
Diciembre	510	25	37	9	18	6	0.7	0.9	3.4	22.2

$$* \% \text{ de infección mensual} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de hojas con pústulas}}{\text{N}^{\circ} \text{ de hojas presentes}} \times 100$$

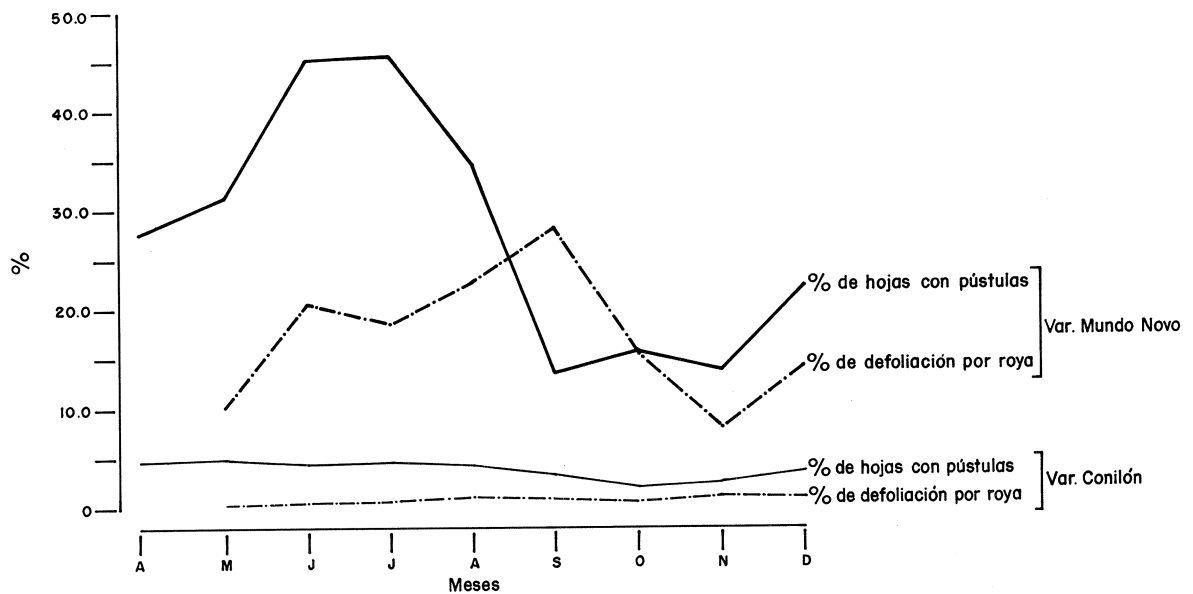


FIGURA 1. Relación entre el índice de infección por *Hemileia vastatrix* y defoliación, en las plantas de las variedades Mundo Novo y Conilón.

TABLA 3.- COEFICIENTES DE CORRELACION ENTRE LAS VARIABLES ESTUDIADAS Y LOS ELEMENTOS CLIMATOLÓGICOS REGISTRADOS DURANTE EL PERIODO DE LAS OBSERVACIONES.

	Lesiones		Defoliación			Temperatura				Humedad			
	Variedad	por roya	Pústulas	Hojas con pústulas	Por roya	Por minador	Natural	Media	Máxima	Mínima	Precipitación	Luminosidad	relativa
Variedad	0.11		0.51**	0.57**	0.63**	-0.08	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Lesiones por roya	0.11		0.56**	0.51**	0.27**	-0.08	-0.09	-0.21**	-0.17**	-0.21**	-0.17**	0.07	-0.04
Pústulas	0.51**	0.56**		0.89**	0.56**	-0.10	0.00	-0.32**	-0.32**	-0.28**	-0.22**	0.12	0.03
Hojas con pústulas	0.57**	0.51**	0.89**		0.57**	-0.12	-0.05	-0.30**	-0.29**	-0.26**	-0.22**	0.14*	0.02
Defoliación por roya	0.63**	0.27**	0.56**	0.57**		-0.03	0.06	-0.19**	-0.09	-0.23**	-0.18	0.12	-0.17**
Defoliación por minador	-0.08	-0.08	-0.10	-0.12	-0.03		0.18**	0.15*	0.10	0.17**	0.29**	-0.23**	0.09
Defoliación natural	0.05	-0.09	0.00	-0.05	0.06	0.18**		-0.13	-0.13	-0.09	-0.08	-0.07	0.05
Temperatura media	0.00	-0.21**	-0.32**	-0.30**	-0.19**	0.15*	-0.13		0.85**	0.92**	0.57**	0.38**	-0.08**
Temperatura máxima	0.00	-0.17**	-0.32**	-0.29**	-0.09	0.10	-0.13	0.85**		0.60**	0.25**	0.03	-0.41**
Temperatura mínima	0.00	-0.21**	-0.28**	-0.26**	-0.23**	0.17**	-0.09	0.92**	0.60**		0.73**	-0.67**	0.45**
Precipitación	0.00	-0.17**	-0.22**	-0.22**	-0.18**	0.29**	-0.08	0.57**	0.25**	0.73**		-0.73**	0.54**
Luminosidad	0.00	0.07	0.12	0.14*	0.12	-0.23**	0.07	-0.38**	0.03	-0.67**	-0.73**		-0.80**
Humedad relativa	0.00	-0.04	0.03	0.02	-0.17**	0.09	0.05	-0.08	-0.41**	0.45**	0.54**	-0.80**	

* Significativo al 50/o.

** Significativo al 10/o.

una alta variabilidad a la reacción entre plantas pertenecientes a la misma progenie. Dicha variabilidad se presentó en todos los parámetros estudiados. En algunas plantas de Conilón se registraron períodos de incubación del hongo similares a los obtenidos en las plantas testigo (Mundo Novo) pero también se registraron períodos de incubación más prolongados (87 días). Respecto a la esporulación, en general en las plantas de Conilón siempre fue menor a la registrada en las plantas de Mundo Novo que fue de 5.8×10^4 uredosporas por pústula.

En los experimentos con plantas obtenidas por enraizamiento de estacas, los resultados fueron más homogéneos y similares al comportamiento individual de las plantas originales en el campo.

Aunque los valores de los coeficientes de correlación entre las variables medidas en los dos experimentos con plantas obtenidas por enraizamiento de estacas no fueron iguales, se encontró que fueron altamente significativos para porcentaje de pústulas y período de incubación ($r = 0.54$ y $r = 0.81$), entre esporas por pústula y lesiones por cm^2 de área foliar ($r = 0.79$ y $r = 0.63$).

2.3 En el laboratorio

Se encontró que las variables índice de esporulación expresado por el porcentaje de discos con pústulas y el período de incubación (tiempo desde la inoculación hasta que el 50 % de los discos presentaron pústulas) fueron los que mejor se correlacionaron entre sí en los dos experimentos ($r = -0.58^{**}$ y $r = -0.64^{**}$) y con la reacción de las plantas originarias de los discos, bajo condiciones de campo, correspondiendo un menor porcentaje de discos con pústulas para las plantas con períodos de incubación más prolongados.

III - DISCUSION

Bajo condiciones de campo, fue posible determinar que existen diferencias de comportamiento entre las dos variedades comparadas en lo que respecta al índice de infección por roya. Mientras que en las plantas de Conilón el número de pústulas se mantuvo durante las observaciones en niveles bajos, en las de Mundo Novo, este parámetro mostró características explosivas especialmente en los meses de mayo y junio. Anteriormente (9,14) se había señalado este tipo de comportamiento y según Moreno (17) entre las plantas de Conilón se encuentran árboles con diferentes intensidades de ataque desde unos con hojas con pústulas pequeñas y pocas uredosporas hasta otros con lesiones grandes. Exactamente ese comportamiento se comprobó en el presente trabajo. Dentro de la población de Conilón estudiada, se encontraron árboles sin lesiones de roya, otros con lesiones que no esporularon o que esporulaban muy poco y también árboles con un número de lesiones y de producción de esporas relativamente alto.

Dentro de la especie C. canephora simultáneamente con tipos totalmente resistentes se encuentran otros totalmente susceptibles (grupo F) o sin genes de resistencia vertical (2). La variedad Conilón está clasificada en el grupo F y por lo tanto es susceptible a todas las razas de H. vastatrix (20). Por su parte, la variedad Mundo Novo pertenece al grupo fisiológico E y por lo tanto es susceptible a las razas de H.

vastatrix identificadas en el Brasil por no poseer genes específicos de resistencia a ellas. Desde ese punto de vista las dos variedades son igualmente susceptibles a las razas prevalentes en el Brasil, sin embargo, su comportamiento respecto a la severidad de la enfermedad difiere ampliamente, como se demostró en este estudio. Mientras las plantas de Mundo Novo presentan un alto índice de infección, las de Conilón presentan una baja incidencia de la enfermedad. No existiendo diferencias entre las dos variedades desde el punto de vista de la resistencia vertical, las diferencias observadas respecto a la severidad de la roya deben atribuirse a la existencia en la variedad Conilón de genes diferentes a los que confieren RV que favorezcan el menor índice de infección por roya en esa variedad.

De acuerdo con Van der Plank (26) el criterio de la RV es el tipo de lesión mientras que la RH afecta el tipo y el número de lesiones. El tipo de lesión reflejado en la abundancia de la esporulación. Aunque en las plantas en las cuales se hicieron las observaciones de campo no se determinó el índice de esporulación, los datos sobre el número de pústulas son bastante significativos. La diferencia con las plantas de la variedad Mundo Novo representa una menor esporulación y esto seguramente influye también sobre la evolución epidémica de la enfermedad en las dos variedades. Mientras en las plantas de Conilón el número de pústulas se mantuvo muy estable, en Mundo Novo fluctuó considerablemente de acuerdo con los factores ambientales principalmente. De acuerdo con Alfonso, Ortolani y Figueiredo (1) durante el mes de febrero de 1977 las elevadas temperaturas registradas produjeron un efecto depresivo sobre el desarrollo de la enfermedad pero durante los meses de abril a julio las condiciones térmicas favorecieron al hongo. Los resultados obtenidos en este trabajo, coinciden con los registrados por dichos autores y comprueban la relación existente entre la temperatura ambiental y los niveles de infección. Los análisis de correlación efectuados entre las variables climáticas y las biológicas mostraron que el número de pústulas y el número de hojas con pústulas están no solamente correlacionadas entre sí sino que además dependen particularmente de la variedad, de la temperatura y la precipitación.

De otra parte, el factor que más diferencia a las dos variedades es la defoliación sufrida como consecuencia del ataque de la roya. De acuerdo con Rayner (21) el principal daño causado por la roya del cafeto es debido a la defoliación prematura que causa, lo cual trae como consecuencia un debilitamiento de la planta y reducción en la producción. En este estudio se comprobó que la roya fue la causa principal de la defoliación sufrida por las plantas de Mundo Novo pero no en las plantas de Conilón. Según el análisis de correlación, la defoliación por roya está significativamente correlacionada con la variedad, el número de pústulas y el número de hojas con pústulas. Dichos análisis y los posteriores análisis de regresión permiten concluir que la condición varietal de las plantas estudiadas determinó que éstas sufrieran una mayor o menor defoliación por roya.

Anteriormente se había encontrado correlación entre el nivel de roya y el porcentaje de caída de hojas y entre el número de pústulas por hoja y la caída de las mismas (11). En este trabajo se encontraron coeficientes de correlación similares entre la defoliación por roya y el número de pústulas y el número de pústulas por hoja. Sin embargo el factor más significativamente correlacionado con la defoliación por roya, fue la variedad.

La retención de follaje, según Monaco (15) puede ser una forma de reducir los efectos negativos del ataque de la roya del cafeto. Esta mayor retención del follaje es una característica bien definida en la variedad Conilón.

Según Van der Plank (25) la resistencia en el campo es resistencia horizontal, si se

toman medidas para excluir la resistencia vertical, tales como la de exponer variedades sin genes de resistencia vertical a epidemias naturales en el campo.

Este es el caso de la variedad Conilón que no posee genes de resistencia vertical a *H. vastatrix* y que bajo condiciones de epidemia natural en el campo presenta índices de infección por roya sumamente bajos y una escasa defoliación por roya, al compararla con plantas de la variedad Mundo Novo bajo las mismas condiciones ambientales.

Bajo condiciones de invernadero, la metodología empleada en el estudio facilitó las lecturas en cuanto se refiere al número de lesiones por área foliar, el período de incubación y el índice de esporulación, debido a su carácter cuantitativo.

En los ensayos con plantas obtenidas por enraizamiento de estacas los resultados fueron más homogéneos debidos al mismo origen de las plantas y a la naturaleza genética de la variedad Conilón. Anteriormente (23) bajo invernadero se había encontrado que había diferencias en el número de lesiones por área foliar al comparar el comportamiento de plantas de la variedad Conilón con Ibaare, Mundo Novo y Catuaí y consideraron que esa diferencia se debía a una mayor resistencia a la penetración y desarrollo del hongo existente en las plantas de Conilón. Estos resultados coinciden con los obtenidos en este estudio en los cuales se encontraron diferencias altamente significativas entre las plantas de Mundo Novo y las de Conilón calificadas como resistentes en el campo.

Una de las formas de expresión de la RH consiste en que el número de lesiones formadas en una variedad con RH es menor que en una variedad susceptible bajo las mismas condiciones e inoculadas con el mismo número de esporas.

Johnson y Taylor (13) afirman que la medición de la producción de esporas de un patógeno proporciona un método refinado de medir la patogenicidad de éste y la resistencia del hospedante. Esta medida corresponde a la suma de los efectos de todos los mecanismos de resistencia en el hospedante. En los tres ensayos en el invernadero se midió el índice de esporulación por planta, expresado como la cantidad de uredosporas producida por pústula. En números absolutos la esporulación en Mundo Novo siempre fue mayor que la obtenida en las plantas de Conilón. A nivel estadístico en los tres ensayos se presentaron diferencias altamente significativas que permitieron diferenciar las distintas plantas incluidas en los ensayos. Las plantas de Conilón clasificadas como resistentes en el campo, presentaron en el invernadero la menor esporulación y se diferenciaron significativamente de las plantas de Mundo Novo y de las de Conilón consideradas susceptibles.

La importancia del período de incubación (PI) en el desarrollo de una enfermedad puede variar de acuerdo con la naturaleza del hospedante y del patógeno. Van der Plank (27) considera que el tiempo no es importante en enfermedades endémicas. Si aceptamos que la roya del cafeto es una enfermedad endémica dado que la disponibilidad de tejido hospedante es constante así como la presencia del patógeno, así sea en bajas proporciones o en las plantas que crecen espontáneamente en los cafetales, se podría considerar que una diferencia de pocos días en el PI del hongo entre dos variedades no sería de gran utilidad para reducir la epidemia si no está acompañado además de una baja tasa de esporulación. En los tres ensayos realizados en el invernadero, se encontraron variaciones en los PI de las diferentes plantas probadas. Con excepción del primer ensayo realizado con plantas obtenidas a partir de semillas y durante los meses de mayo a agosto en los cuales predominan las temperaturas más bajas, se presentaron períodos de incubación prolongados y poca esporulación. En el segundo y tercer ensayos realizados con plantas propagadas vegetativamente y durante

el último trimestre del año con temperaturas más altas, las plantas con poca esporulación presentaron períodos de incubación más cortos que las plantas con abundante esporulación.

El PI de H. vastatrix tiene la tendencia a acortarse en los meses más calientes y se vuelve más largo en los meses más fríos (16) lo cual coincide con los resultados obtenidos en los ensayos de invernadero.

En los ensayos realizados con discos de hojas también se midió el índice de esporulación para lo cual la metodología empleada se mostró bastante eficiente. En el primer ensayo se incluyeron plantas de Conilón de todos los tipos de reacción, desde aquellas que en el campo se comportaban como resistentes hasta susceptibles. De los distintos parámetros estudiados el índice de esporulación y el período de incubación fueron los que mejor se correlacionaron con la reacción de las plantas en el campo.

Guzmán (12) registra que en ensayos de laboratorio con discos de hojas de papa de variedades consideradas como resistentes en el campo, el hongo esporulaba menos y demoraba más tiempo en iniciar la esporulación que en los discos de variedades susceptibles en el campo.

Anteriormente se encontró que discos de hojas de la variedad de café Icatú inoculados en el laboratorio con esporas de H. vastatrix presentaban una tasa de infección relacionada con el nivel de resistencia en el campo (10).

En los ensayos en los cuales se emplearon discos de hojas provenientes de plantas resistentes en el campo, su comportamiento fue igual ya que no se presentaron lesiones de roya. De otra parte, la esporulación de H. vastatrix en discos de hojas de Conilón siempre fue inferior a la obtenida en los discos de Mundo Novo. Resultados similares habían sido obtenidos antes utilizando la misma metodología (5). Los análisis de correlación mostraron que el período de incubación y el índice de esporulación están altamente correlacionados en forma negativa, es decir, que a un mayor período de incubación corresponde un menor índice de esporulación.

Se observó una falta de consistencia en los resultados obtenidos en los dos ensayos de laboratorio que se puede atribuir a la variabilidad de las condiciones ambientales así como también a los trastornos fisiológicos que posiblemente sufre el tejido foliar durante el proceso de la obtención de los discos y posterior mantenimiento dentro de las cajas. También es importante anotar que la cantidad de inóculo aplicado por disco puede ser excesiva y por esta razón los resultados pueden ser diferentes a la reacción de esas plantas bajo condiciones de campo donde el inóculo que se recibe por unidad de superficie foliar debe ser inferior.

El conjunto de los experimentos realizados bajo condiciones de campo, invernadero y laboratorio permitieron determinar la existencia de resistencia de tipo horizontal a la roya en el cultivar Conilón de Coffea canephora, el cual sometido a epidemias naturales o a inoculaciones artificiales mostró una menor severidad de la enfermedad expresada por un bajo índice de infección, mayor retención de follaje, períodos de incubación prolongados y bajo índice de esporulación. Estos parámetros son los que distintos autores han señalado como característicos de las variedades con resistencia horizontal a diferentes patógenos (2, 3, 4, 7, 8, 13, 15, 18, 19, 22, 23, 24, 28).

BIBLIOGRAFIA

1. ALFONSI, R.R. ; ORTOLANI, A.A. e FIGUEIREDO, P. Condições climáticas e níveis de infecção da ferrugem do cafeeiro em C. arabica L. In Congresso brasileiro de pesquisas cafeeiras 5^a, Guarapari, Brasil, 1979. Resumos. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro do Café, 1977. pp. 108-109.
2. BETTENCOURT, A.J. Avaliação da resistência a Hemileia vastatrix no melhoramento genético de Coffea arabica. In Congresso brasileiro de pesquisas cafeeiras, 4^a, Caxambu, Brasil, 1976. Resumos. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro do Café, 1976. pp. 274-276.
3. BINGHAM, R.T. ; HOFF, R.J. and McDONALD, G.I. Disease resistance in forest trees. *Ann. Rev. Phytopathol.* 9:433-452. 1971.
4. BROWNING, J.A. and FREY, K.J. Multiline cultivars as a means of disease control. *Ann. Rev. Phytopathol.* 7:355-382. 1969.
5. CADENA, G.G. Expresión de resistencia horizontal a la roya (Hemileia vastatrix) en la variedad Conilón (Coffea canephora). Bogotá, Universidad Nacional-Instituto Colombiano Agropecuario, 1978. 185 p. (Tesis Magister Scientiae).
6. CADENA, G.G. e ESKEs, A.B. Interação entre alguns cafeeiros e seus isolados de Hemileia vastatrix avaliada em discos de folhas. In Congresso brasileiro de pesquisas cafeeiras, 5^a, Guarapari, Brasil, 1977. Resumos. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro do Café, 1977. pp. 82-83.
7. CARVALHO, A. e MONACO, L.C. Melhoramento do cafeeiro visando a resistência á ferrugem alaranjada. *Ciencia e Cultura (Brasil)* 23(2):141-146. 1971.
8. CASTILLO, Z.J. ; MORENO, R.G. y LOPEZ, D.S. Uso de resistencia genética a Hemileia vastatrix Berk y Br. existente en germoplasma de café en Colombia. *Cenicafé (Colombia)* 27(1):3-25. 1976.
9. CENTRO DO COMERCIO DO CAFE DE VITORIA. Estudo sobre o café Conilón. In Congresso nacional do café 3^a, Pocos de Caldas, Brasil. 1970. *Anais*. s.l. 1970. pp.263-269.
10. COSTA, W.M. e ESKEs, A.B. Resultados preliminares de métodos de avaliação do nível de resistencia a Hemileia vastatrix. In Congresso brasileiro de pesquisas cafeeiras, 4^a, Caxambú, Brasil, 1976. Resumos. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro do Café, 1976. p. 47.
11. CHALFOUN, S.M. ; PAIVA, F. e RIBEIRO, S.R. Influência do nível de infecção e do número de pústulas na queda de folhas de cafeeiros atacados pe la ferrugem (Hemileia vastatrix, Berk et Br.). In Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Projeto Café ; relatório anual 74/75. Belo Horizonte. 1976. pp. 237-238.
12. GUZMAN, N.J. Naturaleza de la resistencia parcial de ciertos clones de tres especies de papa al Phytophthora infestans (Mont). De by. *Revista*

ICA (Colombia) 5(4):201-228. 1970.

13. JOHNSON, R. and TAYLOR, A.J. Spore yield of pathogens in investigations of the race specificity of host resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.* 14: 97-119. 1976.
14. MANSK, Z. ; ANDRADE, I.P.R. ; MATIELLO, J.B. e ABREU, R.G. Efeito de fungicidas cupricos, sistemicos e organicos no controle da ferrugem do cafeeiro e na producao de café en cafezal "Conilon" (Coffea canephora) no Espirito Santo. In Congresso brasileiro sobre pragas y doencas do cafeeiro, 1ª, Vitoria, Brasil, 1973. Resumos. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro do Café, 1973. pp. 6-7.
15. MONACO, L.C. Consequences of the introduction of coffee rust into Brazil. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 287:57-71. 1977.
16. MORAES, S.A. DE ; SUGIMOR, M.H. ; RIBEIRO, I.J.A. ; ORTOLANI, A.A. e PEDRO JUNIOR, M.J. Periodo de incubacao de Hemileia vastatrix Berk et Br. em tres regioes do Estado de Sao Paulo. *Summa Phytopathologica (Brasil)* 2:32-38. 1975.
17. MORENO, R.G. Informe del viaje de estudios al Brasil sobre el mejoramiento genético del café. Chinchiná, Caldas, Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, Cenicafé. 41 p. 1974 (mecanografiado).
18. NELSON, R.R. Breeding plants for disease resistance. Concepts and applications. University Park, Pa. University Press. 1973. 400 p.
19. PARLEVLIET, J.E. and ZADOKS, J.C. The integrated concept of disease resistance ; a new view including horizontal and vertical resistance in plants. *Euphytica* 26(1):5-21. 1977
20. PAULINO, A.J. ; ANDRADE, I.P.R. ; PAULINI, A.E. e CARRARA, M. Competicao de progenies de "Guarini" e "p 37" de Coffea canephora no Espirito Santo. In Congresso brasileiro de pesquisas cafeeiras 3ª, Curitiba, Brasil, 1975. Resumos. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro do Café, 1975. pp. 178-179.
21. RAYNER, Q.W. Micología, historia y biología de la roya del cafeto. Trad. Ludwig Muller. Turrialba, Costa Rica, IICA, 1972. 68 p. (Publ. Misc. N° 94).
22. ROBINSON, R.A. Horizontal resistance. *Rev. Pl. Path.* 52(8):483-501. 1973.
23. SCALI, M.H. ; CARVALHO, A. e MONACO, L.C. Resistencia horizontal á ferrugem (Hemileia vastatrix) em cultivares de Coffea. In Reuniao Anual da Sociedade Brasileira para o Progreso da Ciencia. 26ª. Sao Paulo, Brasil, 1974. Resumos. Sao Paulo, SBPC., 1974. p. 241.
24. VAN DER PLANK, J.E. Plant diseases : epidemics and control. New York, Academic Press. 1963. 340 p.
25. VAN DER PLANK, J.E. Disease resistance in plants. New York, Academic Press. 1968. 206 p.

26. VAN DER PLANK, J.E. Horizontal resistance : six suggested projects in relation to blast disease of rice. In Seminar on horizontal resistance to the blast of rice. Cali, Colombia, 1971. Proceeding Cali, Colombia, CIAT, 1971. pp. 21-26.
27. VAN DER PLANK. J.E. Principles of plant infection. New York, Academic Press, 1975. 216 p.
28. ZADOKS, J.C. Reflections on disease resistance in annual crops. In U.S. Dept. Agr. Forest. Serv. Biology of rust resistance in forest trees. 1972. pp. 43-63 (Misc. publ. 1221).

COMPARATIVE SURVIVAL OF THE COFFEE-BERRY BORER, *HYPOTHENEMUS (STEPHANODERES) HAMPEI* (FERR) UNDER TWO MACROHABITATS OF *COFFEA CANEPHORA* IN SOUTHERN NIGERIA

O. L. IDOWU,

Cocoa Research Institute of Nigeria,

P.M.B. 5244,

Ibadan, Nigeria

INTRODUCTION:

The coffee berry-borer *Hypothenemus hampei* (Scolytidae) is one of the major pests of coffee in Nigeria (Idowu 1971). A general survey of the incidence of this pest from 1976-1978 showed that it occurred in all the areas of the country where *Coffea canephora* is cultivated for commercial purposes. These areas include Ogun, Oyo, Ondo, Kwara, Bendel, Imo, River and Cross River States.

An estimate of damage caused by this pest ranged from about 5% in May which in the early part of the year to 80% in November which coincided with the peak of harvest. Berry infestation results in reduction in quantity and quality of yield, and these constitute considerable economic loss to farmers. *Hypothenemus hampei* is known to breed profusely and produce about eight generations a year and that breeding could take place both in berries left unharvested or those on the ground. (Hargreaves 1926). However, information are scanty on the relative survival of this pest under the two macrohabitats (the trees and the litter) considered here. Furthermore, previous workers in Brazil, Ceylon, Malaya and Tanzania advocated regular harvesting of coffee berries from trees as soon as they ripen and from the ground in order to prevent continuous breeding of the pest. (Le Pelley 1968).

Although this method has been reported to be effective, it has been found to be very tedious under Nigerian climate and labour market where although two major fruiting seasons occur, flowering and fruiting occur almost throughout the year. Hence some fruits are inevitably left uncollected from the tree because the cost of hiring labour continuously to collect fruits from the trees and from the litter is very high, particularly after the harvest of the minor and major crops.

In view of these reasons, studies on the comparative survival of the pest in the two macrohabitats were carried out with the ultimate aim of exploiting the information to plan strategies for effective and economic control of this pest through pest management approach.

MATERIALS AND METHODS:

From April 1976 to March 1977, regular sampling of coffee trees were carried out at coffee plantations located at four different sites, - Gambari Experimental Station (Oyo State), Ilaro Experimental Plot (Ogun State), Owena C.R.I.N. Substation and Isuada Coffee Plantation (Ondo State). The size of each plot was about one acre, and consists of between 300 and 400 fruiting coffee trees. Once a week, random samples of coffee berries were collected simultaneously from 25 coffee trees and from the litter under those trees. Berries collected from the trees were separated from those collected from the litter for each site. Laboratory analysis for each macrohabitat was carried out within twenty four hours of sampling from both the tree and the litter. Infested berries were separated from healthy ones. Any berry which has the characteristic entrance hole of Hypothenemus hampei was regarded as infested, and the percentage infestation was calculated from the formula $\frac{N1}{N2} \times 100$ where N1 = No of berries infested and N2 = Total number of berries collected.

Five samples, each consisting of 100 berries from the trees and from the litter were taken from the lot of infested berries from each experimental site per sampling date. The berries were then dissected under a binocular microscope and the numbers of different developmental stages (eggs, larvae, pupae, living adults and dead adults) of the coffee berry-borer found inside each berry were recorded from each macrohabitat (i.e. the coffee tree, and the litter).

RESULTS:

i Oviposition: Egg-laying occurred earlier on berries collected from the tree macrohabitat than in those berries collected from the litter and occurred almost all the year round in berries collected from the trees. Thus, eggs were found in this macrohabitats from April 1976 to January 1977, attaining its peak population between October and November. By comparison, berries collected from the litter supported eggs for a shorter period of the year (June to November 1976) and attained its peak a little earlier (October 1976) than on the trees. In the litter eggs were hardly found in berries from January to April Fig. I.

Considering the whole period of sampling, the berries from the litter accounted for about 12% of total eggs while those from the tree accounted for about 88%. This differences was highly significant (P. = 0.001).

ii Larval development: Larval development occurred throughout the sampling period inside berries collected from the trees whereas the period of larval development in the litter was shorter being from April to December. Larvae were not found at all in berries collected from the litter between January and March which again co-incided with immediate post-harvest period. The number of larvae in both macrohabitats built up gradually from April and attained two peaks. The first but less distinct peak occurred in July whereas the second peak which occurred in October (tree) or November (litter) was over twice that of the first. (Fig. II). On the whole, berries from the litter as a source, accounted for about 36.6% of total larvae found in the two macrohabitats whereas berries collected directly from the tree accounted for the balance of about 63.4%. Statistical analysis showed that the difference between larval populations from the two sources was significant (P = 0.001).

iii Pupal Development: Fig. III shows the distribution of pupae in the two macrohabitats from April 1976 to March 1977. Active pupation started from June and attained a single peak in each macrohabitat but a little earlier in the litter (October) than on trees (November). The numbers of pupae were very low being less than 10 per 100 berries from January to September in both macrohabitats and was almost nil from January to April in the litter.

In general, the litter as a source accounted for about 25% of total pupae found while the tree accounted for the balance of about 75%. Again, statistical analysis showed that the difference in pupal populations of the two macrohabitats was significant (P = .001).

iv Adult: Two categories of adults were found inside the berries, the living adults and the dead ones.

(a) Living Adults: These were found in both macrohabitats throughout the year. Populations

of living adults built up gradually from January, remained low until late March and attained peaks at the same period (November) in the litter and on the tree, just before major harvesting was completed. Peak population of living adults was higher on the tree being about three times that of the litter. On the whole, the litter contributed about 30% of total living adults found during the period of investigation. The synchronisation of adult peak population and fruit ripening allowed for maximum fruit infestation and damage before harvesting was completed. Fig. IV.

(b) Dead Adults: Dead adults were also found in the two macrohabitats all the year round. Adult mortality was highest from December to April in berries collected from the trees and from the litter.

During the sampling period, about 31.4% of total adults found in berries collected from the trees were dead whereas the corresponding values for adults from berries collected from the litter was about 36.7%. Considering the overall number of dead adults extracted from the two macrohabitats, litter accounted for 36.3% whereas the tree accounted for about 63.7%.

Discussion: Fig. 1 shows clearly that eggs were hardly found in berries from either the tree or soil macrohabitat from January to March 1977. Various factors such as are listed below could be responsible for this:

(1) Environmental factors such as the very high temperatures and low relative humidity prevalent during this period were probably unsuitable for egg-laying and development. Table 2 shows that mean daily temperatures and relative humidity at the canopy level and at ground level were very similar during this period and could encourage high degree of desiccation of the eggs.

(2) It may be because most of the female adults were undergoing the facultative sort of reproductive diapause, resulting from lack of mature male adults which are required to fertilise the females. Records show that sex ratio during this period was about 1:25 (male : female). Contrary to the normal of 1:9 recorded during the active breeding period (early August - late October).

(3) Also, oviposition might have been limited by lack of coffee berries most suitable for egg-laying during this period. Idowu (1971) found that fresh yellow and red matured fruits were preferred for infestation and oviposition than the fresh green or dry brown berries.

Mature yellow and red berries, the most suitable for infestation and oviposition, were hardly found in the field between January and April, that is the period immediately after major harvest. In Southern Nigeria, Coffee canephora flower and fruit twice a year. The first flowering occurs normally between January and February giving rise to the "major" crop, ready for harvest between October and January. The second flowering occurs from August to September and gives rise to the "minor" crop ready for harvest from May to June of the following year (Oyebade 1976). The gradual build up of egg population between mid-April and June suggests that suitable berries were becoming available from the minor crop during this period. The peaks of oviposition in the two macrohabitats in October coincided with the peak of ripening of fruits from the "major" crop. The availability of suitable fruits therefore determined the intensity of oviposition. Three Hymenopterous parasites, Propos nasuta (Bethylidae) Cephalonomia stephanodeis (Bethylidae) and Neterospilus coffeicola (Braconidae) are known to constitute the major natural enemies of eggs and other developmental stages of the coffee berry-borer. (Hargreaves 1924). P. nasuta and C. stephanoderis in particular, are known to have effected considerable reduction of the coffee berry-borer population in various countries including the Cameroons, Congo, Uganda, Brazil (Hargreaves 1955) and Ivory Coast (Tichler 1961). Hargreaves also recommended that under light infestation, fallen berries should be left because high percentage of them contain P. nasuta. The consistently lower egg population observed in the litter may have been due to greater vulnerability of the eggs and other developmental stages of the berry-borer to these parasites in the litter macrohabitats. However, the activities of parasites and predators could not be monitored during this study due to lack of adequate knowledge about their identities.

As in the case of the eggs, the populations of the larvae in the two macrohabitats were correspondingly low from January to March. This could be attributed to the very low level of egg populations from which those larvae would have been derived. It may also be that the prevailing high temperature and low relative humidity which induced desiccation, coupled with the destructive activities of the parasites and predators adversely affected larval population.

Later in the season, larval population in both macrohabitats built up very rapidly from the onset of the rains in late May and was highest at the peak of fruit ripening in October and November. Although, larval population again was consistently lower in the litter than in the tree during this major breeding period, pupation was at its peak much earlier in the litter than in the tree, suggesting that the litter could be a major source of adults for berry infestation on the tree in November and thereafter. Any measure aimed at controlling the adult stage between September and December should therefore take cognizance of berries on both the trees and in the litter.

The population of living adults also follow similar trends as in the case of various immature stages of the borer, being very low in both macrohabitats after the conclusion of major harvest (January-June). This was probably due to inavailability of berries suitable for infestation and development of the adults. With the ripening of more berries of the minor crop from May to August, adult numbers increased gradually during this period. As more berries mature from the major crop, adult population increased rapidly in the two macrohabitats between September and November, although adult population in the litter remained consistently lower.

The trend of population of dead adults sharply contrasts the trends of population of living adults and other developmental stages being particularly high in both macrohabitats from January to May. This period of high adult mortality coincided with the dry season and post harvest period, and suggests that the very hot and dry conditions prevailing and the scarcity of suitable berries are unfavourable for adult survival. Hymenopterous parasites and predators mentioned earlier may also be most efficient during this period. The similarity between percentage adult mortality in the litter and on the tree suggests that the major mortality factor exerts almost equal pressure in the two macrohabitats.

From the findings above, it is obvious that there is need to work out carefully strategies for effective and economic control of this pest. Control in various coffee growing countries have been based on the combination of the rampaseen - the removal of all berries left after harvest - approach and regular application of insecticides.

Nevertheless, previous workers laid greater emphasis on the rampaseen method and claimed that harvesting berries as soon as they ripe deprive the borer of opportunities of breeding (Do Amaral Castro 1924) and thereby increased yield. (Huston 1926). Corbeth (1933), Jervis (1939), Colric (1958), Le Pelley (1968) emphasised the value of the rampaseen method to control and advised that it should be practiced in all cases other than in exceptional ones where at anytime the insect can be shown to be under effective biological control. However, in Nigeria it was obvious during the survey period that the rampaseen approach was unacceptable to farmers for the following reasons.

1. It is very tedious. This is because ripen fruits appear almost throughout the year as a result of sporadic flowering of *C. canephora* in response to onset of early and late rains, and subsequent fruiting of trees. In essence, lack of uniformity of flowering and fruiting among trees do not favour efficient harvesting. Fruits which ripen at odd times of the season are unavoidably neglected.

2. In competitive market such as Nigeria, the cost of hiring labour per day to do routine harvesting almost all the year round is very high and uneconomic. Hence farmers reluctance to adopt the rampaseen method.

In view of the above and the fact that various mortality factors seem to keep the population in check for almost half of the year (December-May) particularly in the litter macrohabitat, it is here being proposed that the rampaseen method may not be necessary during this period. Cultural and chemical control of the first generation of borers attacking the light crop may also be limited to the trees. This would not only save the cost

of labour and insecticide but also protect the population of natural enemies in berries which have dropped to the ground. Later in the season, these reserve of natural enemies would help in keeping the subsequent generation of the borer under control.

An intensive control measure is however essential during the period June to November, when fruits of the major crop mature and get ripen. This should be a combination of the rampaseen method with chemical control. Currently in Nigeria, preliminary trials are on to test the effectiveness of combining rampaseen with spraying Gamma BHC at 0.25% every 21 days during the major crop only. Results so far are promising in terms of reduction in cost of labour and the quantity of insecticide applied. Ribas et al (1976) found that the amount of insecticide residue in coffee bean increased and that this probably resulted from longer exposure time for translocation of insecticide to the beans from outside the fruits. A reduction in frequency of insecticide spraying before harvest is completed, by limiting spraying to the most critical period will definitely reduce the quantity of insecticide residue in the seeds.

This would be of tremendous advantage to both the growers and the consumers of such coffee.

MONTHLY SUMMARY OF TEMPERATURE AND RELATIVE HUMIDITY

APRIL 1976 - MARCH 1977

AT GAMBARI EXPERIMENTAL STATION

YEAR	MONTH	MEAN TEMPERATURE (°F) 10 A.M.			RELATIVE HUMIDITY 10 A.M.	
		Dry Bulb	Wet Bulb	Grass Minimum	Air	1Ft. (above litter)
1976	APRIL	80	76	-	82	84
"	MAY	80	78	-	85	83
"	JUNE	80	79	69	86	83
"	JULY	78	75	69	84	82
"	AUGUST	75	72	70	87	79
"	SEPTEMBER	76	73	67	87	80
"	OCTOBER	76	73	68	87	80
"	NOVEMBER	80	77	68	85	82
"	DECEMBER	79	76	68	85	78
1977	JANUARY	80	79	-	83	84
"	FEBRUARY		76	82	74	88
"	MARCH	85	79	85	73	88

TABLE 2
MEAN NO OF DEAD ADULTS PER 100 BERRIES
APRIL 1976 - MARCH 1977

		FROM TREE	FROM LITTER
1976	APRIL	61	103
"	MAY	82	33
"	JUNE	24	22
"	JULY	11	11
"	AUGUST	7	0
"	SEPTEMBER	5	16
"	OCTOBER	28	33
"	NOVEMBER	50	21
"	DECEMBER	276	12
1977	JANUARY	198	51
"	FEBRUARY	107	72
"	MARCH	186	65
	TOTAL	1035	466

Acknowledgement: I thank the Management Board of the Cocoa Research Institute of Nigeria for funding this project and sponsoring me for the conference. I am also grateful to my assistants Messers Madehin, Akinyinka and Opeilu who participated actively in the sampling and Mr. D.O. Falowo, for carrying out the statistical analysis of the data. I am particularly grateful to the Director of the Institute for permitting me to present this paper at the conference.

REFERENCES

- Colric, F. (1958) 'Le Scolyte du grain de cafe'
en Nouvelle - Caledonie, Cafe' - Cacao - The' 2, 10 - 14
- Corbeth, G.H. (1933) Some preliminary observations on the coffee
beetle borer Stephanoderes hampei Ferr. Malay agric J. 21, 8 - 22
- Do Amaral Castro, J. (1924) A colheita e o combate ao
Stephanoderes. Revta Soc. rur, bras. 5 (33) 342 - 343.
- Hargreaves, H. (1924) Report Govt Entomologist Rep. Dept. Agric.
Uganda 1923, 21 - 8
- Hargreaves, E. (1935) Stephanoderes hampei Ferr, Coffee berry -
borer in Uganda E. Afr. agric J., 1, 218 - 24
- Hutson, J.C. (1936) The coffee berryborer in Ceylon. Trop.
Agriculturist 87, 378 - 83
- Idowu, O.L. (1971) Report of work done on coffee Entomology as Research Officer in -
Training (1968 - 1977) at Cocoa Research Institute of Nigeria 24pp.
- Jervis, T.S. (1939) The control of the coffee berry borer in Bukoba
E. Afr. agric. J. 5, 121 - 4
- Le Pelley, R.H. (1968) Pests of Coffee: Collembola and Coleoptera
pp. 99 - 138. Longmans, London & Harrow.
- Oyebade, I.T. (1976) Studies on the pattern of growth and development of
Coffee canephora fruit in Nigeria Turrialba: vol 26, No 3
- Ribas, C.; Pigati, P.; Guinidani C.M. and Netto N.K. (1976)
Aquivos do Instituto Biológico São Paulo 43, 121 - 123
- Ticheler, J.H.G. (1961) An analytical study of the epidemiology of the coffee
berry borer in the Ivory Coast.
Meded Landbttoogesch. Wageningen, 61 (11) 1 - 49.

COMPARATIVE EFFICIENCY OF FOUR SPRAYING PUMPS IN DELIVERING COPPER FUNGICIDE ON COFFEE LEAF SURFACE

G. A. FILANI

Chief Research Officer, Head Plant Pathology Division

and Co-ordinator Coffee Research Programme

Cocoa Research Institute of Nigeria,

P.M.B. 5244,

Ibadan, Nigeria

Introduction

Both the Arabica and the Robusta types are cultivated in Nigeria with the Robusta scattered widely over the Southern parts and the riverine areas of the Northern States where the annual rainfall ranges from 1000mm - 2000mm. Arabica is grown only on the Mambilla plateau of the Gongola State in the North-Eastern parts of Nigeria (see Plate I). The plateau which is about 2,5000 sq. km. in area rises to a height of 1,500 - 2,100 metres above sea level. The rainfall which ranges from 1,800mm - 2,100mm per annum starts early in March and continues until October/November of the year. With a mean minimum temperature of 65°F and a mean maximum of 85°F, the plateau supports good crops of Coffea arabica. It is not known exactly how long C. arabica has been growing on the plateau, but the first introduction was said to have been made into Gembu by de Bouley from Bamenda in West Cameroon in 1952 (Kaasboll-Smith, 1965).

Within the last few years, the Government of Nigeria has shown a lot of interest in Coffee production and has made coffee one of the scheduled crops (Filani & Ajobo, 1977). With this act, interest in coffee production by individual small - holders and governments at plantation levels has been generated. Many old farms are being rehabilitated while new ones are being opened up particularly on the Mambilla, and this has led to increased problems of pests and diseases. The most serious disease of C. arabica in Nigeria is Hemileia leaf rust, and the need for effective control has become more important than ever before. Hence within the last 3 - 4 years, definite experiments have been carried out both in the laboratory and on the field to determine the most suitable fungicides against Hemileia leaf rust and definite recommendations have been made to coffee farmers (Filani, in press). Experiments have also been carried out on the most suitable pumps for spraying coffee against this disease and the results of these experiments are reported in this paper. Various types of spraying pumps are available in Nigeria most of which are being used for spraying pesticide against Phytophthora black-pod disease of cocoa. Broadly, there are two types of pumps -

- a. Knapsack motorised mistblowers
- b. Knapsack pneumatic (air-pressure) mistblower, many brands of which are being

marketed by different companies under various trades names. One of the ways the Federal Government, and the Gongola State Government in particular are encouraging farmers to grow coffee is by making available proven seedlings cheaply and with the rehabilitation of old farms and the establishment of new ones, it has become necessary therefore to determine the best type of spraying pumps for applying fungicides on coffee.

Materials and Methods

Four spraying pumps - Falcon, Kinkelder, CP3 and Yanmar MS1 Motorised mist-blower - were evaluated Falcon and Kinkelder have pressure gauges with the recommended level clearly marked, while the CP3 has to be continuously pumped throughout the spraying period (see plate 2).

Five different assessment tests were carried out as follows:

1. Spray pattern
2. Emission or Flow rate
3. Droplet size
4. Application rate
5. Chemical deposit,

and in all cases, the nozzles used were those that came with the various pumps. In all the assessment tests, Procida stabilized Bordeaux mixture was used. This is prepared by adding 90gm. of the mixture, i.e. pre-mixed copper sulphate and lime, into about 5 litres water in graduated plastic bucket. The mixture was thoroughly stirred with a clean stick and the solution made up to 9 litres by addition of more water. All assessments were carried out with the pneumatic pump at the pump at the recommended pressure levels, while the yanmar MS1 was assessed with the throttle at four different levels of full, $\frac{3}{4}$, $\frac{1}{2}$ and $\frac{1}{4}$.

1. Spray pattern: Procida stabilized Bordeaux mixture was prepared, and 0.5% w/v of Fuchsin Basic stain added. After stirring the mixture very thoroughly, it was poured into the pump using a clean handkerchief as a sieve. A large sheet of absorbent paper was laid flat on a table and the nozzle of the pump placed about 36 cm above the centre of the paper. The pump was pressurised to the maximum level and the paper sprayed by briefly exposing it to the spray by rapidly sliding a shield held in position between the nozzle and the paper. This operation was carried out using all the pumps including the motorised mist-blower, which was used to spray the paper when at full throttle only. The size of the pattern was determined by measuring the diameter at two different axes and finding the mean of the two. In case of the Kinkelder, the middle uncovered position was measured and deducted from the total measurement.

2. Emission (Flow) rate: Procida stabilized Bordeaux mixture was prepared and poured into the tank. The nozzle was directed into a large funnel leading into a calibrated measuring cylinder, and with the aid of a stop watch, the time taken to discharge 1 litre of spray liquid was determined. The operation was repeated four times and the mean time determined.

3. Droplet size: A mixture consisting of one part petroleum jelly and two parts of paraffin, (Maithia, 1978), was prepared and poured into 11 cm petri-plates to a depth of about 2mm. The mixture was then left to set by cooling. Procida stabilized Bordeaux mixture was prepared and poured into the tanks of the pumps. After pressure has been applied to the recommended level, spray droplets were collected on the surface of the petroleum jelly/paraffin mixture by briefly exposing the plate to the nozzle at four different distances of 1m, 2m, 3m and 4m. The mixture was immediately covered by a fresh layer of paraffin to prevent reduction in droplet size by evaporation. A special Strubin optical instrument with X15 eyepiece mounted on a clamp was used to count and measure the droplet sizes at two different axes. The mean of 100 droplet sizes was then determined.

4. Application rate: Each of the pumps was filled with 9 litres Procida stabilized Bordeaux mixture. A standard, well kept and correctly pruned coffee plot was selected. With the aid of a stop watch the time taken to spray a single coffee tree as well as groups of 10 trees were determined. These operations were repeated 6 times and the mean time taken to spray a single tree was determined. Using the time taken to spray a single tree, and the amount of fungicide emitted per minute as determined in flow rate assesement by a particular pump, the quantity of fungicide required per tree in ml. was calibrate. From this the quantity of fungicide in litres required to spray on hectare of coffee was calculated (Anon. 1977) using the figure of 1327 trees per hectare at standard planting distances 2.74m x 2.74m.

5. Chemical Deposit: Ten leaves were detached at random from ten randomly selected coffee trees that had been sprayed with Procida stabilized Bordeaux mixture using each of spraying pumps. The leaves were taken about 3-4 hours after spraying to allow the spray solution to dry on the leaf surfaces. The upper and lower surfaces were separately treated by shaking for 30 min. in 200ml. 0.001N aqueous glycin solution. After shaking, the wash liquid was decanted from the leaf using Whatman Filter paper No. 42. The filterate was acidfied with 10ml. NH_2SO_4 and boiled down to 25ml. in volume.

The copper present in the aliquot of this solution was determined colorimetrically using Martin's technique (Martin, 1957) with cyclohexanone oxalydihydrazone. The amount of copper so determined is designated "removable copper fraction" (Park & Burdekin, 1964). The residue on the filter paper was dissolved with two fractions of 10ml. distilled water poured through the filter-paper, and the resultant solution made up to 50ml. with distilled water. The copper content of this solution determined colorimetrically was designated "physical or insoluble removable fraction". The surface of leaf was swabbed with cotton wool dipped into 50ml. NH_2SO_4 containing 1% Teepol. The resultant solution was filtered through Whatman Filter paper No.1 and made up to 50ml. The copper content of this solution determined colorimetrically was designated "irremovable copper fraction". The sum total of these three fractions is the total copper deposit on the leaf surface. The surface area of each leaf sample was determined by using Sleep's formula (1958), in which

$$A = 0.65L \times B + 0.48$$

where

A = Leaf surface area

L = Length of leaf in cm.

B = Breadth in cm.

Total copper deposit was thus expressed per sq. cm. leaf surface area.

Results

Plate 2 shows the spray patterns of each of the spraying pumps while Table 1 shows the sizes of each of the pattern spread. These measurements of each spread were at two seperate axes. It will be seen that Falcon gave the largest spread while CP3 appeared to give the smallest spread. However, when the size of the central uncovered portion is deducted from the size of the total spread of the Kinkelder pattern, this pump gave the actual smallest spread. Falcon was found to be the best both in shape and spread of pattern. Table 2 shows the flow rate and the applications rates on the field per individual tree and per hectare of coffee. In all cases and even at the lowest throttle the yanmar MS1 produced the highest flow rate and application rates. Among the pneumatic pumps, Falcon was found to give the highest flow rate and application rates while CP3 produced the lowest. Table 3 shows the droplet sizes of the spray mist produced by each of the pumps at four different distances. It can be seen that the longer the distance, the smaller the droplet size becomes for all the pumps. Falcon produced the largest droplet sizes among the pneumatic pumps at each of the distances. The yanmar MS1 produced smaller droplets than any the pneumatic ones, and the lower the throttle speed, the larger the droplet size. A statistical analysis of the means of the droplet sizes shows that Falcon produced the

Table 1: Spray pattern measurements (cm.) of four different spraying pumps

Pump	Mean pattern size *
Falcon	36.60 a
Kinkelder	17.10 c
CP 3	18.50 c
Yanmar MS1	27.75 b

* Mean pattern sizes having the same letters in column are not significantly different one from the other at 5% level (P = 0.05)

Table 2: Flow rate and application rate of Bordeaux mixture by four different spraying pumps

Spraying Pump	Flow Rate	Application Rate	
	ml/min.	ml/tree	Litre/hatre
Falcon	714.30	690.49	916.28
Kinkelder	407.80	434.97	577.21
CP 3	397.40	532.50	706.63
Yanmar MS 1			
Full throttle	1,886.80	1,415.10	1,877.84
$\frac{3}{4}$	1,620.40	1,250.00	1,658.75
$\frac{1}{2}$ "	1,483.60	1,157.21	1,535.62
$\frac{1}{4}$ "	1,186.90	929.74	1,233.76

Table 3: The range of droplet sizes (μ) obtained by four different spraying pumps at four different distances

Pump	Distance				Mean
	1m	2m	3m	4m	
Falcon	423	416	414	390	410.75 a*
Kinkelder	407	409	397	391	401.00 a
CP 3	379	374	373	363	372.25 b
Yanmar MS 1					
Full Throttle	308	308	287	264	291.75 d
3/4 "	323	319	284	281	301.75 d
1/2 "	330	331	307	297	316.25 c
1/4 "	326	330	316	303	318.75 c

* Mean droplet size having the same letters in the column are not significantly different one from the other at 5% level (P = 0.05)

Table 4: Mean total copper deposit on upper (U) and lower (L) leaf surfaces in mg./cm² by each of the four spraying pumps

Pump	Leaf Surface		
	U	L	Total
Falcon	0.56b*	4.10b	4.66c
Kinkelder	0.18d	2.03c	2.21d
CP 3	0.23c	2.91c	3.14d
Yanmar MS 1			
Full throttle	0.73a	6.41a	7.14a
3/4 "	0.69a	5.75a	6.44b
1/2 "	0.69a	5.75a	6.44b
1/4 "	0.71a	5.88a	6.59ab

* Mean copper deposits having the same letters in the column are not significantly different one from the other at 5% level (0.05)

largest droplet while yanmar MS1 at full and $\frac{3}{4}$ throttle produced the smallest. Table 4 shows the actual copper deposits on the leaf surfaces. It can be seen that the deposits on the lower surface were much larger than the deposits on the upper surfaces. Also copper deposits made by the yanmar MS1 at any of the throttle levels were found to be significantly greater than those made by any pneumatic pumps among which Falcon gave the highest deposits.

Discussion

Hemileia leaf rust infection of C. arabica is the most serious disease of coffee in Nigeria. Changes in government agricultural marketing policies leading to revived and sustained interest in the rehabilitation of old coffee farms and the expansion of new ones has made effective disease control a most important factor to the growth of the industry. Field and laboratory tests, within the last 4-5 years, of fungicides have shown that the most effective chemicals are the copper based formulations particularly Bordeaux mixture. It has also become necessary to determine which, out of the numerous spraying pumps available in the Nigerian market, are most suitable for applying these fungicides. Ordinarily the farmer can purchase any of the pneumatic sprayers from the market but recent experiences have shown that not many of them are good in applying the chemicals on to coffee leaf surfaces. Apart from the physical characteristics of these sprayers which differ widely, they come with different nozzles, and their operational procedures and handling are widely different and in many cases very complex. As can be seen in Plate 3 the spray patterns show the differences in the nozzles of the four evaluated pumps. The Kinkelder does not only produce a smaller pattern than the Falcon, it also leaves a central uncovered portion. The Falcon produces the largest pattern and therefore appears to be better than any of the other pumps.

A close look at the pattern size, flow rate, application rate, droplet size and actual copper deposits shows a definite relationship. The Falcon which produced the largest pattern also has the largest flow rate, application rate, droplet size and copper deposit among the pneumatic pumps. The implication of this is that the Falcon is emitting more fungicide under any given condition than the CP3 and Kinkelder. The droplet sizes of the mist emitted by each of the pumps became smaller with increase in distance between the nozzle and collection surface. This is probably due to drift effect in the atmosphere resulting in moisture loss and therefore reduction in sizes of droplets. However, this may not be too critical since pumps are hand directed and in normal spraying the lance is actually thrust into the coffee bush thus depositing the fungicide on the leaf surfaces at point-blank range. In any case, it has been shown (Pereira, 1972) that droplet size is not too critical for collection efficiency when spraying is carried out reasonably close range. It has also been shown (Filani, 1979) that for efficient protection of leaves against rust infection, about 4.00 - 4.50mg. cu. was required per sq. cm. of leaf surface. The efficacy of this amount remained for up to about eight weeks after which the amount was reduced to about 1.0mg. most of which was in the irremovable form. It would therefore appear that the Kinkelder and CP3 with their present nozzles are unsuitable in spraying coffee against leaf rust infection.

The flow rate and the application rate of yanmar MS1 are much greater than any of the pneumatic pumps. This same trend is also shown in the total copper deposit on leaf surface which in almost all cases are more than doubled those of CP3 and Kinkelder. The use of this pump at any of its throttle speed results in wasteful use of fungicides. Apart from this, the pressure of the spray mist is so great that the whole coffee plant is violently agitated resulting, in many cases, damages to the leaves. To avoid such a damage, a sprayer using yanmar MS1 would be required to be of considerable distance from the target, that is the leaves, but the drift effect particularly under windy conditions would make the droplets miss their targets.

In recommending a particular spraying pump to the Nigerian farmer, the most important factors apart from those enumerated above, are the initial purchasing cost of the pump, the ease of operation and availability of replacement parts. Most Nigerian coffee farmers are small scale holders for whom the use of an expensive motorised mist-blow is most unec-

onomic. It is relatively difficult to handle and operate and with petrol required to run the engine, it becomes even more dangerous for the illiterate farmer to handle. Maintenance cost is high and replacement parts are not always easy to come by. Therefore this pump is not favoured for spraying coffee.

Testing of spraying pumps as well as fungicides most suitable for the application of most effective formulations is a continuous process and from time to time effective pumps and fungicides are recommended for placement into the Nigerian market.

References

1. Anon, (1977). Calibration of coffee sprayers C.R.F. Technical Circular No. 35 Kenya Coffee 42: 335 - 340.
2. Filani, G.A. (1979). Ageing characteristics of three different copper fungicides on coffee leaves Proceedings 9th Annual Conference, Nig. Soc. Plant protection (In press).
3. Filani, G.A. & O. Ajobo (1977). The present state of coffee industry in Nigeria. Proceedings 8th International Colloquium on coffee, Abidjan Nov/Dec. 1977.
4. Filani, G.A. (1980). Field evaluation of chemicals for the control of Hemileia leaf rust disease of coffee in Nigeria (In press).
5. Kaasboll - Smith, S.A. (1965). Notes on the cultivation of Arabica coffee on the Mambilla District. Min. of Agriculture, Northern States, Nigeria. 21 pp.
6. Maithia, A.S.K. (1978). Evaluation of motorised knapsack mist-blowers for fungicide application in coffee. Kenya Coffee 43: 187-192.
7. Martin, J.T. (1957). Spray application problem XXXII. Notes on the determination of surface deposits of copper fungicides Ann. Rep. Long Ashton Res. Sta. 1956.
8. Park, P.O. & D.A. Burdekin (1954). Studies on the ageing of copper fungicides used to control coffee leaf rust. Ann. appl. Biol. 54: 335-347.
9. Pereira, J.L. (1972). Modifications of hydraulic sprayer (Hardi) for improved coffee spraying East Afr. Agric. & For J. XXXVII (4): 318-324.
10. Sleep, K. (1958). The persistence of insecticides on coffee leaves. Misc. Rep. no. 204. Tropical Pesticides Res. Institute, Arusha, Tanzania.

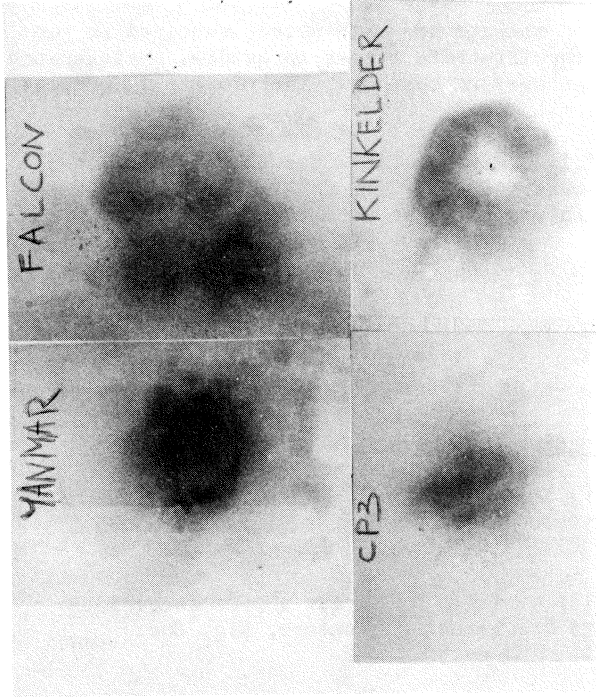
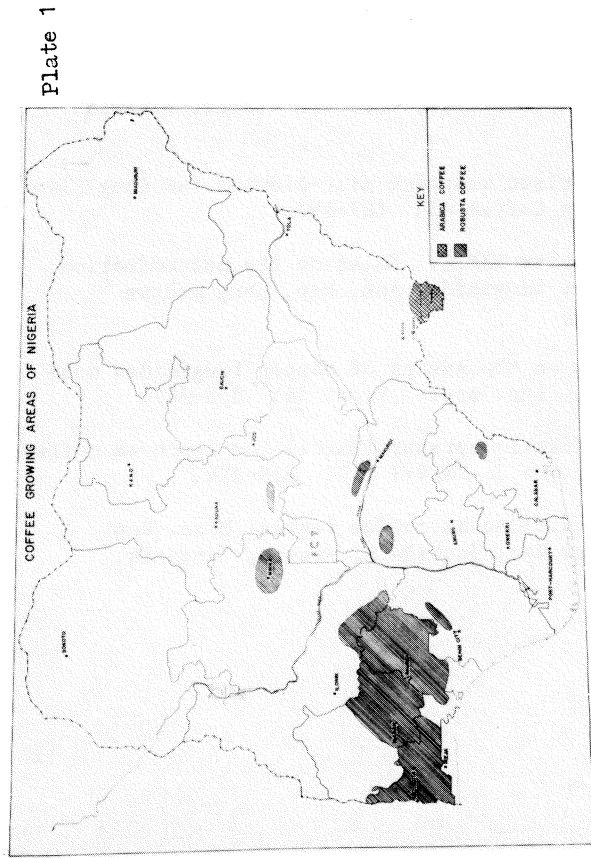


Plate 2: Spray Patterns of each of the pumps

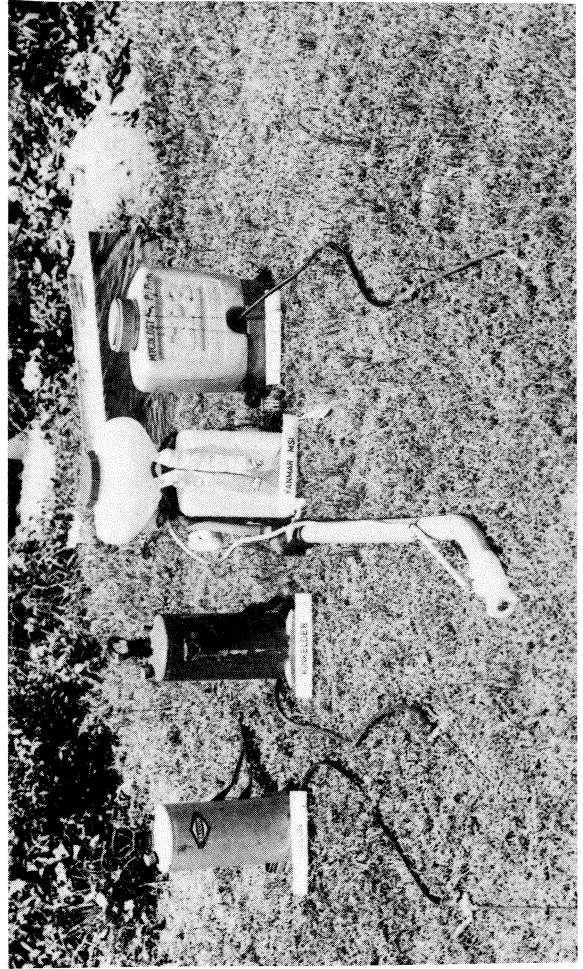


Plate 3: The Spraying Pumps Evaluated

Rapports de synthèse

CHIMIE, TECHNOLOGIE, EFFETS PHYSIOLOGIQUES

Les échanges pluridisciplinaires entre ingénieurs, hommes de science et technologues permettent d'établir l'état de nos connaissances sur le café vert, le café torréfié et les extraits de café. Ce résumé présenté par le Professeur D. Reymond, a été rédigé avec le concours de MM. R. Viani et M. Arnaud.

Méthodologie analytique

Les méthodes modernes d'analyse sont utilisées pour distinguer les variétés de café, pour suivre la formation du goût et de l'arôme au cours de la torréfaction, pour assurer la bonne qualité du café marchand en établissant le niveau acceptable des contaminations extérieures dues aux traitements agricoles et au transport, et pour mettre en évidence des relations entre composition et propriétés physiologiques du café-boisson. Ces techniques analytiques constituent un facteur important de formation des spécialistes dans les pays en voie de développement (M. Quijano-Rico, Colombie).

Parmi ces méthodes d'analyse, nous mentionnerons tout particulièrement la chromatographie à haute performance (HPLC) qui permet de séparer les composants solubles du café-boisson et la résonance magnétique nucléaire pour déterminer des associations moléculaires dans le café-boisson.

Qualité analytique du café

Le dosage précis de la caféine constitue un domaine d'analyses qui a déjà fait l'objet de plusieurs communications aux colloques antérieurs sur le café ; la méthode automatisée (K. Sloman, General Foods, Etats-Unis) offre l'avantage de la reproductibilité et de la précision en utilisant des méthodes d'extraction adaptées au café vert, au café torréfié et au café instantané. La localisation de la caféine (R. Pfrunder, H. Wanner, P. M. Frischknecht, T. W. Baumann, Université de Zurich, Suisse) a montré la présence de deux types d'agrégats, dont les comportements de solubilisation sont différents et dont la localisation est voisine de la paroi cellulaire dans la feuille du caféier.

Le développement de moisissures sur le grain de café conduit à des détériorations rendant le café impropre à la consommation ; l'examen de grains ainsi contaminés (C. Levi, General Foods, Etats-Unis) montre que les mycotoxines sont rarement présentes ; dans quelques cas, on a détecté de l'ochratoxine, dont la présence n'est pas associée à un risque pour la santé humaine. De plus, la torréfaction provoque une décomposition de ce type de molécules.

La contamination du café torréfié par le benzopyrène a été suivie dans plusieurs laboratoires ; une investigation très poussée (C. Levi, General Foods, Etats-Unis) a montré un niveau de contamination compris entre 0,5 et 3 ppb dans le café torréfié et de 0,1 à 0,7 ppb dans les extraits de café ; ce degré de contamination est très faible et la consommation de café correspond au plus à 1 % de la dose journalière en hydrocarbures polycycliques à laquelle nous sommes exposés (Ch. Schlatter, Université de Zurich, Suisse).

Des réactions colorées (J. Wurziger, R. Drews, B. Suche, Hambourg, RFA) et divers indices chimiques sont utilisés pour déterminer les proportions de café Robusta et de café Arabica dans des échantillons de cafés torréfiés moulus ;

ces analyses sont effectuées sur des fractions lipidiques extraites par un solvant.

Formation d'arôme et de couleur au cours de la torréfaction

Les acides phénoliques, en particulier les acides chlorogéniques, subissent des dégradations importantes au cours de la torréfaction ; ces variations sont analysées par chromatographie HPLC (G. Pictet, H. Moll, Nestlé, Suisse ; G. H. D. Van der Stegen, Douwe Egberts, Pays-Bas).

L'origine de plusieurs classes de substances générées au cours de la torréfaction peut être attribuée à des réactions de type Maillard (R. Tressl, Université technique, Berlin). Le réarrangement décrit par Heyns à partir des produits d'Amadori permet d'expliquer la présence de nombreux dérivés furanniques dans l'arôme du café. D'autres composés hétérocycliques azotés et soufrés sont attribués à des réactions de condensation analogues à partir des acides aminés correspondants.

La complexité de l'arôme du café, dans lequel plus de 500 constituants ont été décrits, est due à des réactions pyrolytiques entre précurseurs. Des réactions modèles sur des mélanges de glucides et d'acides aminés (G. Herrmann, W. Baltes, Université technique, Berlin) ont permis d'obtenir certaines notes aromatiques, dont les profils chromatographiques sont voisins de ceux de l'arôme du café.

Qualité du café-boisson

Les profils des acides phénoliques (G. Pictet, H. Moll, Nestlé, Suisse, C. H. D. Van der Stegen, Douwe Egberts, Pays-Bas) permettent de caractériser les variétés de café utilisées pour la préparation du café-boisson, en tenant compte du degré de torréfaction. Les degrés d'association moléculaire entre acide chlorogénique, thiamine et caféine (I. Horman, R. A. Carpenter, E. Brambilla, B. Dreux, Nestlé, Suisse) ont été déterminés ; l'association de la vitamine thiamine avec l'acide chlorogénique représente une possibilité pour comprendre l'effet anti-thiamine qui a été observé par Somogyi sur des sujets humains. Des procédés physiques, parmi lesquels le procédé Lendrich ont été développés pour produire des cafés spéciaux ; l'analyse (W. König, W. Rahn, R. Vetter, Université de Hambourg, RFA) montre dans ces cafés une diminution des produits de composition des acides chlorogéniques, ce qui pourrait expliquer la diminution d'agressivité de ces cafés sur des consommateurs sensibles.

L'influence de la température d'extraction du café-boisson joue un rôle important dans l'équilibre des composants acides, de la couleur et de la caféine ; un jury entraîné de dégustateurs (A. Voilley, F. Sauvageot, P. Pierret, Université de Dijon, France) a montré des différences d'amertume et d'acidité dans des cafés-boissons extraits à des températures différentes.

L'influence des conditions d'extraction sur la composition des cafés instantanés (H. G. Maier, Université technique, Braunschweig, RFA) a été déterminée sur les composants minéraux ; le dosage du potassium et des sulfates permet de déterminer le taux d'extraction, si la composition du café torréfié est connue.

Dans des conditions adéquates d'emballage, le café torréfié moulu et le café instantané (W. P. Clinton, General Foods, Etats-Unis) présentent des durées de conservation de

l'ordre d'une année, comme le montrent des dégustations systématiques par des experts et des consommateurs. Pendant les semaines qui suivent l'opération de torréfaction, l'influence de l'emballage sur la rétention de l'arôme est négligeable (E. Cros, G. Fourny, B. Guyot, M. Rouly, J.-C. Vincent, IFCC, France). Les emballages étanches présentent donc un avantage pour la conservation du café torréfié lorsque la période de consommation dépasse huit semaines. Une bonne corrélation a été trouvée entre critères objectifs d'analyse de l'arôme et estimations subjectives d'experts (E. Cros *et al.*, IFCC, France).

Qualité technologique du café vert

Une installation simple semi-automatique de traitement du café par voie humide (J.-C. Vincent, IFCC, France) permettra d'obtenir un café Arabusta de haute qualité en Côte d'Ivoire. Dans l'installation pilote, les sous-produits sont utilisés pour fournir l'énergie thermique. Le stockage du café vert dans les pays producteurs (H. G. Stirling, Tropical Products Institute, Grande-Bretagne) peut être assuré dans de bonnes conditions d'humidité relative et de température en équipant les entrepôts par des systèmes automatisés d'aération. L'utilisation d'enzymes pectinases (B. S. Olsen, G. M. Ehlers, Novo Industries, Danemark) peut présenter un intérêt dans le traitement par voie humide du café vert.

L'évolution des techniques de transport maritime est conditionnée par des exigences de gestion et d'économie de carburant. L'utilisation de conteneurs (F. Jouanjan, Compagnie générale maritime, France) permet d'éviter des contaminations secondaires et des condensations d'humidité sur les chargements de café vert.

La détection de défauts du café vert est une opération automatisée basée sur des détecteurs de couleur. L'utilisation de la bande d'émission ultra-violette n'a pas donné une corrélation satisfaisante avec la qualité à la tasse (H. W. Carter, Acurex Corporation, Etats-Unis). L'optimisation du tri électronique a nécessité le développement d'un programme sur ordinateur (S. Milo, L. Roarzi, Illycaffè, Italie), qui tient compte des facteurs complexes de corrélation entre couleur du café vert, qualité à la tasse et rendement industriel.

Production de cafés torréfiés et de cafés instantanés

La plupart des opérations-unitaires de génie alimentaire sont utilisées (C. Judson-King, Université de Berkeley, Etats-Unis) dans la production des cafés instantanés. Les connaissances physiques de base permettent de caractériser les transferts de masse et d'énergie dans la torréfaction, l'extraction, la concentration et le séchage. Les phénomènes de diffusion et de convection permettent par leur étude d'optimiser la rétention d'arôme dans le séchage par atomisation et par lyophilisation (P. Fosbøl, E. E. Pedersen, A/S Atlas, Danemark). Les résultats décrits dans des colloques antérieurs par H. A. C. Thijssen ont été confirmés ; la rétention de composants aromatiques lors du séchage dépend de la diffusion sélective et de la concentration des composants non-volatils (C. M. Bonilla Videles, M. Loncin, E. Plett, LIQC, Colombie et Université technique, Karlsruhe, RFA). L'utilisation d'enzymes galactomannanase a été proposée (B. S. Olsen, G. M. Ehlers, Novo Industries, Danemark) pour réduire la viscosité des concentrés liquides de café. Ce domaine constitue aussi une excellente promotion de la technologie en Colombie (M. Quijano Rico, LIQS, Colombie).

Décaféination et production de caféine

L'utilisation d'eau comme fluide vecteur de la caféine permet d'opérer une décaféination des grains de café vert (S. Katz, General Foods, Etats-Unis). Le fluide d'extraction est ensuite traité par un solvant pour obtenir de la caféine. Les propriétés physiques de l'hydrate de caféine, parmi lesquelles le point critique (H. Bothe, H. K. Cammenga, Université technique, Braunschweig, RFA) et le polymorphisme cristallin, sont utilisées pour obtenir un produit pur répondant aux critères de la pharmacopée. Une installation mobile pour l'extraction de caféine à partir des déchets de café a été construite en Colombie (M. Quijano Rico, LIQS, Colombie).

Valorisation de la pulpe et de sous-produits de la cerise de café

L'utilisation de pulpe de café en alimentation animale est limitée par la présence de caféine et de tanins (E. Braham, R. Bressani, INCAP, Guatemala). Des procédés de séparation sont nécessaires pour valoriser les pectines ; il est aussi possible d'améliorer la valeur nutritive par ensilage et par combinaison avec des tourteaux d'oléagineux. Les méthodes de fermentation anaérobiques offrent des possibilités d'utilisation des sous-produits pour obtenir du méthane (M. R. Adams, J. Dougan, Tropical Products Institute, Grande-Bretagne) ; l'épuration biologique par bioxydation permet de résoudre le problème des eaux usées dans les ateliers de traitement du café par voie humide. L'influence des traitements technologiques sur la composition en tanins de la pulpe peut être caractérisée en utilisant une méthode analytique poussée (J. Zulega Vasco, R. Tabacchi, Université de Neuchâtel, Suisse).

Effets physiologiques de la caféine

L'effet bactéricide de la caféine ne permet pas d'utiliser le test de Ames (Ch. Schlatter, Université de Zurich, Suisse). Le mécanisme d'action de la caféine au niveau cellulaire semble être dû à son action sur deux types de récepteurs ; cette action sur le niveau en effecteurs (acide adénylique cyclique ; adénosine) donne une meilleure compréhension des effets pharmacologiques positifs de la caféine sur la régulation respiratoire du prématuré, sur la migraine d'origine vasculaire, sur l'acuité intellectuelle (R. Paoletti, Université de Milan, Italie). Cette interaction pourrait aussi rendre compte de l'effet à haute dose de la caféine sur l'équilibre hormonal (stimulation de la glande thyroïde, de la sécrétion lactée et de la croissance) des animaux d'expérience (R. J. Wurtman, MIT, Etats-Unis). La caféine renforce l'activité exploratoire des animaux d'expérience sans provoquer une excitation importante (R. Vertua, L. De Angelis *et al.*, Université de Trieste, Italie).

Le chemin métabolique de la caféine chez l'homme est maintenant bien établi (M. Callahan, A. D. Little, Etats-Unis, M. Arnaud, Nestlé, Suisse) ; il comprend dix-neuf métabolites, dont trois récemment identifiés sont des dérivés de l'uracile. La cinétique de ce métabolisme dépend du régime alimentaire et de l'état physiologique de l'organisme humain ; la modération de consommation de boissons contenant de la caféine est recommandée pour la femme enceinte (Ch. Schlatter, Université de Zurich, Suisse).

L'émission corporelle de chaleur est due au métabolisme activé ; l'ingestion de boissons chaudes (R. F. Clark, Université de Londres, Grande-Bretagne) provoque une augmentation de cette émission de chaleur. L'activité métabolique de l'homme en bonne santé est augmentée par l'ingestion de caféine, qui provoque elle-même l'intensification du métabolisme oxydatif des acides gras (K. Acheson, Université de Lausanne, Suisse).

Effets physiologiques de consommation du café-boisson

Les effets physiologiques positifs de la caféine sont bien sûr responsables pour une bonne part du bien-être provoqué par la consommation de café-boisson. Lorsque la thiamine est présente en quantités suffisantes dans la diète, aucun effet limitant n'est observé sur cette vitamine (R. Stalder, Nestlé, Suisse). Trois facteurs physiologiques définissent le reflux acide œsophagique qui peut causer des brûlures d'estomac chez des sujets sensibles ; la consommation de café noir ne provoque pas de modification de ces facteurs (H. P. Wuerzner, Nestlé, Suisse). Les publications récentes sur des effets physiologiques ont été analysées (S. Heyden, Université Duke, Etats-Unis) ; un risque modéré d'accélération précoce des battements du cœur existe pour les forts consommateurs de café dépassant huit tasses par jour.

La Suède est un pays de forte consommation du café-boisson ; l'épidémiologie prospective (L. Wilhelmsen, Université de Göteborg, Suède) a examiné les risques cardiovasculaires en fonction de la consommation du café.

On peut conclure de ces études que la consommation de café-boisson ne présente pas de risque accru de maladies cardio-vasculaires pour le consommateur.

Études de littérature et standardisation

La revue de littérature scientifique sur la période 1977-1980 donne 327 références (R. F. Smith, Grande-Bretagne). Les projets en cours à l'ISO ont été passés en revue ; ils montrent la nécessité de mettre sur pied des méthodes d'analyses reconnues au niveau international (R. J. Clarke, General Foods, Grande-Bretagne).

Professeur D. Reymond
Secrétaire scientifique
de l'ASIC

AGRONOMIE

La tribune offerte par le colloque aux chercheurs des disciplines agronomiques est très importante ; elle donne la possibilité de faire le point sur les études d'amélioration génétique, les techniques culturales, les maladies et parasites du caféier.

Le résumé suivant, présenté par R. Coste, a été rédigé avec la collaboration de H.-R. Cambrony, adjoint au directeur général de l'IFCC.

Botanique, génétique

Les débats ont commencé sous la présidence du docteur G. Valenzuela, directeur des recherches agronomiques de la Fédération nationale des caféiculteurs de Colombie. La première communication a traité de la systématique des caféiers d'après la dernière classification botanique en date, revue selon les hypothèses inédites du professeur J.-F. Leroy, du Muséum d'histoire naturelle de Paris, continuateur des travaux des professeurs A. Chevalier et R. Portères. Les études de ce spécialiste des *Mascaroffea* (caféier sans caféine de Madagascar) centrées sur le positionnement, l'organisation des pièces florales et leur mode de développement, introduisent des ponts nouveaux et des filiations entre la multitude connue des actuels vrais et faux caféiers des continents africano-malgache et asiatique, si bien que ces espèces se trouvent maintenant regroupées de façon originale (en quatre genres *Coffea* s. s., *Nostolachma*, *Psilanthus*, *Argocoffea*).

M^{me} D. Callen, collaboratrice du précédent orateur, a conforté ces nouvelles hypothèses par l'étude des pollens d'une cinquantaine d'espèces de ces arbustes, illustrée

d'excellentes micro-photographies. Parmi ses conclusions se dégage une suggestion nouvelle sur l'origine génétique hybride du *Coffea arabica* (*C. canephora* × *C. ligustroides*).

Le docteur A. Charrier (Orstom, Côte d'Ivoire) a abordé ensuite le problème, fondamental pour l'amélioration future des caféiers cultivés, de la constitution et du rôle des centres de ressources génétiques caféières. Il a souligné l'importance de ces collections de base (en opposition aux collections de travail des centres de recherches), très riches en types spécifiques dont la sauvegarde doit être assurée de toute évidence, avec une grande urgence, et qui doivent même être diversifiés pour certains groupes sensibles aux manifestations actuelles de l'érosion génétique (*Mascarocoffea*), quand la constitution de réserves botaniques totales ou partielles se révèle impossible.

Le docteur M. Söndahl, de la section de génétique de l'Institut agronomique de Campinas (Brésil), a décrit les différentes étapes de la sélection caféière du principal pays producteur mondial depuis 1727 jusqu'à nos jours, en accompagnant sa très riche information scientifique de considérations agro-socio-économiques très réalistes, prouvant, s'il en était besoin, la remarquable rentabilité économique de cette recherche.

M. J. Berthaud, chercheur de l'Orstom, travaillant en Côte d'Ivoire, a expliqué de façon claire, en s'appuyant sur des schémas simples, les différents systèmes d'incompatibilité à la fécondation, de type gamétophytique monogénique, rencontrés chez les caféiers diploïdes. M. F. Berthou (Orstom, Côte d'Ivoire), qui lui a succédé, a fait part à son tour des nouveaux acquis dans les critères de distinction génétique entre espèces et même populations caféières locales, grâce à leurs caractéristiques enzymatiques étudiées en électrophorèse ainsi qu'à leur ADN mitochondrial.

D. J. Walyaro (Kenya) a exposé comment, grâce à une présélection en pépinière, il était possible de mener à bien et rapidement une étude quantitative et qualitative de la résistance à l'antracnose des baies (Coffee Berry Disease = CBD) de diverses variétés de caféiers Arabica. Cette étude, qui a notamment révélé le bon comportement vis-à-vis du pathogène du croisement Rume Sudan par hybride de Timor, est d'un grand intérêt économique pour l'avenir de la production caféière kényane, gravement menacée aujourd'hui par cette maladie.

Le docteur J. B. M. Custers, de l'Institut d'horticulture de Wageningen (Pays-Bas), a évoqué les trois stades critiques de la multiplication végétative des caféiers Arabica par la culture *in vitro* de bourgeons et de la diffusion de variétés nouvelles de cette espèce. Les divers facteurs de réussite de ces différents stades (établissement de la culture aseptique, augmentation rapide du nombre de nouvelles pousses, induction racinaire des explants) ont été commentés en détail.

M. J. Capot (IFCC, Côte d'Ivoire) a ensuite présenté la communication de ses collègues, Mlle Cl. Lanaud et M. J.-P. Parvais, empêchés, sur la présence et l'induction possible par le froid de noyaux végétatifs et/ou reproducteurs surnuméraires dans les grains de pollen de divers clones, espèces et variétés de caféiers, à différents stades cytologiques, étude préalable à l'expérimentation de la culture de microspores *in vitro*.

Le professeur G. R. Waller (Etats-Unis) a montré un aperçu original et réaliste sur la culture *in vitro* de tissus de caféier Arabica, celui de l'utilisation de telles cultures pour la production intensive de caféine.

Le docteur G. Staritzky (Pays-Bas) a rapporté ensuite le résultat très réussi de ses essais de culture à l'obscurité de tissu végétatif (zone corticale) de caféiers *Canephora*, et la production synchrone d'embryoïdes très nombreux aux dépens de cal de sous-culture. L'intérêt horticole d'une telle méthode est indéniable et ouvre la voie à une multiplication industrielle en laboratoire des clones de caféiers allogames actuellement obtenue à grands frais dans des installations coûteuses de bouturage.

La communication de M. P. Dublin (Gerdat, France) a montré également le succès de ses essais de culture *in vitro* appliqués aux caféiers Arabusta (hybrides interspécifiques). Ces essais intéressaient tant l'organogenèse ou néoformation que l'embryogenèse somatique. La méthodologie de ces expérimentations a été décrite avec précision, et l'orateur a souligné également le souci de conformité génétique (sans doute liée à la nature des hormones du milieu de culture) que le chercheur devra avoir en fonction de l'objectif poursuivi (multiplication ou mutagenèse).

Les réunions se sont poursuivies par la présentation, de façon condensée, d'un certain nombre de communications sur la génétique et la sélection, par le docteur G. Valenzuela et le docteur A. Charrier.

L'orateur colombien a rapporté les résultats de la « sélection préventive » de caféiers Arabica nains, productifs et résistants à la rouille, obtenus, spécialement par le choix d'individus d'élite dans les descendance d'hybrides interspécifiques par MM. Orosco, Castillo, Moreno et Cadena. Sur le plan agronomique, le docteur Valenzuela a fait référence à l'étude de M. Valencia sur la toxicité aluminique aux caféiers de certains sols colombiens. Le souci de faire face de façon économique mais efficace aux attaques futures, mais probables, de la rouille des feuilles en Colombie a amené M. J. Lequizamon à adapter les systèmes classiques de pulvérisation de fongicides aux conditions de culture de caféiers à haute densité, nouvelles dans ce pays. Le problème méthodologique de l'étude de la résistance aux nématodes a également été abordé dans le résumé de la communication de M. C. A. Baeza.

Un film documentaire en couleurs sur la recherche caféière en Colombie a clôturé l'exposé, très dense, du docteur Valenzuela.

Le docteur Charrier a exposé le résultat des études de cytogénétique poursuivies par M. J. Louarn (Orstom, Côte d'Ivoire) pour caractériser les hybrides interspécifiques (*Canephora* × *Liberica*). La proximité parentale, les fertilités polliniques et femelles sont mises en corrélation mathématique avec divers comportements cytogénétiques et prouvent la possibilité d'utiliser ces descendance hybrides dans un programme éventuel de sélection.

Techniques culturales

M. J. Capot, déjà cité, a exposé, pour le compte de son collaborateur, M. P. Duceau, les divers critères économiques, biologiques, mathématiques, agronomiques et technologiques qui président à la sélection des diverses vagues d'amélioration des hybrides Arabusta en Côte d'Ivoire. M. Berthaud a rapporté ensuite la communication de son collègue D. Le Pierrès (Orstom, Côte d'Ivoire), qui définit les caractéristiques génétiques et les aptitudes culturales des hybrides *Canephora* × *Arabica*, de formule chromosomique hexaploïde.

M. J. Snoeck (IFCC, Côte d'Ivoire) a recherché et visualisé l'influence des engrais azotés sur l'architecture des caféiers

dans les conditions écologiques de la Côte d'Ivoire, et démontré les caractéristiques morphologiques expliquant l'amélioration de la production de café sur les arbres fertilisés.

Maladies et parasites

Le docteur C. J. Rodrigues, directeur du Centre de recherches international sur la rouille des caféiers d'Oeiras (Portugal), a ouvert la session consacrée aux parasites et maladies, en décrivant, pour le compte de M^{me} L. Rijo et d'autres de ses collaborateurs, les aspects histopathologiques du phénomène d'hypersensibilité à la rouille des feuilles manifesté par certaines lignées de caféiers, démontrant un caractère d'immunité relative à cette maladie. Le même orateur a rapporté ensuite les résultats obtenus par ses collaborateurs (A. J. Bettencourt, J. Lopes, I. L. Godinho) dans leurs tentatives de transfert des facteurs de résistance à la rouille dans diverses variétés commerciales de caféiers Arabica de haute productivité, incluant notamment le caractère Caturra et ceux de l'hybride dit de Timor. L'analyse génétique des descendance successives de tels hybrides a été donnée. Des combinaisons prometteuses ont ainsi été mises en évidence. Le docteur Rodrigues a ensuite poursuivi en communiquant les résultats apparemment positifs obtenus par sa collaboratrice, M^{me} M. F. Carneiro, dans ses essais d'induction chimique par le sulfonate de méthyle-éthyle de la mutation de la race n° 1 d'*Hemileia vastatrix* en race n° XXIV contrôlée sur les clones différentiels de caféiers du Centre d'Oeiras. Le docteur Rodrigues a finalement terminé sa longue contribution en exposant ses travaux sur les caractères de résistance à la rouille à *Hemileia vastatrix* de diverses espèces de *Mozambicoffea* (notamment *racemosa*, et *salvatrix*).

Après l'aspect génétique de la lutte contre les maladies fongiques, le docteur H. van der Vossen (Pays-Bas), qui travaille au Kenya, a présenté un rapport sur l'effet protecteur et tonique de certains fongicides (cupriques ou de synthèse), qui se manifeste essentiellement par une meilleure rétention et une plus longue durée de la vie des feuilles sur les arbustes indépendamment de leurs effets préservatifs ou curatifs sur les maladies. Des hypothèses sur une interaction possible avec les teneurs des feuilles en éthylène ont été avancées.

Mme S. Sievers, de l'Agence de coopération technique d'Allemagne fédérale, travaillant auprès des laboratoires de la Fédération nationale des caféiculteurs de Colombie, a présenté ses premiers résultats dans l'étude biochimique de divers constituants des feuilles de caféiers, les distinctions observées entre les diverses espèces et variétés de caféiers en collection et selon des conditions écologiques contrastées.

Enfin, M. A. G. Watson a présenté la révolution entraînée dans la caféiculture traditionnelle par l'introduction de nouvelles machines à récolter le café au Brésil.

R. Coste

Secrétaire administratif
permanent de l'ASIC

RÉSUMÉS/SUMMARIES

QUIJANO-RICO (M.).- La science et la technologie pour un pays producteur. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 18 p., 18 fig., 31 réf.

Ce sont précisément la science et la technologie, ou plutôt leur absence plus ou moins grande de la vie des pays en voie de développement, qui constituent l'un des plus puissants facteurs du sous-développement.

Pour les pays producteurs de café le développement de la recherche scientifique sur le café a des répercussions qui débordent le domaine spécialisé et qui peuvent être hautement bénéfiques pour le développement scientifique et technologique général de chaque pays. Le problème de l'accès des pays en voie de développement à la science et à la technologie n'est pas dû à l'indisponibilité de l'information appropriée, mais à leur incapacité de la capter et de l'assimiler. Le plus efficient producteur d'informations définies est aussi le plus efficient récepteur. La recherche scientifique implique la formation de producteurs d'information, qui sont, de fait, des récepteurs efficients.

Dans les pays en voie de développement la recherche scientifique sur le café se heurte à des difficultés, dont certaines pourraient être vaincues au moyen de la coopération internationale dans le sens du dialogue Nord-Sud et dans le cadre de l'ASIC.

Dans un pays en voie de développement co-existent plusieurs ensembles dont l'un est beaucoup plus avancé que les autres. Il n'existe donc pas un type unique de recherche ou de technologie pour les pays producteurs, mais il en existe à tous les niveaux, du plus élémentaire au plus sophistiqué.

Le Laboratoire de Recherches sur la Chimie du Café et des Produits Naturels de la Fédération Nationale des Producteurs de Café de Colombie, LIQC, est décrit, ainsi que certaines de ses techniques et certains résultats de ses recherches.

Techniques : spectrométrie de masse-chromatographie en phase gazeuse avec colonnes capillaires, analyse d'éléments par activation avec neutrons thermiques et par spectrométrie d'émission atomique avec source de plasma. Résultats : corrélations génétique-chimie (inorganique), Coffea arabica plus riche en manganèse et plus pauvre en cuivre que Coffea canephora. Le manganèse est corrélé avec le magnésium et le cuivre avec les alcalino-terreux, strontium, baryum, calcium. Le manganèse joue un rôle antagoniste de celui du cuivre dans la germination des spores d'Uromyces dianthi, il stimule la germination et protège de l'action inhibitrice du cuivre.

Des composés organiques du cuivre sont de cent à mille fois plus puissants que les composés inorganiques pour l'inhibition de la germination des spores d'Uromyces dianthi. En recherche appliquée et dans le domaine du développement, l'usine mobile et le procédé créé au LIQC pour produire de la caféine à partir de déchets agro-industriels, coûtent US \$ 500.000, ont une rentabilité de 50 % et une période de récupération de l'investissement de 1,5 année, avec un matériel contenant 0,65 % de caféine, traitent 10.000 t/an de n'importe quel produit sec, pulpe, graines endommagées, résidus de thé, etc.; l'usine utilise une partie du résidu décaféiné comme combustible pour produire la chaleur dont elle a besoin.

QUIJANO-RICO (M.).- Science and technology for a producing country. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 18 p., 18 fig., 31 réf.

Unavoidable, Science and Technology or rather their absence in life of developing countries are one of the most powerful factors of underdevelopment.

For the coffee producing countries the development of scientific research on coffee has implications that overflow the specialized field and are highly beneficial for the general scientific and technological progress of each country.

The problem of the accessibility of developing countries to Science and Technology is not one of unavailability of appropriate information but of incompetence to win and digest it. The most efficient information producer is at the same time the most efficient information receptor.

In developing countries, the scientific research on coffee stumbles against difficulties that can be partially surpassed by international cooperation in the sense of the North-South dialogue, within the ASIC frame.

In developing countries a number of aggregates coexist, one of them more advanced than the others. The unique type of research or technology for the producing countries does not exist : they need it at all levels, from the most elemental to the most sophisticated one.

The Research Laboratory on Coffee and Natural Products Chemistry of the National Federation of Coffee Growers of Colombia and some research techniques and results are described.

Research techniques : mass spectrometry-capillary column gas chromatography, elemental analysis using thermal neutron activation and plasma optical emission spectrometry. Results : genetic-chemistry (inorganic) correlations ; Coffea arabica higher in manganese and lower in copper than Coffea canephora. Manganese correlates with magnesium and copper with the alkali-earths, strontium-barium-calcium. Manganese is antagonic to copper in the germination of spores of Uromyces dianthi, promotes germination and protects against the inhibitory effect of copper. Organic compounds of copper are 100 to 1.000 times more potent as inhibitors of the germination of spores of Uromyces dianthi than copper inorganic compounds. In applied research and development, the transportable plant and the processes devised at the LIQC for the production of caffeine from agricultural refuses needs a total investment of 500.000 US dollars 1980, has a profitability of 50 % and a pay back of 1,5 years if using a raw material with 0,65 % caffeine. The plant can use very dry material, coffee pulp and beans, tea refuses, etc., has a capacity to treat 10.000 t/year and utilizes a part of the decaffeinated material to produce the heat it needs.

QUIJANO-RICO (M.).- La ciencia y la tecnología para un país productor. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 18 p., 18 fig., 31 réf.

Son precisamente la Ciencia y la Tecnología, o mejor dicho, su ausencia más o menos grande en la vida de los países en desarrollo, una de los más poderosos factores del subdesarrollo.

Para los países productores de café, el desarrollo de la investigación científica sobre el café tiene implicaciones que desbordan el campo especializado y que pueden ser altamente benéficas para el desarrollo científico y tecnológico general de cada país.

El problema del acceso de los países en vía de desarrollo a la Ciencia y a la Tecnología no se debe a la indisponibilidad de la información apropiada, sino a la incapacidad que tienen para captarla y digerirla. El más eficiente productor de informaciones definidas es al mismo tiempo el más eficiente receptor de las mismas. La investigación científica implica la formación de productores de información, que son de hecho, receptores eficientes.

En los países en vía de desarrollo, la investigación científica sobre el café tropieza con dificultades, algunas de las cuales podrían vencerse por medio de la cooperación internacional en el sentido del diálogo Norte-Sur y dentro del marco de la ASIC.

En un país en desarrollo coexisten varios conjuntos uno de los cuales es mucho más avanzado que los otros. No existe por lo tanto el tipo único de investigación o tecnología para formularle al país productor, sino de todos los niveles, desde el más elemental hasta el más sofisticado.

Se describen el Laboratorio de Investigaciones sobre la Química del Café y de los Productos Naturales de la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, LIQC, y algunas de las técnicas y resultados de sus investigaciones.

Técnicas : espectrometría de masas-cromatografía de gases con columnas capilares, análisis de elementos por activación con neutrones térmicos y por espectrometría de emisión atómica con fuente de plasma. Resultados : correlaciones genética-química (inorgánica), Coffea arabica más ricos en manganeso y más pobres en cobre que Coffea canephora. El manganeso se correlaciona con el magnesio y el cobre con los alcalino-terreos, estroncio, bario, calcio. El manganeso es antagónico del cobre en la germinación de esporas de Uromyces dianthi, promueve la germinación y protege de la acción inhibidora del cobre. Compuestos orgánicos de cobre son de cien a mil veces más potentes para la inhibición de la germinación de esporas de Uromyces dianthi que los inorgánicos. En investigación aplicada y desarrollo, la planta móvil y el proceso diseñados en el LIQC para producir cafeína a partir de desperdicios agroindustriales, tiene un costo de 500.000 dólares EUA 1980, una rentabilidad de 50 % y un período de recuperación de la inversión de 1,5 años, con un material que contenga 0,65 % de cafeína y trata cualquier material seco, pulpa, granos averiados, residuos de té, etc., 10.000 t/año. La planta utiliza una parte del material descafeinado como combustible para producir el calor que necesita.

QUIJANO-RICO (M.).- Forschung und Technologie für ein produzierendes Land. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 18 p., 18 fig., 31 réf.

Einer der grössten Faktoren von Unterentwicklung in den Entwicklungsländern ist das -mehr oder weniger- nicht Vorhandensein von Naturwissenschaften und Technologie.

Für die Kaffee produzierenden Länder ergeben sich durch die Kaffeeforschung Rückwirkungen, die das Fachgebiet überschwemmen und die für die allgemeine wissenschaftliche und technologische Entwicklung des jeweiligen Landes überaus gewinnbringend sein können. Das Problem des Teilhabens der Entwicklungsländer an Wissenschaft und Technologie ist nicht die Folge von Mangel an der richtigen Information, sondern vielmehr die Unfähigkeit diese Informationen zu erfassen und zu interpretieren. Der wirksamste Produzent von bestimmten Informationen ist gleichzeitig ihr wirksamste Empfänger. Die naturwissenschaftliche Forschung erfördert die Schulung von Informationsproduzenten und gleichzeitigen Informationsempfängern.

In die Entwicklungsländern stösst die Kaffeeforschung auf Schwierigkeiten, die durch Zusammenarbeit im Sinne des Nord-Süd Dialogs und im Rahmen der ASIC überwunden werden könnten. In den Entwicklungsländern existieren mehrere "Ströme", von denen die einen ausgeprägter sind als die anderen. Das heisst : in den Entwicklungsländern existiert nicht eine einzige Art von Forschung und Technologie zu verschreiben, sondern es existieren mehrere Arten von unterschiedlichem Niveau übereinander -von der elementarsten bis zur ausspruchvollsten. Hier wird das Forschungslaboratorium über Kaffee und Naturproduktenchemie von der Federación Nacional de Cafeteros sowie einige Forschungstechniken und Ergebnisse beschrieben.

Techniken : Massenspektrometrie-Kapillarsäulen-Gaschromatographie ; Aktivierungsanalyse und Plasma-Atom-Emissions-Spektrometrie für die Bestimmung von Elementen. Ergebnisse : Korrelation Genetik-Chemie (inorganische), Coffea arabica höher im Mangan und niedriger im Kupfer im Vergleich zu Coffea canephora. Mangan korreliert mit Magnesium und Kupfer mit Strontium-Barium-Calzium. Mangan fördert die Keimung von Sporen von Uromyces dianthi im Gegensatz zu Kupfer und schützt gegen die Kupferwirkung. Organische Kupferverbindungen sind 100 bis 1.000 mal so aktiv wie die inorganische um die Keimung zu verhindern. In der angewandten Forschung und Entwicklung belaufen sich die Kosten für das im LIQC entwickelte Verfahren und für die Mobilanlage für Koffeingewinnung aus landwirtschaftlichen Abfällen auf 500.000 Dollar, 1980, bei einer Rentabilität von 50 % und einem "payback" von 1,5 Jahren, bei einem Material das 0,65 % Koffein enthält. Die Anlage kann jedes koffeinhaltige Material bearbeiten, Kaffeefrüchtenfleisch, Kaffeebohnen, Teeabfälle, usw. 10.000 JATO. Ein Teil des entkoffeinierten Produktes wird für die Energieversorgung der Anlage verwendet.

TRESSL (R.).- Formation de substances aromatiques par la réaction de Maillard. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 22 p., 24 fig., 50 réf.

Parmi les 500 constituants volatils du café torréfié connus actuellement, plus de 60 % sont des composés hétérocycliques (parmi eux : furannes, pyrrols, thiophènes, furanones, pyrones, pyridines, pyrazines, thiazols, oxazols, etc.). Nombreux sont ceux issus de la réaction de Maillard et qui participent à l'arôme. Des voies réactionnelles importantes conduisant à la formation de constituants de l'arôme du café sont présentées et quelques unes sont étudiées à l'aide de modèles mettant en oeuvre des sucres ou des dérivés de sucre et des acides aminés.

TRESSL (R.).- Formation of aromatic substances by the Maillard reaction. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 22 p., 24 fig., 50 réf.

More than 500 volatile constituents were characterized in roasted coffee. 60 % are heterocyclic components (among them : furans, pyrroles, thiophenes, furanones, pyrones, pyridines, pyrazines, thiazoles, oxazoles, etc.). Most of these compounds are formed by Maillard reaction and are known as aroma contributing components. Some important reactions were investigated by means of model systems with sugars (sugar derivatives) and amino acids.

TRESSL (R.).- Bildung von Aromastoffen durch Maillardreaktion. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 22 p., 24 fig., 50 réf.

Von den bisher mehr als 500 flüchtigen Inhaltsstoffen des Röstkaffees sind mehr als 60 % heterozyklische Verbindungen (darunter : Furane, Pyrrole, Thiophene, Furanone, Pyrone, Pyridine, Pyrazine, Thiazole, Oxazole, etc.). Viele dieser Komponenten entstehen durch Maillardreaktion und tragen zum Aroma bei. Wesentliche Reaktionswege, die zu Kaffeearomastoffen führen, werden aufgezeigt und einige mit Hilfe von Modellumsetzungen von Zuckern bzw. Zuckerderivaten und Aminosäuren untersucht.

HERRMANN (G.), BALTES (W.).- Essais modèles de la formation d'arôme dans le café. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 9 p., 7 fig., 8 réf.

La réaction de Maillard entre des sucres réducteurs et des acides aminés est discutée quant à la formation des substances aromatiques au cours de la torréfaction du café ; les précurseurs les plus importants sont les acides aminés soufrés ; les connaissances sur l'apport des acides hydroxyaminés sont encore assez limitées.

En vue de contribuer à la connaissance de la formation de l'arôme volatil du café, sérine et thréonine seules ou en mélange avec du saccharose ont été soumises à une torréfaction. Les substances aromatiques formées ont été séparées par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire et leurs structures ont été déterminées par spectrométrie de masse.

HERRMANN (G.), BALTES (W.).- Model tests on coffee aroma formation. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 9 p., 7 fig., 8 réf.

Most aroma compounds of roast coffee arise during Maillard reaction between reducing carbohydrates and amino acids. Especially sulfur-containing amino acids are discussed as important aroma precursors whereas there is little knowledge about the reactions of hydroxy-amino-acids.

In order to make a contribution to the origin of coffee aroma, we have roasted a mixture of saccharose, threonine and serine. The volatile aroma compounds formed were separated by glass-capillary-GC and identified by MS.

HERRMANN (G.), BALTES (W.).- Modelluntersuchungen über die Aromabildung in Kaffee. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 9 p., 7 fig., 8 réf.

Für die Entstehung der Aromastoffe während der Kaffeeröstung wird die Maillardreaktion zwischen reduzierenden Zuckern und Aminosäuren diskutiert. Als Precursoren kommen hauptsächlich die schwefelhaltigen Aminosäuren in Frage, während über den Beitrag der Hydroxyaminosäuren bisher geringe Kenntnisse bestehen.

Um einen Beitrag zur Bildung des flüchtigen Kaffeearomas zu leisten, wurden Serin und Threonin allein sowie im Gemisch mit Saccharose einer Röstung unterworfen. Die freigesetzten Aromastoffe wurden glaskapillargaschromatographisch getrennt und ihre Strukturen massenspektrometrisch zugeordnet.

MOLL (H.R.), PICTET (G.A.).- La chromatographie liquide haute performance appliquée à certains constituants spécifiques du café. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 12 p., 14 fig., 3 réf.

Les profils obtenus en soumettant des extraits aqueux directs de café vert ou des infusions domestiques de café torréfié à la chromatographie liquide "haute performance" présentent des différences significatives en fonction de la variété et du degré de rôtissage. Une corrélation éventuelle entre certains événements chromatographiques et l'évaluation quantitative de caractères organoleptiques bien définis ont été recherchées.

MOLL (H.R.), PICTET (G.A.).- High performance liquid chromatography of some selected coffee constituents. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 12 p., 14 fig., 3 réf.

High performance chromatographic profiles of either aqueous extracts of green coffee beans or of "ready to drink" brews from roasted coffee reveal significant differences in respect to variety and to the degree of roasting. Relationships between selected chromatographic events and scored organoleptic properties are investigated.

HORMAN (I.), CARPENTER (R.A.), BRAMBILLA (E.), DREUX (B.).- Mise en évidence de la formation d'un complexe entre la thiamine et l'ion chlorogénate en solution aqueuse. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 8 p., 1 tabl., 5 fig., 5 réf.

Des changements dépendant de la concentration dans le spectre de résonance magnétique nucléaire de solutions aqueuses équimolaires de chlorogénate de potassium et de thiamine (vitamine B₁) sont compatibles avec la formation d'un complexe moléculaire 1 : 1. La constante d'association pour la formation du complexe est de 14 ± 1 kg/mole, soit d'un ordre de grandeur identique à celui observé pour le complexe caféine-chlorogénate mieux connu. Une structure du complexe en solution est proposée. Il semble improbable qu'un tel complexe réversible et relativement faible puisse être entièrement responsable de l'effet antithiamine attribué à l'ion chlorogénate, mais il pourrait avoir le rôle d'un intermédiaire.

HORMAN (I.), CARPENTER (R.A.), BRAMBILLA (E.), DREUX (B.).- Evidence for complex formation between thiamine and the chlorogenate ion in aqueous solution. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 8 p., 1 tabl., 5 fig., 5 réf.

Concentration dependent changes in the nuclear magnetic resonance spectrum of equimolar aqueous solutions of potassium chlorogenate and thiamine (Vitamin B1) are consistent with the formation of a 1:1 molecular complex. The association constant for complex formation is 14 ± 1 kg/mole, the same order of magnitude as that observed for the better known caffeine-chlorogenate complex. A structure for the complex in solution is proposed. It seems unlikely that such a reversible and relatively weak complex would be totally responsible for the anti-thiamine effect ascribed to the chlorogenate ion, but it may act as an intermediate.

VAN DER STEGEN (G.H.D.), VAN DUIJN (J.).- Analyse des acides chlorogéniques du café. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 6 p., 3 fig., 3 tabl., 12 réf.

Les différents composants du groupe des acides chlorogéniques du café sont identifiés à l'aide de la chromatographie liquide haute performance. Cette méthode rend possible l'analyse, dans des extraits aqueux, des composés de ce groupe, en particulier de trois isomères de l'acide caféoylquinique, de l'acide feroylquinique et de l'acide dicaféoylquinique. Par ailleurs, l'acide caféique, l'acide ferrulique, l'acide 3-p-coumarylquinique et deux acides chlorogéniques, qui semblent prédominants dans le café Robusta, sont mis en évidence.

Les différences entre les cafés Arabica, Robusta et Arabusta ont été révélées par l'analyse. Les changements ayant lieu au sein du groupe des acides chlorogéniques pendant l'étuvage, la décaféinisation et la torréfaction sont étudiées.

VAN DER STEGEN (G.H.D.), VAN DUIJN (J.).- Analysis of chlorogenic acids in coffee. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 6 p., 3 fig., 3 tabl., 12 réf.

The group of chlorogenic acids in coffee are resolved into separate components with the aid of high performance liquid chromatography. This method enables one to analyse in aqueous extracts the major components of this group e.g. three separate isomers of both caffeoylquinic acid, feroylquinic acid and dicaffeoylquinic acid. In addition are observed caffeic acid, ferulic acid, 3-p-coumarylquinic acid and two chlorogenic acids which predominantly seem to occur in Robusta coffee.

The analysis has been used to show the differences between Arabica, Robusta and Arabusta coffees. The changes occurring within the group of chlorogenic acids during steaming, decaffeination and roasting are discussed.

MAIER (H.G.).- Détermination du rendement de l'extrait de café. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 11 p., 12 fig., 2 tabl., 4 réf.

Les rapports entre les teneurs en divers constituants et le rendement à l'extraction ont été étudiés pour quatre séries de quatre extraits de café chacune (une série de café Robusta et trois séries de café Arabica). Une très mauvaise corrélation, sinon aucune, a été obtenue pour la caféine, l'acide chlorogénique, l'hydroxyméthylfurfural, les sucres libres à l'exclusion du mannose, les sucres réducteurs totaux, les substances précipitables par l'acide chlorhydrique, Na, Ca, Mg, le phosphore total et l'azote total. Les substances qui précipitent en solution froide et celles de la précipitation au cuivre selon Thaler présentent des corrélations non

linéaires (différentes pour l'Arabica généralement). Une corrélation linéaire ou presque linéaire a été obtenue pour la somme des substances à poids moléculaire élevé, le mannose, les substances directement réductrices, la conductibilité spécifique, les cendres, les cendres sulfatées et le potassium. Mais le plus souvent les variations de teneur étaient encore trop importantes pour une détermination exacte. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le potassium et les cendres sulfatées. Ils ont été contrôlés sur d'autres extraits de degré d'extraction connu. Si le café en grains vert ou torréfié d'origine n'était pas connu, l'erreur absolue était supérieure à 10 %. De plus le café torréfié utilisé et le résidu d'extraction ont été analysés pour huit extraits. La détermination du rendement à l'extraction à l'aide de la teneur en potassium présentait encore des erreurs de + 0,5 - 4,7 %, une partie du potassium restant dans le résidu d'extraction. D'autres essais sur des extraits préparés par nous laissent à penser que la durée d'extraction a plus d'influence que la température d'extraction et que l'échange d'ions joue ici un certain rôle.

MAIER (H.G.).- Determination of the extraction yield of coffee-extract. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 11 p., 12 fig., 2 tabl., 4 réf.

The dependence of numerous constituents on the extraction yield was studied with 4 series of each 4 coffee extracts (1 serie of robusta, 3 series of arabica). No correlation or a very bad one existed between extraction yield and the contents of caffeine, chlorogenic acid, hydroxymethylfurfural, the free sugars without mannose, the sum of all reducing sugars, all substances that are precipitable with hydrochloric acid, Na, Ca, Mg, total phosphorus and total nitrogen content. Non-linear correlations existed with all substances that precipitate in solutions at low temperature and with the copper precipitate according to Thaler. In most of these cases arabica coffees behaved otherwise than robusta coffee. A linear or almost linear correlation was found concerning the sum of all constituents of high molecular weight, concerning the contents of mannose, direct reducing substances, specific conductivity, ash, sulphated ash, and potassium. In the most cases the deviations of the content were too large for an exact determination. Most suitable are the determinations of potassium and sulphated ash. These were examined further with other extracts of known extraction yield. If the applied raw or roast coffee could not be analyzed, the errors could be more than 10 % absolute. Of 8 extracts the applied roast coffee and the spent grounds could be analyzed in addition. The calculation of the extraction yield out of the contents of potassium in the extracts and in the roast coffee resulted in errors between + 0,5 and + 4,7 %. This is attributed to the residues of potassium in the spent grounds. Further experiments with home made extracts suggested, that the extraction time does influence this more than the extraction temperature and that ion exchange plays a role to some extent.

MAIER (H.G.).- Zur Bestimmung der Extraktionsausbeute von Kaffee-Extrakt. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 11 p., 12 fig., 2 tabl., 4 réf.

Bei 4 Serien von je 4 Kaffee-Extrakten (1 Serie aus Robusta-, 3 Serien aus Arabica-Kaffee) wurde die Abhängigkeit der Gehalte zahlreicher Bestandteile von der Extraktionsausbeute studiert. Keine oder eine sehr schlechte Korrelation wurde erhalten bei Coffein, Chlorogensäure, Hydroxymethylfurfural, den freien Zuckern ausser Mannose, den gesamten reduzierenden Zuckern, bei durch Salzsäure fällbaren Stoffen, bei Na, Ca, Mg sowie dem Gesamtphosphor- und dem Gesamtstickstoffgehalt. Nichtlineare Korrelationen (Arabica meist andere als Robusta) zeigten die in kalter Lösung ausfallenden Stoffe und diejenigen mit der Kupferfällung nach Thaler erfassten. Eine lineare oder fast lineare Korrelation wurde bei der Summe der hochmolekularen Stoffe erhalten, ferner bei Mannose, den direkt reduzierenden Substanzen, der spezifischen Leitfähigkeit, der Asche, der Sulfatasche und beim Gehalt an Kalium. Meistens waren aber die Schwankungen der Gehalte für eine exakte Bestimmung noch immer zu gross. Am besten eignen sich die Bestimmungen von Kalium und Sulfatasche. Sie wurden an weiteren Extrakten bekannten Extraktionsgrades überprüft. War der zugrundeliegende rohe oder geröstete Bohnenkaffee nicht bekannt, so traten Fehler von über 10 % absolut auf. Von 8 Extrakten wurde zusätzlich der verwendete Röstkaffee und der Extraktionsrückstand analysiert. Die Bestimmung der Extraktionsausbeute über den Kaliumgehalt wies dann noch Fehler von + 0,5 - 4,7 % auf, weil Kalium im Extraktionsrückstand verblieben war. Weitere Versuche mit selbst hergestellten Extrakten legen nahe, dass die Extraktionszeit dies mehr beeinflusst als die Extraktionstemperatur und dass hierbei Ionenaustausch eine gewisse Rolle spielt.

LEVI (C.P.).- Recherches sur les agents de contamination du café. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 9 p., 6 tabl., 35 réf.

On évalue la présence de deux types d'agents de contamination du café : le benzo (a) pyrène et les mycotoxines. La partie concernant le benzo (a) pyrène comprend une revue des publications traitant de sa présence dans le café et une estimation de la méthodologie courante. Des résultats d'analyses réalisées dans notre laboratoire sont également présentés. Après avoir sélectionné le procédé qui semblait le plus efficace, d'après les quantités de composé pur ajouté récupérées et d'après la sensibilité de détection obtenue, treize cafés torréfiés et moulus et vingt cafés solubles ont été analysés. Des teneurs comprises entre 0,5 et 3 mcg/kg ont été décelées dans huit cafés torréfiés moulus (limite de détection : 0,5 mcg/kg) et des teneurs comprises entre 0,1 et 0,7 mcg/kg ont été décelées dans neuf cafés solubles (limite de détection : 0,1 mcg/kg).

En ce qui concerne la présence de mycotoxines dans les cafés, les résultats de l'étude de la présence, dans le café vert, de trois mycotoxines (aflatoxine, ochratoxine et stérigmatocystine) sont présentés. Les analyses d'un très grand nombre d'échantillons ont montré un nombre très réduit de cas de faibles taux de toxines, ce qui indique que la probabilité de trouver ces mycotoxines dans le café boisson est également très faible.

LEVI (C.P.).- Investigations of contaminants in coffee. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 9 p., 6 tabl., 35 réf.

An assessment is made of the occurrence of two types of contaminants in coffee : benzo (a) pyrene and mycotoxins. Included in the discussion for benzo (a) pyrene is a review of literature reports of its occurrence in coffee and an evaluation of the current methodology. Also included are results of analyses which were performed in our laboratory. After selecting the procedure which appeared to be the most efficient as judged by recoveries of added pure compound and limits of detection achieved, thirteen roasted and ground and twenty soluble coffees were analyzed. Levels ranging from 0.5 to 3 mcg/kg were detected in eight roasted and ground coffees (limit of detection 0.5 mcg/kg), and levels from 0.1 to 0.7 mcg/kg were detected in nine soluble coffees (limit of detection 0.1 mcg/kg).

With respect to mycotoxin occurrences in coffees, the results of surveys of green coffee for the presence of three mycotoxins are presented (i.e., aflatoxin, ochratoxin and sterigmatocystin). Analyses of a large number of samples showed an extremely low incidence of low levels of toxins, indicating that the probability of finding these mycotoxins in coffee beverage is also very low.

BOTHE (H.), CAMMENGA (H.K.).- Propriétés physiques et comportement de la caféine et de ses solutions aqueuses. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 10 p., 2 tabl., 5 fig., 22 réf.

De la caféine de grande pureté a été préparée selon diverses méthodes. L'analyse thermique différentielle quantitative est une méthode pratique et suffisamment précise pour la détermination de la pureté de la caféine. De nombreuses propriétés physico-chimiques - entre autres densité, enthalpies de modification et de fusion, pression de vapeur, capacité calorifique - de la caféine anhydre (pouvant exister sous deux formes) ont été déterminées. L'hydrate de caféine s'est révélé être un hydrate 4/5. Ses densité, point de stabilité et enthalpie ainsi que son énergie d'activation pour la déshydratation ont été mesurés. Une équation pour le calcul de la solubilité dans l'eau entre 0 et 100°C a été obtenue à partir des mesures effectuées. L'étude se termine par quelques remarques sur le comportement de la caféine et de l'hydrate de caféine au cours de la cristallisation.

BOTHE (H.), CAMMENGA (H.K.).- Physical properties and behaviour of caffeine and its aqueous solutions. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 10 p., 2 tabl., 5 fig., 22 réf.

By different methods highly purified caffeine has been obtained. It has been shown that quant. DTA is a rapid and accurate method to determine caffeine purity. Various physico-chemical properties of anhydrous caffeine (which exhibits two crystal modifications) have been determined, inter alia density, enthalpies of solid state transformation and fusion, vapour pressure and heat capacity. Caffeine hydrate has been shown to be a 4/5-hydrate. Density, stability point and enthalpy and activation energy of dehydration have been determined. The water solubility has been measured and a formula is given for the range 0...100°C. Finally, some remarks are made concerning the crystallization behaviour of caffeine and its hydrate.

BOTHE (H.), CAMMENGA (H.K.).- Physikalische Eigenschaften und Verhalten von Coffein und seiner wasserigen Lösung. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 10 p., 2 tabl., 5 fig., 22 réf.

Hochohres Coffein wurde nach verschiedenen Methoden hergestellt. Quant. DTA ist eine ausreichend genaue und bequeme Methode zur Reinheitsbestimmung von Coffein. Von wasserfreiem Coffein (das in zwei Modifikationen auftreten kann) wurden zahlreiche phys.-chem. Eigenschaften bestimmt: u.a. Dichte, die Enthalpien für Modifikationsumwandlung und Schmelzen, Dampfdruck und Wärmekapazität. Coffeinhydrat erwies sich als ein 4/5-Hydrat. Von ihm wurden Dichte, Stabilitätspunkt und Enthalpie sowie Aktivierungsenergie für die Dehydratisierung gemessen. Aufgrund eigener Messungen wird eine Gleichung für die Berechnung der Wasserlöslichkeit im Bereich 0...100°C angegeben. Die Arbeit schliesst mit einigen Bemerkungen über das Kristallisationsverhalten von Coffein und Coffeinhydrat.

KOENIG (W.A.), RAHN (W.), VETTER (R.).- Identification et détermination de constituants émétiques importants dans le café torréfié. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 5 p., 2 fig., 1 tabl., 8 réf.

Au cours du traitement du café vert par le procédé KVV il apparaît que le condensat après extraction au diéthyléther obtenu est constitué principalement de produits de dégradation des acides chlorogéniques mis en évidence par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse. Les mêmes méthodes montrent qu'après torréfaction, la teneur en substances émétiques du café traité est nettement réduite par rapport à celle du café non traité.

KOENIG (W.A.), RAHN (W.), VETTER (R.).- Identification and determination of important emetic substances in roasted coffee. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 5 p., 2 fig., 1 tabl., 8 réf.

In the condensate of green coffee, treated in the KVV-process, after extraction with diethyl ether, degradation products of chlorogenic acids can be identified by gas chromatography and mass spectrometry. By the same techniques it can be shown, that after roasting the concentration of emetic substances is significantly reduced in treated coffee.

KOENIG (W.A.), RAHN (W.), VETTER (R.).- Identifizierung und quantifizierung emetisch wirksamer Bestandteile in Röstkaffee. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 5 p., 2 fig., 1 tabl., 8 réf.

In dem bei der Bearbeitung von Rohkaffee nach dem KVV-Verfahren auftretenden Kondensat lassen sich nach Extraktion mit Diethylether als Hauptkomponenten Abbauprodukte der Chlorogensäuren durch Gaschromatographie und Massenspektrometrie nachweisen. Mit den selben Methoden lässt sich zeigen, dass nach der Röstung die Konzentration an emetisch wirksamen Substanzen bei bearbeitetem Kaffee gegenüber unbearbeitetem Kaffee deutlich reduziert ist.

WURZIGER (J.), DREWS (R.), SUCHE (B.).- Indices chimiques pour compléter l'estimation de la qualité des cafés vert et torréfié. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 8 p., 6 tabl., 1 réf.

Présentation d'études complémentaires à l'épreuve à la tasse, qui peuvent faciliter la préparation de mélanges de café de qualité comparable. Les essais ont été effectués sur les extraits à l'éther de pétrole et se limitent à l'obtention de la teneur en huile de café, à la réaction colorée iodure de potassium/acide acétique et à la différence entre l'indice de coloration ammoniacal avant et après lavage de l'extrait à l'éther de pétrole (Différence AFZ). Les possibilités offertes sont explicitées par des exemples avec des cafés Arabica, des cafés torréfiés du commerce, des cafés Robusta et des mélanges d'Arabica et de Robusta.

WURZIGER (J.), DREWS (R.), SUCHE (B.).- Chemical indexes completing the estimation of green and roasted coffee quality. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 8 p., 6 tabl., 1 réf.

Results are disclosed which can facilitate as a supplement to the coffee-tasting the production of coffee-mixtures comparably in quality. The studies are done with petrol-extracts and only contain the estimation of the coffee oil content, the potassium iodide/acetic acid colored reaction and the differences of alkali-colour-numbers before and after the washing of the petrol-extracts (AFZ-difference). Examples are discussed using Arabica beans, commercial grade roasted coffee, Robusta beans and mixtures of Arabica and Robusta beans.

WURZIGER (J.), DREWS (R.), SUCHE (B.).- Chemische Kennzahlen zur ergänzenden Qualitätsbeurteilung von Roh- und Röstkaffee. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 8 p., 6 tabl., 1 réf.

Es wird über Untersuchungen berichtet, die als Ergänzung zur Tassenprobe die Herstellung von Kaffeemischungen vergleichbarer Qualität erleichtern können. Die Untersuchungen werden an Petrolätherauszügen vorgenommen und erstrecken sich auf die Ermittlung des Kaffeeölgehaltes, die Kaliumjodid/Eisessig-Farbreaktion und die Differenz zwischen der Alkalifarbzahl vor und nach dem Waschen des Petrolätherauszuges (AFZ-Differenz). An Beispielen für Arabica-Kaffees, handelsübliche Röstkaffees sowie Robusta-Kaffees und Mischungen aus Arabica und Robusta werden die Möglichkeiten aufgezeigt und erläutert.

SLOMAN (K.C.).- Méthodologie de la caféine : méthode semi-automatique pour le dosage de la caféine dans les cafés verts et transformés. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 10 p., 4 tabl., 1 sch.

Une méthode semi-automatique pour l'analyse de la caféine dans des échantillons de cafés verts et de cafés torréfiés emploie un matériel d'extraction et un Auto-Analyseur (R) (Technicon) pour le dosage de la caféine dans les extraits. La méthode a été utilisée pour le contrôle de la qualité de la production du café et pour le contrôle des cafés verts, torréfiés et solubles, qu'ils soient décaféinés ou non.

La préparation des échantillons à analyser dépend de leurs caractéristiques. Pour la détection par Auto-Analyseur, seuls les réactifs utilisés pour les différents échantillons varient, le matériel restant inchangé. La préparation d'un échantillon peut prendre de trente minutes à une heure, l'Auto-Analyseur peut fonctionner au rythme de trente analyses à l'heure.

Les coefficients de variation varient de $\pm 3,5\%$ pour le café vert à $\pm 7,2\%$ pour le café vert décaféiné. Les valeurs obtenues pour la caféine concordent bien avec les résultats donnés par les méthodes standards de l'AOAC.

SLOMAN (K.C.).- Caffeine methodology : semi-automatic method for the determination of caffeine in green and processed coffees. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 10 p., 4 tabl., 1 sch.

A semi-automatic method for the analysis of green coffee samples and processed coffees for caffeine uses off instrument extraction and an Auto-Analyzer^(R) (Technicon) for determination of caffeine in the extract. The method has been used for Quality Control for coffee production and for the examination of green coffees, roasted coffees and soluble coffees, both caffeinated and decaffeinated.

Sample preparation depends upon the kind of sample to be analyzed. Auto-Analyzer detection varies only in the reagents used for the different samples, the manifold system is not changed. Sample preparation may take from thirty minutes to one hour, the Auto-Analyzer can be run at a rate of 30/hr.

Coefficients of Variation range from $\pm 3.5\%$ for green coffee to $\pm 7.2\%$ for decaffeinated green coffee. The caffeine values obtained agree well with the results of the AOAC standard methods.

PFRUNDER (R.), WANNER (H.), FRISCHKNECHT (P.M.), BAUMANN (T.W.).- Tentative de localisation de la caféine dans la cellule d'après sa cinétique de lessivage. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 7 p., 8 fig., 8 réf.

L'extractibilité de la caféine par l'eau à partir de disques foliaires vivants a été étudiée en fonction de la durée de l'extraction, de la lumière et de la température. Jusqu'à 60 % de la caféine des feuilles ont pu être récupérés par rinçage dans des expériences de longue durée se prolongeant plusieurs jours, la valeur de 50 % étant atteinte après 8 à 10 h. La lumière n'a pas d'influence sur la vitesse de lessivage, mais l'élévation de la température accélère plus la libération de la caféine qu'on ne pouvait l'escompter dans le cas d'une diffusion passive.

L'analyse de la cinétique du lessivage après apport de caféine marquée au ¹⁴C permet de conclure que la caféine peut être présente dans trois pools différents, soit un pool de biosynthèse et deux pools de stockage. La caféine du pool de biosynthèse est lessivée par l'eau, mais celle des pools de stockage ne peut être extraite tant que le tissu est viable. La différence entre les deux pools de stockage dépend de la capacité d'échange de la caféine. Dans un des pools de stockage, la caféine ne s'échange pas avec la caféine marquée au ¹⁴C appliquée.

Ces résultats, ainsi que les observations faites sur les protoplastes de l'endosperme du café, nous permettent de présenter un schéma de localisation de la caféine dans la cellule.

PFRUNDER (R.), WANNER (H.), FRISCHKNECHT (P.M.), BAUMANN (T.W.).- An attempt to localize caffeine in the cell by its washout kinetics. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 7 p., 8 fig., 8 réf.

The extractability of caffeine by water from living leaf discs was studied as regards time, light and temperature. Up to 60 % of the leaf caffeine could be washed out in long term experiments lasting several days, the value of 50 % being reached after 8 to 10 hours. Light had no influence on the washout speed, but increase of temperature accelerated caffeine efflux more than would be expected in case of passive diffusion.

Analysis of the washout kinetics after feeding of ¹⁴C-caffeine allows the conclusion that caffeine must be present in three different pools, i.e. one "biosynthesis pool" and two "storage pools". The caffeine in the biosynthesis pool is washed out by water, but that in the storage pools cannot be extracted as long as the tissue is viable. The difference between the two storage pools consists in the exchangeability of caffeine. In one of the storage pools caffeine does not exchange with applied ¹⁴C-caffeine.

These results together with observations made with coffee endosperm protoplasts permit us to present a scheme of caffeine localization in the cell.

PFRUNDER (R.), WANNER (H.), FRISCHKNECHT (P.M.), BAUMANN (T.W.).- Ein Versuch, Coffein mit Hilfe seiner Auswaschkinetik in der Zelle zu lokalisieren. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 7 p., 8 fig., 8 réf.

Die Extrahierbarkeit des Coffeins aus lebenden Blattscheiben mittels Wasser wurde in Abhängigkeit von Zeit, Licht und Temperatur studiert. Es konnten bis zu 60 % des Blattcoffeins in Langzeit-Experimenten, die mehrere Tage dauerten, ausgewaschen werden, wobei der Wert von 50 % nach 8 bis 10 Stunden erreicht wurde. Licht hatte keinen Einfluss auf die Auswaschgeschwindigkeit, hingegen beschleunigte der Temperaturanstieg den Coffein-Efflux mehr, als bei passiver Diffusion zu erwarten wäre.

Die Analyse der Auswaschkinetiken nach Fütterung von ¹⁴C-Coffein gestattet den Schluss, dass Coffein in drei verschiedenen zellulären Pools vorliegen muss, das sind ein "Biosynthese-Pool" und zwei "Einlagerungspools". Das Coffein im Biosynthese-Pool wird durch Wasser ausgewaschen, während jenes in den Einlagerungspools mit dieser Methode nicht extrahiert werden kann, solange das Gewebe lebensfähig ist. Der Unterschied zwischen den beiden Einlagerungspools besteht in der Austauschbarkeit des Coffeins. In einem der Einlagerungspools tauscht Coffein gegen zugegebenes ¹⁴C-Coffein nicht aus.

Diese Resultate zusammen mit Beobachtungen an Kaffee-Endosperm-Protoplasten erlauben uns, ein Schema über die Lokalisation des Coffeins in der Zelle zu präsentieren.

JOUANJAN (F.).- Transport maritime du café vert et conteneurisation. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 12 p.

L'évolution du conditionnement dans le transport maritime du café vert s'est faite très lentement à travers les siècles.

Les risques du transport par mer peuvent se résumer ainsi :

- . Mouilles et moisissures,
- . Echauffement de la masse,
- . Décoloration des grains,
- . Contaminations diverses.

La conteneurisation est devenue un phénomène irréversible pour les échanges maritimes internationaux. La conteneurisation des cafés tend aussi à se généraliser après la réalisation de nombreux essais et recherches.

De nombreux problèmes ont dû être résolus. L'utilisation d'équipements spéciaux et sophistiqués ou de produits absorbants additionnels est peu à peu abandonnée.

Le système dit "Passif" apporte une solution très positive au transport du café en conteneurs.

La synthèse des résultats des essais :

- . Le café marchandise hygroscopique.
- . Une modification sensible de la teneur en eau des grains peut entraîner des conséquences pour la conservation et la qualité.
- . Trois facteurs importants doivent être pris en considération : l'humidité relative environnante, la température ambiante, la teneur en eau du café vert.
- . Le processus des échanges thermiques au sein d'une masse de café.
- . La migration de la vapeur d'eau dans la masse.
- . Le phénomène de la condensation.
- . Les avantages présentés par les cales d'un navire porte-conteneurs.
- . Le transport en conteneur fermé non ventilé.

Les résultats du transport vont dépendre de plusieurs facteurs :

- . du type de café,
- . de l'état du café avant et lors de son embarquement,
- . des zones géographiques de trafic et des conditions climatiques durant ce transport,
- . des conditions d'emmagasiner, de stockage et de transports terrestres,
- . prospection d'avenir.

JOUANJAN (F.).- Sea transport of green coffee and containerisation. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 12 p.

The packaging of green coffee for sea transport has changed very slowly over the centuries. The risks of transport by sea can be summarized as follows :

- . damage by water or mould,
- . development of heat in bean mass,
- . discolouration of beans,
- . various types of contamination.

Containerisation has become an irreversible process in international trade. The containerisation of coffee is also becoming generalised after numerous tests and much research work had been carried out.

Many problems had to be solved. The use of special, sophisticated equipment and addition of absorbent products are gradually being abandoned.

The so-called "passive" system provides a very good solution to the problem of transport of coffee in containers.

The following is a summary of the test results that have been obtained :

- . commercial raw coffee is hygroscopic,
- . any appreciable change in the water content of the beans can have an effect on conservation and quality,
- . three important factors must be taken into account : the surrounding relative humidity, the ambient temperature and the water content of the green coffee,
- . the heat exchange process within the mass of coffee beans,
- . the migration of water vapour in the mass,
- . the condensation process,
- . the advantages provided by the holds of a container carrying ship,
- . transport in a non-ventilated, closed container.

The results of transporting the coffee will depend on several factors :

- . the type of coffee,
- . the condition of the coffee before shipping and while on board ship,
- . the traffic geographical zones and the climatic conditions during the journey,
- . the warehousing, storage and land transport conditions,
- . the future prospects.

STIRLING (H.).- Recherche sur le stockage du café Arabica au Kenya. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 12 p., 7 fig.

Des recherches sur le stockage du café ont été entreprises au Kenya de 1971 à 1975. Les études fondamentales en laboratoire ont consisté à soumettre un café de haute qualité à une gamme étendue de conditions physiques, identiques à celles régnant dans les différentes parties du pays. Ces cafés étaient placés dans de petits silos et des échantillons régulièrement prélevés pour en estimer la perte de qualité. Des tendances spécifiques ont été trouvées.

Par ailleurs, on a contrôlé les microclimats d'entrepôts déjà construits, dont on a réalisé des maquettes que l'on a mises à l'épreuve afin d'en identifier les paramètres de construction essentiels. Ceci conduisit à effectuer des modifications dans un entrepôt grandeur nature qui fût, à son tour, soumis à un contrôle de façon à estimer l'efficacité des améliorations ; celles-ci se sont avérées satisfaisantes.

Des essais ont également été menés pour montrer qu'un système de contrôle automatique pouvait être utilisé avec succès pour la ventilation d'un entrepôt de café en sac ou d'un silo, si les qualités appropriées de l'air ambiant sont exploitées.

Les résultats de ces divers travaux de recherche ont confirmé un certain nombre de théories qui n'avaient été que soupçonnées jusqu'alors et ont permis à l'industrie caféière du Kenya de poursuivre avec confiance l'accroissement de ses installations de stockage. Les caractéristiques de ces nouvelles installations, en particulier celles permettant de limiter la perte de qualité et les dommages, sont décrites.

STIRLING (H.).- Storage research on Kenya Arabica coffee. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 12 p., 7 fig.

Investigations into coffee storage were carried out in Kenya from 1971 to 1975. Fundamental research in the laboratory consisted of subjecting high quality coffee to a wide range of physical conditions, similar to those found in different parts of the country. These coffees were contained in small silos, and were sampled regularly for quality loss. Specific trends were found.

Simultaneously, the micro-climates of existing warehouses were monitored and scale model stores were built and evaluated, in an attempt to identify essential design parameters. This resulted in modifications to a full size warehouse, which in turn was monitored to measure the effectiveness of the improvements ; these were found to be satisfactory.

Experiments were also carried out to prove that an automatic control system can successfully be used to ventilate coffee in a bag warehouse, or in a silo, using the appropriate quality of ambient air.

The results of these various investigations confirmed a number of theories which had hitherto only been suspected, and enabled the Kenya Coffee Industry to proceed with confidence in expanding its storage facilities. The new facilities are described, with particular emphasis on features for limiting deterioration and quality loss.

MAUGHAN (W.S.), MILO (S.), ROARZI (L.).- Appareillage pour l'analyse des grains de café. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 10 p., 5 fig.

Dans cette étude sont décrits les aspects du logiciel et du matériel d'un système avec ordinateur utilisé pour l'étude des caractéristiques colorimétriques des grains de café et pour leur analyse statistique ultérieure.

Une attention toute particulière est donnée à la liaison existant entre l'ordinateur et l'appareil qui mesure la couleur des grains. Les procédés grâce auxquels les données sont obtenues et le traitement ultérieur de celles-ci pour l'obtention de la matrice de covariance pour les paramètres de transformation en fonction des composantes principales sont présentés.

MAUGHAN (W.S.), MILO (S.), ROARZI (L.).- Instrumentation system for the analysis of coffee beans. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 10 p., 5 fig.

This work describes the hardware and software aspects of a computerized system for obtaining data on the colourometric characteristics of coffee beans, and for their subsequent statistical analysis.

Particular attention will be paid to the connection between a computer and the instrumentation which measures the colour of the beans. The data acquisition procedures and their subsequent elaboration for the determining of the covariance matrix for the transformation parameters according to the principal components will be discussed.

MILO (S.).- Reconnaissance des caractéristiques au cours du triage des grains de café vert. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 6 p.

Plusieurs méthodes permettant la reconnaissance de caractéristiques ont été proposées au cours de ces dernières années, ce qui, aujourd'hui, est d'un intérêt considérable dans diverses applications techniques.

Cette étude traite de l'application d'une méthode de reconnaissance de caractères qui permet la sélection des grains de café. Le problème ayant été présenté, la validité des différentes

méthodes proposées est analysée. La méthode qui semble, à l'heure actuelle, la plus appropriée à nos fins est présentée de façon détaillée et les différentes étapes du procédé sont clairement illustrées à l'aide d'exemples.

MILO (S.).- Pattern recognition in sorting green coffee beans. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 6 p.

In recent years several methods for the recognition of patterns, which today, is of considerable interest in various technical applications, have been proposed.

This work is concerned with the application of a method of pattern recognition to solve the problem of selecting coffee beans. After presenting the problem, the validity of the various methods proposed will be analyzed. The method which, at the moment, seems the most appropriate for our purpose will be dealt with in detail and the various steps of the process will be clearly illustrated with appropriate examples.

CARTER (H.J.).- Triage du café par excitation aux UV. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 8 p., 1 tabl., 6 fig., 2 réf.

Les principales caractéristiques et fonctions de la trieuse colorimétrique par excitation aux UV et une base mathématique pour la spécification de l'efficacité du triage sont présentées.

Les spectres d'émission aux UV sont donnés pour différents grains de café, aussi bien pour des grains appartenant aux catégories rejetées que pour des grains faisant partie des catégories acceptées, d'échantillons frais ou vieux. A partir d'une simulation sur ordinateur du triage des grains par fluorescence, un algorithme du triage par la machine fut établi pour effectuer le triage par fluorescence de différents échantillons de café.

Des essais sont décrits montrant la corrélation entre la fluorescence des grains de café et les défauts visibles des grains. Des résultats d'épreuves de dégustation de plusieurs Arabica provenant des principales régions de culture caféière effectuées sur des boissons obtenues avec des grains triés visuellement ou par fluorescence aux UV montrent que le triage du café vert aux UV n'améliore pas la qualité de la tasse.

CARTER (H.J.).- Coffee sorting with UV excitation. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 8 p., 1 tabl., 6 fig., 2 réf.

The major features and functions in a UV excited color sorter are described, and a mathematical basis for specifying sorting efficiency is given.

UV emission spectra are shown for various coffee beans, including reject-class beans and accept-class beans from fresh and aged samples. From computer simulation of fluorescent bean sorting, a machine sorting algorithm was devised to enable fluorescent sorting of various coffee samples.

Experiments are described showing the correlation between coffee bean fluorescence and visual bean defects. Results of cup tests of several arabicas from major coffee growing areas with beans sorted both visually and by UV fluorescence show that UV sorting of green coffee will not improve the cup.

VINCENT (J.-C.).- Amélioration dans le traitement des récoltes de café (Application au café Arabusta). IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 10 p., 2 fig.

L'Arabusta, hybride interspécifique du Robusta et de l'Arabica, présente des caractéristiques qui obligent à envisager la voie humide comme seul moyen de traitement des récoltes.

Peu d'améliorations technologiques ont été mises au point jusqu'à ces dernières années ; ce pendant un effort dans l'amélioration du matériel commence à se faire jour. Cet article passe en revue les apports technologiques récents dans les différentes opérations de traitement : lavage des cerises ; dépulpages ; élimination par densité, fermentation et lavage des grains en parche ; séchage ; départage, classement densimétrique, triage colorimétrique ; utilisation des sous-produits (pulpes, parche).

VINCENT (J.-C.), JACQUET (M.).- Improvement in the process method of coffee crop (application to Arabusta coffee). IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 10 p., 2 fig.

Arabusta coffee, an interspecific hybrid of Robusta and Arabica coffee, presents some characteristics, which make it necessary to consider the wet process as the only method of treating the harvested cherries.

Few technological improvements have been developed until the last few years ; however, an effort in improvement methods has just started. This paper gives a review of recent works in the different operations of the process ; washing of the cherries, depulping, separation by density, fermentation and washing of the parchment coffee, drying, hulling, classification by density, colour sorting, and utilization of waste products.

JUDSON KING (C.).- Utilité des principes de génie chimique dans le traitement industriel du café. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 14 p., 7 fig., 21 réf.

Une compréhension approfondie de la mécanique fondamentale des divers aspects du traitement industriel du café devrait conduire à une meilleure qualité du produit et à des techniques améliorées. Ceci est particulièrement vrai pour les étapes qui sont basées sur un transfert sélectif. Celles-ci comprennent (1) l'extraction, étape au cours de laquelle il est important de renforcer la récupération des constituants les plus intéressants au dépens des composés indésirables, (2) la concentration et la déshydratation pendant lesquelles une élimination sélective de l'eau et une rétention équilibrée et réelle des arômes volatils sont recherchées, et (3) la décaféinisation où il est nécessaire d'éliminer la caféine sans perdre les constituants de la saveur et sans contaminer le produit. La différenciation des limites d'équilibre et de teneur et l'identification des étapes limitant ces teneurs et les mécanismes de transfert sont des chemins qui assurent l'amélioration de la sélectivité.

Trois exemples spécifiques tirés des recherches propres de l'auteur sont présentés avec plus de détails.

(1) La rétention des substances volatiles en atomisation. Les mécanismes de perte dans les différentes parties d'un atomiseur ont été décelés en fonction des importances relatives accordées au contrôle des phases liquide et gazeuse.

(2) La morphologie des particules en atomisation. La tendance à l'expansion des particules est liée à la formation du noyau et à la croissance des bulles de gaz désorbé.

(3) La rétention des composés volatils en lyophilisation. Le facteur limitant le taux de rétention, sous de bonnes conditions techniques, est la désorption des composés volatils à partir de la trame interstitielle du concentré après le recul du front de glace et avant le séchage de la trame. Les conséquences mécaniques d'une phase huileuse en suspension ont été identifiées.

JUDSON KING (C.).- The utility of chemical engineering principles in coffee-processing technology. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 14 p., 7 fig., 21 réf.

Increased fundamental mechanistic understanding of various aspects of coffee processing should lead to better product quality and improved processes. This is particularly true for those steps which are predicated upon selective transport. These include (1) extraction, where it is important to enhance recovery of the more appealing constituents at the expense of

undesirable ones, (2) concentration and dehydration, where selective removal of water and effective and balanced retention of volatile aromas are desired, and (3) decaffeination, where removal of caffeine is needed without loss of flavor attributes and without contamination of the product. Differentiation between rate and equilibrium limits and identification of rate-limiting steps and mechanisms of transport are paths which lead to improved selectivity.

Three specific examples are drawn from the author's own research and are explored in more detail :

(1) Volatiles retention in spray drying. Mechanisms of loss in different regions of a dryer have been identified, along with the relative extents of gas- and liquid-phase control.

(2) Particle morphology in spray drying. Particle expansion tendencies relate to nucleation and growth of bubbles of desorbed gas.

(3) Volatiles retention in freeze drying. The rate-limiting factor under good processing conditions is desorption of volatiles from interstitial concentrate webs, after the receding ice front passes and before the webs dry. The mechanistic effect of a suspended oil phase has been identified.

FOSEBØL (P.), PETERSEN (E.E.).- Rétention de la flaveur au cours de la lyophilisation du café. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 16 p., 4 tabl., 4 fig., 22 réf.

La rétention des composés volatils au cours de la congélation et de la lyophilisation a été étudiée par plusieurs auteurs. Ces travaux sont caractérisés par le fait que des systèmes types simples et/ou des méthodes objectives d'analyse ont été appliqués.

Les auteurs de cette communication pensent que les résultats ne permettent pas l'estimation des propriétés organoleptiques de systèmes complexes tels que les extraits de café.

L'extrait de café a été obtenu selon les méthodes industrielles habituellement utilisées. L'extrait écumé et prégelé a été congelé en couche de grande épaisseur (environ 20 mm) et séché suivant un cycle de séchage normal (environ 6 h) ou court (0,5 h). Dans des essais similaires, l'extrait écumé a été congelé en couche de faible épaisseur (environ 2,5 mm) et séché selon les mêmes cycles de séchage. La pression de séchage a été fixée de telle façon que tous les échantillons aient la même couleur marron foncé moyen.

Les rétentions des composés volatils et de la flaveur ont été mesurées en partie par chromatographie en phase gazeuse, par injection directe d'échantillons de l'extrait, et en partie par un jury de dégustation.

Lorsqu'on ne prend en considération qu'un nombre relativement restreint de composés volatils, les valeurs obtenues par chromatographie en phase gazeuse corroborent les résultats des autres auteurs. La rétention des composés volatils augmente si la vitesse de congélation et la température du front de glace décroissent et si la vitesse de séchage croît. Cependant, si un plus grand nombre de constituants sont pris en compte, la différence de rétention des composés volatils devient insignifiante.

Les évaluations des caractéristiques organoleptiques correspondantes ne montrent pas de différence statistiquement significative entre les rétentions de flaveur dans les différents procédés comparés.

Les auteurs concluent donc, que les mesures par chromatographie en phase gazeuse ne sont pas aptes à révéler l'influence de la variation des paramètres caractérisant les procédés sur la rétention de la flaveur au cours de la congélation et de la lyophilisation des extraits de café. En outre, ils ne trouvent pas de différences organoleptiques entre les produits obtenus par les procédés industriels de congélation et de lyophilisation normalement utilisés.

FOSEBØL (P.), PETERSEN (E.E.).- Flavour retention during freeze-drying of coffee. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 16 p., 4 tabl., 4 fig., 22 réf.

The volatile retention during freezing and freeze-drying has been investigated by several authors. These works are characterized by the fact that simple model systems and/or objective methods of analysis have been applied.

The present authors are of the opinion that such results are inadequate for judging the organoleptic properties of complex systems like coffee extracts.

Coffee extract has been processed according to normally used industrial methods. Foamed and prefrozen extract has been frozen in great layer thickness (about 20 mm) and dried according to a normal (about 6 hrs) and a short (0.5 hrs) drying cycle. In similar tests, foamed extract has been frozen in small layer thickness (about 2.5 mm) and dried according to the same drying cycles. The drying pressure has been fixed in such a way that all samples have the same medium dark brown colour.

Volatile and flavour retention have been measured partly by a gaschromatograph, injecting extract samples directly, and partly by an expert panel.

When taking only a relatively small number of volatiles into consideration, the gaschromatographic measurements confirmed the findings of other authors. The volatile retention increased if the freezing rate and ice front temperature decreased and if the drying rate increased. However, when considering a larger number of components, the difference in volatile retention became insignificant.

The corresponding organoleptic measurements showed no statistically significant difference between the flavour retention of the different processes compared.

The authors, therefore, conclude that gaschromatographic measurements usually are inadequate for describing the influence of variation of process parameters on the flavour retention during freezing and freeze-drying of coffee extract. Further, we find no organoleptic difference between normally used industrial freezing and freeze-drying processes.

EHLERS (G.M.).- Applications possibles des enzymes dans le traitement industriel du café. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 5 p., 3 fig., 7 réf.

A l'heure actuelle, l'emploi des enzymes microbiennes dans le traitement industriel du café est encore très limité ; les possibilités potentielles sont cependant nombreuses.

Un résumé de certains brevets et références bibliographiques concernant le sujet est présenté.

L'emploi de pectinases pour enlever le mucilage des grains de café dépulvés est décrit avec plus de détail.

L'application de la galactomannanase pour la production de café soluble est également présentée. Cette enzyme réduit la viscosité de l'extrait de café et permet ainsi l'obtention avec les évaporateurs traditionnels, avant l'atomisation ou la lyophilisation, d'un extrait ayant une plus forte teneur en extraits secs.

Les caractéristiques de l'enzyme sont données ainsi qu'un graphique montrant la réduction de la viscosité observée, en laboratoire, dans une solution de café.

Etant donné l'accroissement du coût de l'énergie, l'application des enzymes d'une part est économiquement attrayante, d'autre part accroît la capacité des équipements d'atomisation et de lyophilisation.

EHLERS (G.M.).- Possible applications of enzymes in coffee processing. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 5 p., 3 fig., 7 réf.

At present the use of microbial enzymes for coffee processing is still very limited ; however, the potential possibilities are numerous.

A summary of some of the existing literature and patents on the subject is given.

The use of pectinases for the removal of mucilage from the depulped coffee bean is described in more detail.

Finally the application of galactomannanase for the production of instant coffee is discussed. This enzyme reduces the viscosity of coffee extract, and thus allows the extract to be concentrated to a higher solids content by traditional evaporators before freeze- or spraydrying.

A description of the enzyme characteristics is given together with a graph demonstrating the viscosity reduction found in a coffee solution in our laboratories.

The increased cost of energy makes application of the enzyme economically attractive, and at the same time increases the capacity of the existing freeze- and spraydrying equipment.

CLINTON (W.P.).- Evaluations de cafés emmagasinés par des experts et des consommateurs. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 13 p., 11 fig.

D'après les résultats obtenus, on peut conclure que :

Les consommateurs de café torréfié et moulu, emballé avec une teneur en eau de 5 % ou moins et sous un vide d'au moins 70 cm de mercure (voisin d'une pression barométrique de 76,2 cm de mercure) n'ont pas de préférence significative entre le produit acheté le plus tôt possible après la date de fabrication et le produit qui a été entreposé pendant deux ans après cette date.

Les consommateurs de café soluble aggloméré, emballé avec une teneur en eau de 5 % ou moins et sous une concentration en O₂ de 4 % ou moins, n'ont pas de préférence significative entre le produit acheté le plus tôt possible après la date de fabrication et le produit qui a été entreposé pendant un an et demi après cette date.

Les consommateurs de café lyophilisé, emballé avec une teneur en eau de 3,5 % ou moins et sous une concentration en O₂ de 3,5 % ou moins n'ont pas de préférence significative entre le produit acheté le plus tôt possible après la date de fabrication et le produit qui a été entreposé pendant un an après cette date.

CLINTON (W.P.).- Consumer and expert evaluations of stored coffee products. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 13 p., 11 fig.

On the basis of these data, it is concluded that :

Consumers of roasted and ground coffee, packed at a moisture content of 5 % or less and under a vacuum of at least 28 inches mercury (relative to a 30" mercury barometric pressure), show no significant difference in preference between the product purchased at the earliest date after production and the product that has been in storage for 2 years after production.

Consumers of Agglomerated Instant Coffee, packed with a moisture content of 5 % or less and an O₂ level of 4 % or less, show no significant difference in preference between the product purchased at the earliest date after production and the product that has been stored for 1 1/2 years after production.

Consumers of Freeze Dried Coffee, packed with a moisture content of 3.5 % or less and an O₂ level of 3.5 % or less show no significant difference in preference between the product purchased at the earliest date after production and the product that has been in storage for 1 year after production.

VOILLEY (A.), SAUVAGEOT (F.), PIERRET (P.).- Evaluation des qualités d'une tasse de café : effet de la température de l'eau d'extraction. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 8 p., 5 fig., 3 tabl., 8 réf.

Le café-boisson type "expresso" est préparé à l'aide d'une machine expérimentale permettant de fixer la valeur des paramètres suivants : durée de mouillage (entre 7 secondes et 6 minutes), pression d'injection de l'eau sur la mouture (de 0,4 à 2 bars) et température de l'eau : de 70°C à 120°C, gamme retenue pour le présent travail, les autres paramètres étant maintenus à une valeur constante. L'ensemble du système est sous pression, ce qui permet des extractions supérieures à 100°C sans provoquer l'ébullition du café-boisson.

Les échantillons obtenus à différentes températures (70, 80, 90, 100, 110 et 120°C) sont évalués par rapport à un café témoin préparé à 95°C au moyen d'une épreuve par paire portant sur les propriétés suivantes : intensité de l'amertume, de l'acidité, du parfum et de l'arôme,

qualité du parfum et de l'arôme. Les échantillons sont évalués 30 minutes au plus après leur préparation, à 55°C et en lumière rouge. Pour la couleur, les 7 échantillons sont classés simultanément en lumière du jour, du moins coloré au plus coloré.

Le groupe d'évaluation est formé de 5 personnes sélectionnées à l'aide d'épreuves de classement sur du café froid soluble additionné de quantités variables d'acide tartrique, de caféine et d'arôme-café naturel ainsi qu'à l'aide d'épreuves 5/2 sur des cafés solubles à différentes teneurs en extrait sec.

Les résultats montrent que certaines propriétés (acidité, amertume, couleur, intensité de l'arôme) augmentent quand la température augmente, alors que d'autres propriétés apparaissent relativement indépendantes de la température (intensité du parfum, qualité du parfum, de l'arôme). Toutefois, seule la relation amertume - arôme (mesurée au moyen du coefficient de corrélation linéaire) apparaît significative ; les 2 relations acidité - amertume et acidité - arôme ne sont pas significatives ; ce phénomène est provoqué par le point 100°C : pour cette température en effet il y a opposition entre acidité sensorielle et amertume sensorielle. Cette opposition n'est pas notée pour les propriétés physico-chimiques : la teneur en caféine et l'acidité chimique augmentent avec la température et elles sont également corrélées entre elles.

D'un point de vue hédonique, le café-boisson préparé à 100°C n'est pas perçu comme différent des cafés à 90°C et 110°C ; une épreuve de classement portant sur les 3 échantillons et sur 100 personnes conduit à des sommes de rang presque identiques.

VOILLEY (A.), SAUVAGEOT (F.), PIERRET (P.).- Effect of water temperature on the organoleptic quality of coffee brew. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 8 p., 5 fig., 3 tabl., 8 réf.

The study has been performed on a standard roasted coffee and with an experimental extraction machine (expresso type) permitting to fix the following processing conditions : wetting time (between 7 sec and 6 min) ; injection pressure of water into the grind (between 0,4 and 2 bars) ; water temperature = from 70°C to 120°C ; this is the range retained in the present work. The other parameters were kept constants. All the apparatus is under pressure to avoid the boiling of coffee-drink when the temperature is above 100°C.

The samples obtained at different temperatures (70, 80, 90, 100, 110 and 120°C) were compared with a reference prepared at 95°C and with pair tests and on sensory properties such as : intensity of bitterness, acidity, aroma and odor, quality of aroma and odor. The samples were tested at most 30 min. after preparation, at 55°C and in red light. In the same time, the 7 samples were ranked on color intensity in daylight.

The tasters (5 persons) were selected and characterized by a study of recognition and differential threshold for various substances in aqueous substances, in coffee or in dilute coffee. Coffee - drinks, with variable concentrations of tartaric acid, caffeine and natural aroma of coffee were classified at room temperature. Another test (5/2 test) was used to determine the differential threshold of dry matter in soluble coffee.

The results show that some properties (acidity, bitterness, color, aroma intensity) increase when the temperature increases and the others properties (odor intensity, aroma and odor quality) seem to be independant of temperature. However, only the relation between bitterness - aroma (measured with linear correlation coefficient) is significant ; the two relations acidity - bitterness and acidity - aroma are not significant. This phenomenon is induced by the point 100°C : effectively, for this temperature, sensory acidity, is in contrast with sensory bitterness. We notice, however, that the caffeine content and the acidity evaluated chemically increase with the temperature and are also correlated between them.

From the hedonic point of view, coffee - drink, prepared at 100°C, is not tested different to those prepared at 90 and 110°C. A rank test with these 3 samples and 100 persons gives rather identical results for ranks sum.

KATZ (S.N.).- Décaféinisation du café. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16 - 20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 8 p., 4 fig., 13 réf.

La reconnaissance des effets physiologiques de la caféine du café a incité les chercheurs à mettre au point de nombreux procédés permettant son extraction. Les tout premiers procédés mis au point avant la première guerre mondiale étaient basés sur un contact direct des grains avec des solvants organiques tels que le benzène, le chloroforme, le toluène et le tétrachlorure de carbone. Des solvants moins inflammables et moins toxiques, donc plus sûrs, tels que le trichloréthylène et le chlorure de méthylène ont été utilisés commercialement pendant de nombreuses années. Des recherches sont menées sur le trichloréthylène par la USFDA depuis 1976 et le chlorure de méthylène est le seul solvant chloré actuellement utilisé. Un procédé basé sur la décaféinisation directe des grains de café vert avec le chlorure de méthylène est décrit dans cet article. En 1941, la General Foods inventa un procédé de décaféinisation en présence d'eau afin d'éliminer le contact direct des grains de café vert et du solvant. Ce procédé utilise un extrait aqueux des grains de café vert qui est en équilibre, à l'exception de la teneur en caféine, avec les grains verts. Les avantages présentés sont des taux d'extraction plus élevés, l'élimination des cires insolubles dans l'eau extraites par le solvant, l'obtention d'une caféine plus pure après sa récupération, un traitement à une température moins élevée des grains de café par élimination de l'étape de récupération du solvant puisqu'il n'y a pas de contact direct entre les grains et le solvant. Un diagramme et la description du procédé de décaféinisation en présence d'eau sont donnés dans cet article.

KATZ (S.N.).- Decaffeination of coffee. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 8 p., 4 fig., 13 réf.

Recognition of the physiological effects of caffeine in coffee has prompted the inventions of many processes for its removal. Earliest processes designed before World War I were based on direct contact of beans with organic solvents such as benzene, toluol, chloroform and carbon tetrachloride. Safer less toxic and less flammable solvents such as trichloroethylene and methylene chloride were used commercially for many years. Trichloroethylene has been under investigation by the U.S.F.D.A. since 1976 and methylene chloride is the only chlorinated solvent presently being used. A process based on direct green bean decaffeination with methylene chloride is described in this article. To eliminate direct contact of green coffee beans and solvent, General Foods in 1941 invented a water decaffeination process. This process uses a water extract of green coffee beans in equilibrium with the green beans except for caffeine. Advantages claimed are higher extraction rates, elimination of water insoluble waxes extracted by the solvent, purer caffeine in a caffeine recovery system, and less heat treatment of coffee beans by the elimination of the solvent stripping step because there is no direct solvent contact with the beans. A flowsheet and description of the water decaffeination process is shown in this article.

BRESSANI (R.), BRAHAM (J.E.).- Utilisation de la pulpe de café comme aliment pour animaux. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 21 p., 8 fig., 16 tabl., 24 réf.

La pulpe du café constitue le principal sous-produit du traitement des cerises de café. La quantité disponible dans les pays producteurs est importante, ce qui est à l'origine d'un sérieux problème d'élimination des déchets ; cependant cette ressource n'a été que peu exploitée. Un programme de recherches fut lancé par l'INCAP (Institute of Nutrition of Central America and Panama) en 1971 pour connaître son utilisation potentielle puisque sa composition chimique laisse penser qu'elle pourrait avoir des utilisations variées telles que celle de matière première pour compost, pour la production de caféine, de gaz naturels et d'alcool. La possibilité d'utiliser certains de ses composés chimiques, telles que les pectines, dépend de la mise au point de nouveaux systèmes de séparation des grains et du mucilage des autres parties de la cerise. Nos premiers efforts eurent pour but son emploi comme aliment pour animaux.

D'importantes recherches ont révélé qu'il était rentable de l'utiliser aux doses respectives de 30, 10 et 10 % dans les rations pour ruminants, porcs et poulets. Les facteurs qui pourraient être importants dans la limitation de son utilisation biologique plus poussée sont la caféine et les tannins. L'utilisation de la pulpe de café est améliorée lorsque celle-ci est ensilée, utilisée dans des rations riches en protéines ou donnée en mélange avec des graminées. Au Costa Rica, une usine de déshydratation de la pulpe de café a été construite en 1979, tandis que la déshydratation solaire est utilisée dans d'autres pays d'Amérique Centrale. Les résultats ont été encourageants, mais des recherches plus approfondies sur cette source d'éléments nutritifs dans les pays producteurs de café sont nécessaires.

BRESSANI (R.), BRAHAM (J.E.).- Utilization of coffee pulp as animal feed. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 21 p., 8 fig., 16 tabl., 24 réf.

Coffee pulp constitutes the main by-product of coffee berry processing. The quantity available in producing countries is large causing a serious disposal problem, however, very little use has been made of this resource. A research program was initiated by INCAP in 1971 to learn its utilization potential since its chemical composition suggests it may have a variety of uses such as a raw material for compost and in the production of caffeine, biogas and alcohol. The feasibility in utilizing some of its chemical components such as the pectins, depends in developing newer systems of separation of the beans and mucilage from the other fractions of the berry. Our first efforts were aimed at using it as an animal feed. Extensive investigations suggested the economic feasibility of using up to 30, 10 and 10 % in ruminant, swine and poultry rations, respectively. Factors which could be of importance in limiting its higher biological utilization are caffeine and tannins. Improved utilization results when coffee pulp is ensilaged, used in high protein rations or fed mixed with grass. In Costa Rica a coffee pulp dehydration plant was built in 1979, while solar dehydration is used in other Central American countries. The results have been encouraging but there is need to pursue further studies on this nutrient source of coffee producing countries.

ADAMS (M.R.), DOUGAN (J.).- Méthodes microbiologiques pour la destruction et l'utilisation des déchets du traitement du café. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 9 p., 2 tabl., 2 fig., 40 réf.

Les déchets provenant du traitement du café par voie humide constituent une ressource relativement sous-utilisée, qui pose souvent d'importants problèmes de pollution dans les régions productrices. De nombreuses méthodes ont été proposées pour traiter la pulpe de café et les eaux usées du traitement industriel ; la majorité de ces méthodes reposent, en partie, sur l'activité des microorganismes. D'un point de vue général, celles-ci peuvent être divisées en méthodes qui ne servent qu'à réduire à un niveau acceptable le caractère polluant des déchets et en méthodes qui recherchent à tirer quelque profit de ces mêmes déchets par l'obtention d'un produit spécifique. Les techniques de traitement des eaux usées par bio-oxydation, qui se classent dans la première catégorie, sont discutées ainsi que leurs qualités respectives.

La production de compost, méthane, protéine monocellulaire, alcool, vinaigre et ensilage représente autant de tentatives pour obtenir quelques bénéfices des déchets du traitement du café. Les rendements potentiels de chacun des procédés et l'évaluation de la valeur des sous-produits sont particulièrement étudiés.

ADAMS (M.R.), DOUGAN (J.).- Microbiological methods for the disposal and utilisation of coffee processing wastes. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 9 p., 2 tabl., 2 fig., 40 réf.

Wastes from the wet-processing of coffee are a relatively under-utilised resource which often pose severe pollution problems in producing areas. Numerous methods have been proposed to dispose of coffee pulp and processing waste-waters, and most rely, in some part, on the activity of micro-organisms. Broadly speaking these can be divided into those methods which serve just to reduce the pollution load of the wastes to an acceptable level and those that seek to extract some benefit from them through a specific product. The bio-oxidation techniques of waste-water treatment, which fall into the former category, are discussed, and special attention given to their relative merits.

The production of compost, methane, single-cell protein, alcohol, vinegar and silage represent attempts to obtain some economic return from processing wastes. Consideration is given to the potential yields of each process and an assessment is made of the by-product value.

ZULUAGA VASCO (J.), TABACCHI (R.).- Contribution à l'étude de la composition chimique de la pulpe de café. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 10 p., 4 fig., 2 tabl., 13 réf.

Une analyse quantitative des différents groupes de composés phénoliques présents dans la pulpe de café a été faite : composés phénoliques simples, flavonoïdes, tannins condensés et tannins hydrolysables.

Une séparation, identification et analyse quantitative des sucres libres ont aussi été réalisées.

L'application des méthodes analytiques employées permet de suivre l'évolution quantitative des différents groupes phénoliques et des sucres libres pendant les traitements technologiques de la pulpe de café.

ZULUAGA VASCO (J.), TABACCHI (R.).- Contribution to the study of the chemical composition of the coffee pulp. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 10 p., 4 fig., 2 tabl., 13 réf.

Quantitative analysis of different groups of phenolic compounds : simple phenolic compounds, flavonoids, condensed tannins, hydrolysable tannins, present in the coffee pulp was carried out.

A separation, identification and quantitative analysis of free sugars present in the coffee pulp were also made.

The use of this method permits an appreciation of the effects of technological treatments, upon different groups of phenolic compounds and of free sugars in the coffee pulp.

ZULUAGA VASCO (J.), TABACCHI (R.).- Contribución al estudio de la composición química de la pulpa de café. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 10 p., 4 fig., 2 tabl., 13 réf.

Se hizo un análisis cuantitativo de los diferentes grupos de compuestos fenólicos presentes en la pulpa de café : compuestos fenólicos simples, flavonoïdes, taninos condensados y taninos hidrolizables.

También se hizo una separación, identificación y un análisis cuantitativo de los azúcares libres de la pulpa.

La utilización de los métodos analíticos empleados permite seguir la evolución, cuantitativa, de los diferentes grupos de compuestos fenólicos y de los azúcares libres durante los tratamientos tecnológicos de la pulpa de café.

ZULUAGA VASCO (J.), TABACCHI (R.).- Beitrag zum Studium der chemischen Struktur des Kaffeefruchtfleisches. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 10 p., 4 fig., 2 tabl., 13 réf.

Eine quantitative Analyse der verschiedenen Gruppen phenolischer Substanzen im Kaffeefruchtfleisch wurde durchgeführt : einfache phenolische Substanzen, Flavonoide, kondensierte und hydrolysierbare Tannine.

Auch wurde eine Trennung, Identifikation und quantitative Analyse der freien Zucker durchgeführt.

Die Anwendung der benutzten analytischen Methoden erlaubt die quantitativen Aenderungen der phenolischen Gruppen und der freien Zucker während der technologischen Behandlung des Kaffeefruchtfleisches zu verfolgen.

CROS (E.), FOURNY (G.), GUYOT (B.), ROULY (M.), VINCENT (J.-C.).- Evolution d'un café Arabica torréfié stocké dans quatre emballages modèles. Analyse sensorielle. Evolution de la fraction volatile. Comparaison par rapport à un témoin. Date limite d'utilisation optimale. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 8 p., 5 fig., 2 tabl., 5 réf.

Les auteurs étudient (analyse sensorielle, évolution de l'espace de tête, acidité de la boisson) le stockage (quarante semaines) d'un Arabica Colombie conditionné dans quatre emballages modèles, vrac, emballage normal simulé, emballage sous vide, sac à valve, par rapport à un témoin (surgelé 7 h après torréfaction).

L'analyse sensorielle indique :

- 1) Que la définition d'une durée optimale de conservation est fonction du témoin utilisé. Dans le cas présent, elle est comprise entre six et vingt-six semaines.
- 2) Que la conservation en emballage étanche favorise la rétention du caractère aromatique de la boisson.
- 3) Que l'augmentation de l'acidité, ainsi que la diminution du caractère aromatique de la boisson, est une fonction de l'étanchéité de l'emballage.

L'analyse chimique a montré que :

- 1) La composition de la fraction volatile est une fonction du temps de stockage et que tous les échantillons suivent une courbe de décroissance du type $y = ae^{-bt} + c$.
- 2) La date limite d'utilisation optimale n'a plus de sens dans la mesure où tous les échantillons évoluent après torréfaction.
- 3) Que les quatre échantillons sont sensiblement identiques pendant environ deux mois de stockage.
- 4) Que l'acidité et le pouvoir tampon des boissons donnent des indications sur l'emballage.

CROS (E.), FOURNY (G.), GUYOT (B.), ROULY (M.), VINCENT (J.-C.).- Changes in a roasted Arabica coffee stored in four model packings. Sensorial analysis. Changes in the volatile fraction. Comparison with a control. Optimum utilization time limit. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 8 p., 5 fig., 2 tabl., 5 réf.

The authors studied (sensorial analysis, development of head space, beverage acidity) the storage (forty weeks) of a Colombian Arabica in four model packings, loose, simulated normal packing, vacuum packing, bags with a valve, compared with a control (deep-frozen for 7 hours after roasting).

Sensorial analysis showed that :

- 1) the definition of the optimum conservation duration depends on the control used. In the present case, this was between six and twenty-six weeks,
- 2) conservation in an airtight packing promotes the retention of the aromatic character of the beverage,
- 3) the increase in the acidity, as also diminution of the aromatic character of the beverage, depends on the degree of airtightness of the packing.

Chemical analysis showed that :

- 1) the composition of the volatile fraction depends on the storage time and that all samples follow a decreasing curve of the type $y = ae^{-bt} + c$,
- 2) the optimum utilization limit date has no longer any significance since all samples change after torrefaction,
- 3) the four samples were substantially identical after being stored for two months,
- 4) the acidity and the buffering power of the beverages give information on the packing.

WILHELMSEN (L.), TIBBLIN (G.), ELMFELDT (D.), SVÄRDSUDD (K.), WEDEL (H.).- Interaction possible entre la consommation du café et les troubles cardiovasculaires. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 8 p., 2 fig., 2 tabl., 15 réf.

La Suède détient la consommation de café per capita la plus élevée du monde, mais il y a dans ce pays aussi bien des personnes qui ne boivent pas de café que des personnes qui en boivent beaucoup - vingt tasses par jour ou même plus.

L'association possible entre la consommation de café et l'infarctus du myocarde a été étudiée d'une part de façon prospective dans une population d'hommes choisis au hasard (N=855) et âgés de cinquante ans au début des examens et d'autre part à l'aide de la méthode du contrôle des cas chez des patients mâles, non sélectionnés, provenant de notre clinique Post-Infarctus du Myocarde où tous les patients de moins de soixante ans ayant eu un infarctus du myocarde sont soignés. Cette série comprenait 220 patients âgés de quarante à cinquante-sept ans.

La consommation de café était associée de façon significative à deux autres facteurs de risque importants pour l'infarctus du myocarde dans notre population, soit l'excès de tabac ou d'alcool, mais il n'y avait que des relations faibles et non significatives avec les lipides du sérum, la pression sanguine et la dyspnée dans l'effort.

Dans l'analyse prospective, il n'y avait pas de relation significative entre la consommation de café et l'infarctus du myocarde, aussi bien avec l'analyse d'univariance qu'avec celle de multivariance.

La première analyse prospective étudiée et publiée en 1977 a maintenant été élargie et comprend 83 cas d'infarctus du myocarde, 29 cas de congestion cérébrale et 125 cas de décès (maladie coronarienne : 50 ; cancer : 35 ; autres causes : 40). Même pour ces causes, aucune association significative avec la consommation de café ne fut trouvée, mais il y avait une association presque significative avec la congestion cérébrale dans l'analyse d'univariance ($p = 0,08$), association qui était significative quand la pression sanguine était prise en compte ($p = 0,05$), mais non significative quand le tabac et le cholestérol du sang étaient pris en compte ($p = 0,13$). Il n'y avait pas de tendance à une relation entre la consommation de café et la mortalité par cancer ($p = 0,74$ dans l'analyse d'univariance).

Dans l'étude des cas contrôlés, on a observé que la consommation de café notée rétrospectivement chez les patients ayant eu un infarctus du myocarde était supérieure à celle de ceux qui ont souffert plus tard d'un infarctus du myocarde. Le fait d'avoir eu un infarctus du myocarde peut avoir modifié le degré de consommation des patients ou leur consommation peut avoir effectivement augmenté pendant quelques mois ou quelques années avant l'infarctus du myocarde. Dans l'analyse des cas contrôlés une association significative entre consommation de café et infarctus du myocarde a été trouvée.

WILHELMSEN (L.), TIBBLIN (G.), ELMFELDT (D.), SVÄRDSUDD (K.), WEDEL (H.).- Possible interaction of coffee consumption with cardiovascular disturbances. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 8 p., 2 fig., 2 tabl., 15 réf.

Sweden has the highest reported coffee consumption per capita in the world, but there are both non-coffee drinkers in the country as well as those who drink very much - 20 cups a day, and even more.

The possible association between coffee and myocardial infarctus (MI) has been studied both prospectively in a random population sample of men aged 50 years (N=855) at the entry examination, and with case-control methodology in non-selected male patients from our special Post-MI Clinic treating all MI-patients up to age 60. In this series 220 patients aged 40-57 were included.

Coffee consumption was significantly associated with two other important risk factors for MI in our population, namely smoking and alcoholic intemperance, but there were weak and non-significant relationships with serum lipids, blood pressure and dyspnea on exertion.

In the prospective analysis there was no significant relationship between coffee and MI, either with univariate or multivariate analysis.

The first discussed prospective analysis published in 1977 has now been extended, and includes 83 MI cases, 29 cases of stroke, and 125 cases of death (coronary heart disease : 50, cancer : 35, and other deaths : 40). Not even for these causes was any significant association with coffee consumption found, but there was a near significant association with stroke in univariate analysis ($p = 0.08$), which was significant when blood pressure was taken into account ($p = 0.05$), but was insignificant when also smoking and serum cholesterol was included ($p = 0.13$). There was no tendency towards a relationship between coffee and cancer mortality ($p = 0.74$ in univariate analysis).

In the case-control study it was found that the retrospectively reported coffee consumption of MI patients was higher than of those who later suffered MI. The experience of having had a MI may have affected the patients' rating of their consumption or their consumption may have really increased during some months or a few years before the MI. In this case-control analysis a significant association between coffee and MI was found.

HEYDEN (S.).- Le café dans la santé et la maladie. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 11 p., 25 réf., 1 annexe : 15 réf.

Des exemples tirés de la littérature médicale de l'année 1979 sur la consommation de café et l'apparition d'une maladie donnée, ou sur les rapports de cause à effet entre consommation de café et cette maladie sont cités. "La maladie du fibrome du sein" par Minton et al. est l'article le plus fréquemment mentionné. L'article ne contient aucune preuve permettant d'affirmer une relation de cause à effet avec le café, comme on peut le voir dans une analyse détaillée. La contribution de Mettlin et Graham sur l'éventuelle induction du cancer de la vessie par le café ne présente pas le moindre degré significatif lorsque l'usage du tabac est pris en considération. Le café et la maladie bénigne de la prostate fut le sujet choisi par le Boston Collaborative Drug Surveillance Program, le même groupe qui fut à l'origine, en 1972, du débat enflammé sur la consommation de café et les attaques cardiaques, deux faits dont l'association fut démentie ultérieurement. Cette étude atteint son apogée en laissant entendre que l'usage du tabac exerce une action protectrice sur la prostate et la consommation de café un effet néfaste sur celle-ci (sic!). Les battements ventriculaires prématurés ont été étudiés chez un grand nombre d'hommes par Prineas et al. Le facteur le plus important influençant l'apparition des battements ventriculaires prématurés est l'âge. On ne note pas d'accroissements dans la fréquence des battements ventriculaires prématurés chez les personnes consommant modérément du café, soit sept à huit tasses par jour, lorsque comparaison est faite avec des personnes ne consommant pas de café. Une augmentation des battements ventriculaires prématurés n'est discernée qu'au-delà de cette dose quotidienne. Cependant les auteurs estiment que seulement 10 % des hommes présentant cette anomalie éprouveraient un bienfait en ne consommant pas de café. Callahan et al. ont confirmé, par des expériences d'alimentation de singes rhésus, notre rapport antérieur selon lequel le café per se n'influence pas le type et la composition des lipoprotéines du sérum.

HEYDEN (S.).- Coffee in health and disease. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 11 p., 25 réf., 1 annexe : 15 réf.

Examples from the 1979 medical literature on coffee consumption and alleged disease induction or causation are presented. "Fibrocystic breast disease" by Minton et al. is the most frequently quoted paper. The article contains no evidence for the assumed causal relationship with coffee,

as will be shown in a detailed analysis. Mettlin and Graham's contribution to the proposed coffee-induced bladder carcinogenesis lacks the most basic levels of significance when smoking is taken into consideration. Coffee and benign prostate disease was the topic selected by the Boston Collaborative Drug Surveillance Program, the same group which generated in 1972 the heated debate on coffee drinking and heart attacks -subsequently proven to be non-associated. This study culminates in the suggestion that smoking exerts a protective, coffee consumption an adverse effect on the prostate gland (sic!). Premature ventricular beats were studied in a large number of men by Prineas et al. The most important factor influencing the occurrence of PVB's is age. In moderate coffee consumers of 7-8 cups per day, no increase in the frequency of PVB's is observed in comparison to abstainers. Only beyond this amount of daily coffee consumption is an increase of PVB's discernable. However, the authors estimate that only 10 % of men with this abnormality would benefit from abstention. Callahan et al. confirmed, in feeding experiments with rhesus monkeys, our previous report that coffee per se does not influence the pattern and composition of the lipoproteins in the serum.

CALLAHAN (M.M.), ROBERTSON (R.), BRANFMAN (A.R.), McCOMISH (M.), YESAIR (D.W.).- Métabolisme, chez l'homme, de la caféine marquée par éléments radioactifs après administration par voie orale. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 14 p., 19 fig.

De la 1-méthyl-¹⁴C-caféine et de la 2-¹⁴C-caféine ont été administrées séparément à quatorze jours d'intervalle à huit hommes adultes et volontaires, sur une base croisée, à la dose de 5 mg/kg. Du sang, de la salive, du CO₂ expiré, de l'urine et des fèces ont été collectés pendant les 48 h suivant l'administration de chacune des doses. L'évaluation quantitative de la caféine et de ses métabolites a été réalisée par chromatographie liquide haute performance (HPLC) associée à un comptage par scintillation en phase liquide. Les demi-vies de la caféine per se du plasma et de la salive étaient semblables et proches de 3 h, tandis que les demi-vies des équivalents radioactifs totaux étaient d'environ 8-10 h dans les deux fluides. Les principaux métabolites trouvés, aussi bien dans le plasma que dans la salive au cours des huit premières heures suivant l'absorption de la dose, étaient des diméthylxanthines, de la paraxanthine/théophylline et de la théobromine. Parmi les métabolites connus de la caféine (xanthine et acide urique), les dérivés 1-méthyl étaient les principaux dérivés trouvés dans l'urine (0 - 48 h) avec la 1-méthylxanthine représentant approximativement 18 % de la dose administrée et l'acide 1-méthylurique environ 15 %. Au cours du dosage quantitatif des métabolites de l'urine, notre système de chromatographie liquide haute performance a détecté partiellement deux métabolites polaires inconnus qui ont été appelés A₁ et A₂. A₁ était le principal composé et représentait 7 à 35 % des deux doses radioactives administrées chez les huit personnes. La chromatographie liquide haute performance en phase inverse préalable est employée pour isoler A₁ et A₂ et établir leur structure propre. Les propriétés chromatographiques et spectrales de A₁ étaient identiques à celles d'un échantillon de référence de 5-acétylamino-6-amino-3-méthyluracil fourni par le Dr. W. Pfeleiderer (Université de Constance). Le fait que A₂ (< 5 % de la dose administrée) est converti en A₁ est mis en évidence et discuté. Subventionné par les membres de l'Association Nationale du Café.

CALLAHAN (M.M.), ROBERTSON (R.), BRANFMAN (A.R.), McCOMISH (M.), YESAIR (D.W.).- Human metabolism of radiolabeled caffeine following oral administration. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 14 p., 19 fig.

1-Methyl-¹⁴C and 2-¹⁴C-caffeine were administered separately at a 14 day interval to 8 adult male volunteers on a crossover basis at 5 mg/kg. Blood, saliva, expired CO₂, urine and feces were collected for 48 hr following each dose. High performance liquid chromatography (HPLC) in conjunction with liquid scintillation counting was used for quantitating caffeine and its metabolites. Plasma and saliva half-lives of caffeine per se were similar approximating 3 hr while the half-lives of total radiolabeled equivalents in both fluids were about 8-10 hr. The major metabolites found in both plasma and saliva up to 8 hr post dose were the dimethylxanthines,

paraxanthine/theophylline and theobromine. Of the known xanthine and uric acid metabolites of caffeine, the 1-methyl derivatives were the major ones found in the urine (0 - 48 hr) with 1-methylxanthine representing approximately 18 % of the administered dose and 1-methyluric acid about 15 %. In the course of quantifying the urinary metabolites, our HPLC system partially resolved two unknown polar metabolites we termed A₁ and A₂. A₁ was the major component and in our 8 individuals ranged from 7 - 35 % of both radiolabeled administered doses. Preparative reverse phase HPLC was used to isolate A₁ and A₂ for structural characterization. The chromatographic and spectral properties of A₁ were identical with an authentic sample of 5-acetylamino-6-amino-3-methyluracil provided by Dr. W. Pfleiderer (Universität Konstanz). Preliminary evidence which suggests that A₂ (< 5 % of administered dose) is converted to A₁ will also be discussed. Supported by members of the National Coffee Association.

ARNAUD (M.J.), WELSCH (C.).- Métabolisme de la caféine chez l'homme. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 12 p., 10 fig., 17 réf.

Il est bien connu que, chez l'homme, pas plus de 1 % de la caféine ingérée est excrétée, telle quelle, dans l'urine. Ainsi, la caféine doit être intensivement métabolisée pour donner plus de composés polaires qui sont finalement excrétés dans l'urine et les fèces. Les voies métaboliques sans déméthylation et donnant l'acide triméthylurique et le 6-amino-5(N-formylméthylamino)1,3-diméthyluracil ne sont pas quantitativement importantes chez l'homme en comparaison de ce qui existe chez l'animal, par exemple chez le rat, la souris, le hamster chinois et le chien.

Les concentrations du plasma en caféine et en diméthylxanthines : théophylline, théobromine et paraxanthine ont été analysées à l'aide de la chromatographie liquide haute performance (HPLC) de façon à évaluer les caractéristiques spécifiques de la déméthylation de la caféine chez l'homme. Après administration par voie orale (8 mg/kg) la concentration en caféine augmente dans le plasma pour atteindre un maximum de $9,8 \pm 0,2$ mg/l. De petites augmentations des concentrations du plasma en théobromine et en théophylline ont été observées avec des maximums respectifs de $1,2 \pm 0,2$ mg/l et $0,4 \pm 0,1$ mg/l. La paraxanthine a été séparée, par chromatographie liquide haute performance, des autres diméthylxanthines et a montré la plus forte augmentation avec une concentration maximale de $2,7 \pm 0,2$ mg/l. La déméthylation du groupe 3-méthyl est apparue comme la voie métabolique la plus importante chez l'homme ; cependant, les concentrations de ces diméthylxanthines dans le plasma dépendent de leurs excrétions urinaires, ainsi que de leur propre métabolisme.

Chaque diméthylxanthine fut administrée séparément (4 mg/kg) à six volontaires ayant subi, pendant une semaine, un régime alimentaire dénué de méthylxanthine. Les métabolites de la paraxanthine, de la théobromine et de la théophylline ont été dosés dans l'urine. Les résultats obtenus ont confirmé l'importance du métabolisme de la paraxanthine dans le métabolisme de la caféine chez l'homme et de nouveaux métabolites tels que le 6-amino-5(N-formylméthylamino)3-méthyluracil et le 6-amino-5(N-formylméthylamino)1-méthyluracil ont été identifiés et dosés. Un total de seize métabolites ont été identifiés et dosés tandis que l'acide 7-méthylurique et le 5-acétylamino-6-amino-3-méthyluracil n'ont pas été séparés des constituants de l'urine par chromatographie liquide haute performance.

ARNAUD (M.J.), WELSCH (C.).- Caffeine metabolism in human subjects. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 12 p., 10 fig., 17 réf.

In man, it is well known that no more than 1 % of ingested caffeine is excreted unchanged in the urine. Thus, caffeine must be intensively metabolized to give more polar compounds which are finally excreted in the urine and feces. Metabolic pathways proceeding without demethylation and giving the trimethyluric acid and the 6-amino-5(N-formylmethylamino)1,3-dimethyluracil are quantitatively not important in man compared to the animal i.e. rat, mouse, Chinese hamster and dog.

Plasma concentrations of caffeine and the dimethylxanthines : theophylline, theobromine and paraxanthine were analyzed using high performance liquid chromatography (HPLC) in order to evaluate the specificity of caffeine demethylation in man. After the oral administration (8 mg/kg), caffeine concentration increased in the plasma to reach a maximum of 9.8 ± 0.2 mg/l. A small increase of theobromine and theophylline plasma concentrations were observed with a maximum of 1.2 ± 0.2 mg/l and 0.4 ± 0.1 mg/l respectively. Paraxanthine was separated with the HPLC system from the other dimethylxanthines and exhibited the most important increase with a maximum concentration of 2.7 ± 0.2 mg/l. Demethylation of the 3-methyl group appeared to be the most important pathway in man ; however, the plasma concentrations of these dimethylxanthines depended on their urinary excretions and also on their own metabolism.

Each dimethylxanthine was administered separately (4 mg/kg) to 6 volunteers on a methylxanthine free diet lasting one week. The metabolites of paraxanthine, theobromine and theophylline were quantified in the urine. The results obtained confirmed the importance of the paraxanthine metabolic pathway in human caffeine metabolism and new metabolites such as the 6-amino-5(N-formylmethylamino)3-methyluracil and the 6-amino-5(N-formylmethylamino)1-methyluracil were identified and quantified. A total of 16 metabolites were identified and quantified while the 7-methyluric acid and the 5-acetylamino-6-amino-3-methyluracil were not separated by HPLC from urinary constituents.

ACHESON (K.J.).- Influence de la caféine et du café sur le taux du métabolisme et l'utilisation des aliments chez l'homme. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 7 p., 3 fig., 3 tabl., 13 réf.

Une série de quatre expériences a été menée pour étudier les effets de la caféine et du café sur le taux du métabolisme et l'utilisation des aliments chez des individus d'un poids normal ou obèses. Dans la première expérience, on a comparé 8 mg/kg de caféine à un placebo chez les sujets de poids normal. Le taux du métabolisme a augmenté de façon significative pendant les trois heures suivant l'ingestion de caféine. Tandis que le glucose, l'insuline et l'oxydation des glucides du plasma n'ont pas changé de façon significative, les teneurs du plasma en acides gras libres sont passées de 432 ± 31 à 848 ± 135 μ Eq/litre, accroissements accompagnés d'augmentations significatives de l'oxydation des graisses pendant la dernière heure de l'expérience. Dans les deuxième et troisième essais, les effets du café apportant 4 mg/kg de caféine ont été étudiés chez des sujets obèses et les témoins. Le taux du métabolisme a augmenté de façon significative dans les deux groupes ; cependant, des accroissements significatifs de l'oxydation des graisses n'ont été observés que dans le groupe témoin. Les acides gras volatils du plasma n'ont pas changé dans le groupe des obèses. Dans le quatrième essai, le café a été consommé avec un repas de 3080 KJ. L'effet thermique du repas fut significativement plus grand après un café non décaféiné qu'après un café décaféiné et, comme précédemment, l'oxydation des graisses fut significativement plus importante après consommation de café. En conclusion le café/caféine stimule le taux du métabolisme aussi bien chez les témoins que chez les individus obèses ; cependant ceci s'accompagne d'une plus forte oxydation des graisses chez les sujets ayant un poids normal.

ACHESON (K.J.).- The influence of caffeine and coffee upon metabolic rate and substrate utilization in man. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 7 p., 3 fig., 3 tabl., 13 réf.

A series of four trials was carried out to investigate the effects of caffeine and coffee on the metabolic rate and substrate utilization in normal weight and obese individuals. In the first trial 8 mg/kg caffeine was compared with a placebo in normal weight subjects. Metabolic rate increased significantly during the 3 hr after caffeine ingestion. While plasma glucose, insulin, and carbohydrate oxidation did not change significantly, plasma free fatty acid levels rose from 432 ± 31 to 848 ± 135 μ Eq/liter and were accompanied by significant increases in fat oxidation during the last hour of the test. In the second and third trials the effects of coffee providing 4 mg/kg caffeine were studied in control and obese subjects. Metabolic rate increased significantly in both groups ; however, significant increases in fat oxidation were only observed in

the control group. Plasma free fatty acids did not change in the obese. In the fourth trial, coffee was taken with a 3080 KJ/meal. The thermic effect of the meal was significantly greater after coffee than after decaffeinated coffee and again fat oxidation was significantly greater after coffee. In conclusion caffeine/coffee stimulates the metabolic rate in both control and obese individuals ; however, this is accompanied by greater oxidation of fat in normal weight subjects.

CLARK (R.P.).- Boissons chaudes et froides et variations de la température de la peau. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 7 p., 2 fig., 3 réf.

La carte de répartition des températures à la surface de la peau d'un corps nu est complexe et dépend de facteurs tels que la température du milieu ambiant, le mouvement de l'air, l'épaisseur des replis de la peau, l'exercice et l'absorption d'aliments et de liquides. Ces répartitions peuvent être associées à des variations cycliques locales qui ont lieu sur tout le corps et qui n'ont pas nécessairement la même amplitude ou ne sont pas de même phase dans les différentes régions du corps.

Au cours de ces études sur la répartition des températures "normales" faite à l'aide de la thermographie en couleur aux infra-rouges, on a observé que des modifications à court terme de la carte des températures de la peau étaient provoquées par l'absorption de boissons chaudes, telles que l'eau, le thé et le café. En milieux ambiants chauds, on a noté un accroissement de la température de la peau et un début de transpiration après absorption de ces liquides chauds. Ceci résultait en un rafraîchissement ultérieur de la peau dû à une augmentation de l'échange de chaleur avec le milieu environnant. Ceci était en opposition avec les changements de température observés avec les mêmes boissons froides qui provoquaient un rafraîchissement local autour du cou et de la bouche mais aucun changement important de la température de la peau.

Des thermogrammes en couleur aux infra-rouges illustrant ces effets ont été présentés.

CLARK (R.P.).- Hot and cold drinks and skin temperature changes. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 7 p., 2 fig., 3 réf.

Skin surface temperature distributions over the nude body form complex patterns which are dependent on factors such as environmental temperature, air movement, skin fold thickness, exercise and the taking of foods and fluids. These distributions may be coupled with local cyclic variations which occur over the whole body that are not necessarily of the same amplitude or in the same phase for different body areas.

During the course of investigations into these "normal" temperature patterns using colour infra-red thermography, it was observed that short-term modifications to skin temperature patterns were produced by drinking hot fluids such as water, tea and coffee. In warm environments an increase of skin temperature and an initiation of sweating was observed after taking these hot fluids. This resulted in a subsequent cooling of the skin due to increased heat exchange with the environment. This was in contrast to the temperature changes that were observed with cold drinks of the same fluids which produced local cooling around the neck and mouth but not any extensive skin temperature changes.

Colour infra-red thermograms illustrating some of these effects have been shown.

SPINDEL (E.), ARNOLD (M.), CUSACK (B.), WURTMAN (R.J.).- Effets de la caféine sur la fonction de la thyroïde et de l'hypophyse antérieure chez le rat. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 14 p., 8 fig., 2 tabl., 35 réf.

Nous avons étudié les effets de l'injection intrapéritonéale de caféine sur les teneurs du sérum en thyrotropine (TSH), hormone de croissance, prolactine, thyroxine et 3,3',5-triiodothyronine chez les rats. La caféine abaisse la TSH et les hormones de croissance en fonction de la dose appliquée, avec des valeurs de DE₅₀ de 30 et voisine de 50 mg/kg respectivement. Les teneurs en TSH étaient abaissées une à six heures après l'injection et en corrélation avec des teneurs du sérum en caféine supérieures à 20 µg/ml. La baisse de la teneur du sérum en TSH était suivie de celles en 3,3',5-triiodothyroxine et en thyroxine 4 h après l'injection de caféine. La théobromine et la théophylline ont des effets semblables à ceux de la caféine sur les teneurs en hormones. La caféine n'affectait pas de manière significative la sécrétion d'hormones lorsqu'elle était directement incubée avec des hypophyses de rats *in vitro*. L'administration d'antisérum antisomatostatine à des rats bloque les effets inhibiteurs de la caféine sur les teneurs du sérum en hormones de croissance, ce qui laisse supposer que la caféine inhibe la sécrétion d'hormones de croissance et de TSH en libérant de la somatostatine hypothalamique.

SPINDEL (E.), ARNOLD (M.), CUSACK (B.), WURTMAN (R.J.).- Effects of caffeine on anterior pituitary and thyroid function in the rat. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 14 p., 8 fig., 2 tabl., 35 réf.

We studied the effects of acute, intraperitoneal administration of caffeine on serum thyrotropin (TSH), growth hormone, prolactin, thyroxine and 3,3',5-triiodothyronine in rats. Caffeine lowered serum TSH and GH in a dose-dependent manner with ED₅₀ values of 30 and approximately 50 mg/kg, respectively. TSH levels were depressed 1 to 6 hr after injection and correlated with serum caffeine levels greater than 20 µg/ml. The decrease in serum TSH was followed by decreases in serum 3,3',5-triiodothyroxine and thyroxine 4 hr after caffeine administration. Theophylline and theobromine had effects similar to those of caffeine on hormone levels. Caffeine did not significantly affect hormone secretion when incubated directly with rat pituitaries *in vitro*. Administration of antisomatostatin antiserum to rats blocked the inhibitory effects of caffeine on serum GH levels, suggesting that caffeine inhibits GH and TSH secretion by releasing hypothalamic somatostatin.

STALDER (R.).- La café a-t-il un effet antithiaminique ? IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 6 p., 4 tabl., 6 réf.

L'excrétion de thiamine par voie urinaire chez des hommes volontaires buvant 12 g de café soluble par jour a été mesurée. L'excrétion de la thiamine était accrue lorsque la quantité globale de café était bue en deux heures et aussi lorsque cette consommation était répartie sur toute la journée. Des souris consommant une ration contenant 5 % de café soluble n'ont montré aucun signe de carence en thiamine ; par ailleurs, leur excrétion de thiamine par voie urinaire n'était pas influencée par l'absorption de café. Une seule dose de 3 g de café soluble par kilogramme de poids vif, correspondant à une dose de 200 g pour un homme adulte, a provoqué une chute de l'excrétion de thiamine par voie urinaire chez des rats.

STALDER (R.).- Is there an anti-thiamine effect of coffee ? IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 6 p., 4 tabl., 6 réf.

The urinary thiamine excretion of human volunteers drinking 12 g of instant coffee per day was measured. The thiamine excretion was increased when the whole quantity of coffee was drunk within 2 hours and also when the consumption was partitioned over the whole day. Mice consuming a diet containing 5 % of instant coffee did not show any signs of thiamine deficiency. Also their urinary thiamine excretion was not influenced by coffee intake. A single dose of 3 g of

instant coffee per kg body weight corresponding to a dose of 200 g for an adult man provoked a decrease of the urinary thiamine excretion in rats.

WURZNER (H.P.).- Café, hormones gastro-intestinales et fonction oesophagienne. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 10 p., 12 fig., 9 réf.

Les brûlures du coeur et autres symptômes de l'insuffisance du sphincter de l'oesophage inférieur associés à une oesophagite de reflux constituent un problème clinique courant. Le café et les produits résultant de sa torréfaction ont été accusés, dans le passé, d'être les facteurs principaux d'un tel syndrome. L'effet du café sur la pression du sphincter de l'oesophage inférieur et sur le pH intra-oesophagien a été évalué chez des volontaires en bonne santé et dans différentes conditions physiologiques. Le café ne semble pas être une condition du reflux acide oesophagien et de l'insuffisance du sphincter.

WURZNER (H.P.).- Coffee, gastro-intestinal hormones and oesophageal function. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 10 p., 12 fig., 9 réf.

Heart burn and other symptoms of lower oesophageal sphincter incompetence associated with reflux oesophagitis are a common clinical problem. Coffee and its roast products have been blamed in the past as being the major factors causing such a syndrome. The effect of coffee on lower oesophageal sphincter pressure and intra-oesophageal pH was assessed in healthy volunteers in several physiological conditions. Coffee does not appear to be a condition for oesophageal acid reflux and incompetence of the sphincter.

CLARKE (R.J.).- Normalisation et législation internationales du café. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 6 p., 2 réf.

Un bref exposé décrit les objectifs et le caractère de la normalisation internationale du café. De récents exemples d'harmonisation sont donnés par : 1) le travail d'ISO/TC 34/SC 15 relatif à la mise au point et à la publication de normes internationales concernant les méthodes d'analyse et d'échantillonnage du café vert ainsi que du café soluble, et 2) la directive de la CEE de 1977 relative à l'harmonisation des spécifications et des méthodes d'analyse du café soluble dans les Etats membres.

CLARKE (R.J.).- International coffee standardisation and legislation. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 6 p., 2 réf.

A short presentation describes the objectives and nature of international coffee standardisation, in both its commercial and legislative aspects. Examples of recent activity in harmonization are, 1) the work of ISO/TC 34/SC 15 in developing and issuing international standards for methods of analysis, test methods and sampling, for both green and soluble coffee, and 2) the EEC Directive of 1977 in harmonizing specifications and test methods for instant coffee, amongst member-countries.

LOBREAU-CALLEN (D.), LEROY (J.-F.).- Quelques données palynologiques sur le genre Coffea et autres genres du cercle des caféiers. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 14 p., 4 schémas, 2 réf., 8 pl. h.t.

Les auteurs ont eu pour objectif d'essayer de dégager les bases palynologiques applicables à la systématique de l'ensemble des caféiers. Ils ont également tenté de progresser dans la compréhension de la parenté de l'espèce C. arabica.

LOBREAU-CALLEN (D.), LEROY (J.-F.).- Some palynological data on the genus Coffea and other genera of the coffee tree range. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 14 p., 4 schémas, 2 réf., 8 pl. h.t.

The authors' aim was to try to establish the palynological basis applicable to the systematic of the whole of the coffee trees. They have also tried to progress in the understanding of the relationship of the species C. arabica.

CHARRIER (A.).- La conservation des ressources génétiques du genre Coffea. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 10 p., 2 fig., 1 tabl., 20 réf.

Les collections de travail des sélectionneurs sont presque exclusivement composées de représentants des espèces cultivées C. arabica et C. canephora. Elles ont été utilement complétées, au cours des vingt dernières années, par les prospections réalisées en Afrique et dans la région malgache. Celles-ci ont permis de rassembler de nombreuses espèces du genre Coffea dans un nombre limité de collections de base qu'il serait aisé d'enrichir par quelques prospections complémentaires.

L'utilisation rationnelle de ce patrimoine génétique à l'échelle mondiale requiert maintenant une organisation régionalisée et des méthodes appropriées.

Ces centres de ressources caféières doivent assurer la pérennité des collections de base, réaliser l'évaluation génétique du matériel végétal, assurer sa distribution vers les collections de travail et la diffusion de toutes les informations recueillies. L'expérience acquise en ce domaine à Madagascar et en Côte d'Ivoire, dans le cadre d'une opération conjointe ORSTOM-IFCC, servira de référence à nos suggestions.

CHARRIER (A.).- Conservation of the genetic resources of the genus Coffea. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 10 p., 2 fig., 1 tabl., 20 réf.

The working collections of breeders almost exclusively consist of representatives of the cultivated species C. arabica and C. canephora. They have been advantageously supplemented in the course of the last twenty years by expeditions in Africa and the Malagasy region. These have enabled many species of the genus Coffea to be included in a limited number of basic collections, which it would be easy to enrich by a few additional expeditions.

The rational utilisation of this genetic inheritance on a world scale now requires a regionalized organisation and suitable methods.

These centres of coffee resources must ensure the perenniality of the basic collections, make genetic evaluations of the plant material, distribute it to the working collections, and disseminate all the information that has been collected. The experience acquired in this field in Madagascar and Ivory Coast in the joint ORSTOM-IFCC operation will provide support for our suggestions.

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

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

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

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

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

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

BERTHOU (F.), TROUSLOT (P.), HAMON (S.), VEDEL (F.), QUETIER (F.).- Analyse en électrophorèse du polymorphisme biochimique des caféiers : variation enzymatique dans dix-huit populations sauvages. Variation de l'ADN mitochondrial dans les espèces C. canephora, C. eugenioides et C. arabica. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 16 p., 7 fig., 7 tabl., 3 tabl. en annexe, 13 réf.

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

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

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

BERTHOU (F.), TROUSLOT (P.), HAMON (S.), VEDEL (F.), QUETIER (F.).- Electrophoretic analysis of the biochemical polymorphism of coffee trees : Enzymatic variation in eighteen wild populations. Variation of the mitochondrial DNA in the species C. canephora, C. eugenioides and C. arabica. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 16 p., 7 fig., 7 tabl., 3 tabl. en annexe, 13 réf.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

R - locus has multiple alleles with R₁ R₁ alleles present in Rume Sudan and the somewhat less effective R₂ R₂ alleles in Pretoria, which also has the K - gene.

The medium resistant variety K7 carries only the recessive K - gene. The arabica-like variety Hibrido de Timor (a natural interspecific arabica x robusta hybrid) carries one gene for CBD resistance on the T - locus with intermediate gene action. It probably inherited this gene from its robusta parent. There is circumstantial evidence that the resistance to CBD is of a stable nature, but it is advisable to accumulate as many resistance genes in one genotype as possible by combining in the breeding programme the resistance of Rume Sudan with that of Hibrido de Timor.

LANAUD (C.), PARVAIS (J.-P.).- Observations, avant mise en culture, des divisions anormales des noyaux de grains de pollen de caféier induits au froid. Influence du stade de développement lors de l'induction. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 8 p., 5 fig., 3 photos, 5 réf.

Afin de déterminer les conditions préalables les plus favorables à l'androgénèse, des essais d'induction de divisions surnuméraires des noyaux ont été faits, avant mise en culture, sur des grains de pollen immatures de caféier.

Un traitement par le froid, suivi d'un séjour à température ambiante pendant quatre jours, a été effectué sur quatre clones appartenant à trois espèces différentes et à divers stades de développement de la fin de la méiose à la première mitose pollinique.

Deux stades se sont révélés plus réceptifs à cette induction : les stades de développement précoce des microspores et le stade de première division pollinique. A ces stades, on a obtenu des structures à plusieurs noyaux, dont certaines avaient un noyau reproducteur et jusqu'à neuf noyaux végétatifs ; ces observations ont été faites avant toute mise en culture.

LANAUD (C.), PARVAIS (J.-P.).- Observations of abnormal cold-induced divisions of pollen grain nuclei of the coffee tree made before putting into culture. Influence of the physiological stage at time of induction. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 8 p., 5 fig., 3 photos, 5 réf.

In order to determine the most favourable prior conditions for androgenesis, tests on the induction of supernumerary divisions of nuclei were made on immature coffee tree pollen grains before putting into culture.

Four clones belonging to three different species and at various physiological stages, ranging from the end of meiosis to the first pollen mitosis, were given cold treatment followed by a stay of four days at room temperature.

Two physiological stages proved to be more receptive to this induction : the early development of the microspores and the first pollen division. At these stages structures with several nuclei were obtained, some of which with one reproductive nucleus and up to nine vegetative nuclei. These observations were made before any cultivation.

LOUARN (J.).- Hybrides interspécifiques entre Coffea canephora Pierre et C. liberica Bull. ex Hiern. Résultats préliminaires sur les hybrides F₁. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 8 p., 3 fig., 4 tabl., 6 réf.

Ce croisement interspécifique entre caféiers diploïdes africains a été réalisé pour associer les qualités agronomiques de C. canephora à quelques caractéristiques intéressantes de C. liberica. Il est plus aisé lorsque cette dernière espèce est prise comme parent femelle.

Entre descendance hybrides F₁, il y a un "effet croisement" pour la vigueur ; l'influence du parent C. liberica est prépondérante. La viabilité pollinique moyenne de 155 hybrides F₁

entrés en floraison est de 54 ± 15 %. Les premiers hybrides ont une fertilité limitée caractérisée par un taux de grains caracolis supérieur à 47 %.

Les hybrides F_1 montrent un comportement méiotique de type diploïde subnormal, avec une variation importante au sein d'une même descendance de seize arbres (44 ± 10 % des cellules à onze bivalents). Les viabilités polliniques, les cellules mères à onze bivalents et les disjonctions chromosomiques normales en anaphase I sont étroitement corrélées.

Ces résultats indiquent une faible différenciation chromosomique entre C. canephora et C. liberica ainsi que leur appartenance à un même génome de base. Ceci est confirmé par la présence de nombreux multivalents chez les amphidiploïdes artificiels issus du doublement chromosomique des hybrides F_1 .

LOUARN (J.).- Interspecific hybrids between Coffea canephora Pierre and C. liberica Bull. ex Hiern. Preliminary results with F_1 hybrids. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 8 p., 3 fig., 4 tabl., 6 réf.

This interspecific crossing between African diploid coffee trees was effected to combine the agronomic properties of C. canephora with some interesting characteristics of C. liberica.

Between F_1 hybrid progenies, there is a "crossing effect" for the vigour. The influence of the C. liberica parent is preponderant. The average pollen viability was 54 ± 15 % for 155 hybrids F_1 that had started to flower. The first hybrids have a limited fertility characterized by a peaberry seed proportion greater than 47 %.

The behaviour of the F_1 hybrids during meiosis was of a diploid subnormal type, with a great variation in the same progeny of sixteen trees (44 ± 10 % of the cells with eleven bivalents). The pollen viabilities, the mother cells with eleven bivalents and the normal chromosome disjunctions in anaphase I were found to be closely correlated.

These results show a low level of chromosomal differentiation between C. canephora and C. liberica, as well as the fact that they belong to the same basic genome. This is confirmed by the presence of numerous multivalents in the artificial amphidiploids obtained by doubling the chromosome number of the F_1 hybrids.

LE PIERRÈS (D.), ANTHONY (F.).- Les hybrides interspécifiques hexaploïdes Coffea arabica x C. canephora : influence du milieu et de la structure génétique sur les potentialités agronomiques. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 8 p., 1 fig., 4 tabl., 8 réf.

Les hybrides hexaploïdes de départ plantés au Mont Tonkoui en Côte d'Ivoire (1.100 m) manifestent une bonne adaptation. L'altitude influence favorablement les caractéristiques de fertilité des arbres, leur production et la qualité du café.

Au contraire, les descendances de première génération des hybrides hexaploïdes cultivées en basse altitude à Divo ont un mauvais fonctionnement et une faible vigueur quasi-générale.

La mauvaise adaptation de ces hybrides hexaploïdes aux conditions de la caféiculture ivoirienne s'apparente à celle de leur parent C. arabica. Des solutions génétiques sont recherchées.

LE PIERRÈS (D.), ANTHONY (F.).- Interspecific hexaploid hybrids Coffea arabica x C. canephora : influence of environment and of genetic structure on the agronomic potentialities. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 8 p., 1 fig., 4 tabl., 8 réf.

The original hexaploid hybrids planted on Mount Tonkoui in Ivory Coast (1.100 m) showed good adaptability. Altitude favourably influences the fertility characteristics of the trees, their production and the quality of the coffee.

On the other hand, the progenies of the first generation of hexaploid hybrids cultivated at low altitude at Divo had poor properties and almost generally little vigour.

The poor adaptability of these hexaploid hybrids to the Ivory Coast coffee culture conditions is very similar to that of their parent C. arabica. Genetic solutions to this problem are being sought.

DUBLIN (P.).- Multiplication végétative in vitro de l'Arabusta. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 18 p., 8 tabl., 8 réf.

Le C. arabica et le C. canephora sont les deux espèces les plus importantes parmi les caféiers cultivés.

Dans le but d'associer les caractéristiques d'intérêt de chacune de ces espèces, un hybride tétraploïde (C. arabica x C. canephora) mieux connu sous le nom d'Arabusta a été créé en Côte d'Ivoire.

La reproduction des génotypes de valeur de cet hybride interspécifique ne peut être obtenue que par voie végétative.

Des recherches sur la multiplication végétative in vitro de l'Arabusta ont été entreprises, dans le but d'accélérer la diffusion des clones de valeur Arabusta nouvellement sélectionnés.

Ces recherches ont été orientées dans plusieurs directions : bouturage in vitro de tiges issues de bourgeons orthotropes préexistants ou néoformés, induction d'embryogenèse somatique.

En raison des difficultés (désinfection, oxydation ...) d'obtention de tiges à partir de bourgeons déjà existants, une technique d'induction de bourgeons néoformés sur fragments d'entre-nœuds orthotropes a été mise au point.

Des embryons somatiques, capables de se développer en plantules, ont été obtenus par des voies fort différentes.

Comparativement au bouturage in vitro, l'embryogenèse somatique offre un coefficient de multiplication considérablement important.

Il importe, pour décider du choix de la meilleure méthode, de tester le degré de conformité des caféiers issus de chacun de ces procédés.

DUBLIN (P.).- Vegetative multiplication of Arabusta in vitro. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 18 p., 8 tabl., 8 réf.

C. arabica and C. canephora are the most important species of the cultivated coffee trees.

With the aim of combining the characteristics of importance of each of these species, a tetraploid hybrid (C. arabica x C. canephora), better known under its name of Arabusta, has been created in Ivory Coast.

The reproduction of valuable genotypes of this interspecific hybrid can only be achieved by vegetative multiplication.

Research on the in vitro vegetative multiplication of Arabusta has been undertaken with the object of distributing newly-bred Arabusta clones of value.

This research was oriented in several directions : in vitro propagation by cuttings of stems derived from pre-existing or newly-formed orthotropic buds, induction of somatic embryogenesis.

Because of difficulties (disinfection, oxidation) in obtaining stems from already existing buds, a technique of induction of newly-formed buds on orthotropic internode fragments has been developed.

Somatic embryos, capable of developing into plantlets, have been obtained by very different means.

By comparison with in vitro cutting propagation, somatic embryogenesis gives a very high multiplication coefficient.

To choose the best method, the degree of conformity of the coffee trees derived from each of these procedures must be tested.

CUSTERS (J.B.M.).- Multiplication clonale de Coffea arabica L. par culture de nœuds. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 8 p., 6 fig., 6 tabl., 10 réf.

La multiplication clonale in vitro grâce à l'augmentation de la formation de bourgeons axillaires a été réalisée sur milieu LS modifié avec un génotype du Coffea arabica. Des nœuds provenant aussi bien de pousses orthotropes que de pousses plagiotropes se sont révélés aptes à être des explants primaires. Les nœuds des deux origines se sont développés en pousses axillaires ayant un aspect orthotrope. L'AB 10 mg/l a été le meilleur traitement cytokinique pour

le développement des pousses. La multiplication continue de pousses a été possible sur le même milieu en utilisant comme sous-culture des explants nodaux provenant de plantules cultivées in vitro et formant beaucoup de pousses. La présence de feuilles sur ces explants s'est révélée être une condition préalable. Des boutures de pousses ont bien formé des racines sur un milieu contenant de l'ANA 0,2 mg/l, si une obscurité ininterrompue avait été fournie pendant les trois premières semaines de la phase de formation des racines. Des plantules racinées ont été mises en terre.

CUSTERS (J.B.M.).- Clonal propagation of Coffea arabica L. by nodal culture. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 8 p., 6 fig., 6 tabl., 10 réf.

Using one genotype of Coffea arabica, clonal propagation in vitro through enhancement of axillary shoot formation has been achieved on modified LS medium. Nodes from orthotropic as well as plagiotropic shoots proved to be suitable primary explants. Both developed orthotropic-looking axillary shoots. BA 10 mg/l was the best cytokinin treatment for shoot development. Continuous multiplication of shoots was possible on the same medium using for subculture nodal explants from strongly shooting in vitro plantlets. The presence of the leaves on these explants appeared to be a prerequisite. Shoot cuttings rooted well on medium containing NAA 0.2 mg/l, if continuous darkness was given during the first three weeks of the rooting phase. Rooted plantlets were readily established in soil.

STARITSKY (G.), VAN HASSELT (G.A.M.).- Multiplication massale synchronisée du Coffea canephora in vitro. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 6 p., 12 fig., 6 réf.

Une méthode rapide de production massale in vitro d'embryons somatiques et de plantules transplantables de Coffea canephora a été mise au point. La synchronisation de la production des embryoides et des plantules est obtenue par l'utilisation d'un milieu liquide.

La descendance in vitro montre, en apparence, un degré élevé d'uniformité. Cependant, des tests précis sur l'uniformité génétique des arbres obtenus in vitro n'ont pu être menés à bien, faute d'installations suffisantes.

Au cours des expériences, une attention particulière est portée à l'étude de l'embryogenèse somatique in vitro et à la réduction de l'interphase du cal dans le processus de multiplication.

STARITSKY (G.), VAN HASSELT (G.A.M.).- The synchronised mass propagation of Coffea canephora in vitro. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 6 p., 12 fig., 5 réf.

A rapid method for the mass production in vitro of somatic embryos and transplantable plantlets of Coffea canephora has been developed. Synchronisation in the production of embryoids and plantlets is achieved by the application of liquid media.

The in vitro progeny outwardly shows a high degree of uniformity. However, because of limited facilities definite tests on the genetic uniformity of the in vitro trees could not be carried out.

In the experiments attention is paid to the study of somatic embryogenesis in vitro and to the reduction of the callus interphase in the multiplication process.

DUCEAU (P.).- Critères de sélection pour l'amélioration des hybrides Arabusta en Côte d'Ivoire. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 8 p., 2 fig., 4 réf.

La sélection opérée chez les hybrides Arabusta repose sur cinq critères : productivité, rusticité, teneur en caféine, fertilité, résistance à la verse.

Leurs parents (Coffea canephora tétraploïde et Coffea arabica) supportent le même crible, pondéré en fonction de leurs structures. La productivité inclut les observations relatives au comportement des candidats têtes de clone lors des floraisons, leur précocité, l'alternance qu'ils peuvent présenter.

La rusticité est estimée par la résistance à la sécheresse, la réaction aux aléas entomologiques et phytopathologiques.

La teneur en caféine s'accompagne d'une analyse granulométrique.

La fertilité ovulaire est estimée par les paramètres P1 et P2.

La résistance à la verse, fonction du module de Young et de la force critique, définit la durée du cycle de culture.

Les techniques d'estimation de la fertilité et de la résistance à la verse permettent le repérage rapide des sujets qui seront soumis aux épreuves clonales de triage et de confirmation, expérimentations qui détaillent productivité, rusticité, qualités chimiques et organoleptiques.

DUCEAU (P.).- Selection criteria for the improvement of Arabusta hybrids in Ivory Coast. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 8 p., 2 fig., 4 réf.

The selection carried out in Arabusta hybrids was based on five criteria : productivity, hardiness, caffeine content, fertility and resistance to lodging.

Their parents (Coffea canephora tetraploid and Coffea arabica) were screened in the same way, and weighed in accordance with their structure. The basis of the estimate of productivity included observations on the behaviour of the leading clone candidates during flowering, their earliness, and the alternance which they may exhibit.

Their hardiness was estimated by their resistance to drought, and their reaction to insect pest and plant disease hazards.

The determination of the caffeine content was accompanied by a grain size analysis.

Ovular fertility was estimated by the parameters P1 and P2.

The resistance to lodging, which depends on Young's modulus and the critical force, determines the duration of the cultural cycle.

The techniques for estimating fertility and resistance to lodging enabled the subjects which are to be used in screening and confirming clonal tests to be found rapidly, the results of these tests giving detailed information on productivity, hardiness, and chemical and organoleptic properties.

WALLER (G.R.), CUMBERLAND (C.F.).- Production élevée de caféine par des cultures stériles de tissus de Coffea arabica. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 8 p., 5 tabl., 1 fig., 16 réf.

Des cultures stériles de tissus de plantes de Coffea arabica produisent 10 - 400 fois plus de caféine par unité de poids de tissu que l'explant initial. La production de métabolites secondaires telle que la caféine par une culture stérile de tissu végétal est généralement assez basse ; ainsi, cette découverte de production importante de caféine par des cultures stériles de tissus de Coffea arabica est unique. Cette méthode biologique de production d'un produit naturel devrait être étendue à d'autres types importants de plantes.

WALLER (G.R.), CUMBERLAND (C.F.).- High production of caffeine by sterile tissue cultures of Coffea arabica. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 8 p., 5 tabl., 1 fig., 16 réf.

Sterile tissue cultures of Coffea arabica plants produce 10 - 400 times as much caffeine per unit weight of tissue as did the original starting explant material. The production by sterile plant tissue culture of secondary metabolites, such as caffeine is generally quite low ; thus this discovery of high production of caffeine by Coffea arabica sterile tissue cultures is unique. This biological method of production of a natural product might be extended to other important types of plants.

WALLER (G.R.), CHOU (C.H.).- Composés allélopathiques du Coffea arabica : caféine, diméthylxanthines et composés phénoliques végétaux. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 8 p., 4 tabl., 4 fig., 25 réf.

La caféine, la théobromine, la théophylline et la paraxanthine (alcaloïdes) sont produites par les caféiers (Coffea arabica) et on a montré qu'elles ont un effet allélopathique prononcé sur les semences du raygrass, de la fétuque et de la laitue. Sept composés phénoliques du caféier ont également présenté un effet allélopathique. Les onze substances ont été identifiées par chromatographie sur papier et en couche mince et par spectrométrie de masse. C'est la première fois que la présence de paraxanthine est mentionnée chez Coffea arabica. Il y a une absence presque totale d'information concernant l'effet allélopathique de Coffea arabica, l'une des principales plantes productrices d'une boisson consommée par l'homme. En outre, des substances allélopathiques ont été détectées dans les tissus des fruits, des feuilles, des tiges et des racines du caféier ; au cours d'une conférence très récente sur l'écologie, Anaya *et al.* (A.A. Anaya, S. del Amo, G. Roy - Ocotla et L.M. Oritx, Abst. 2^eème Congrès Int. Ecol., Jérusalem, Israël, 10-16 septembre 1978, vol. I, p. 9) ont remarqué qu'il y a une allélopathie dans les plantations de caféiers, mais qu'aucun des composés responsables n'avait été isolé. Nous montrons que les feuilles tombées possèdent des effets phytotoxiques remarquables sur la germination des graines et la croissance des racines de toutes les espèces mises à l'épreuve, effets se situant entre 41 % et 100 % d'inhibition pour la germination des graines et entre 68 % et 100 % pour la croissance des racines. Ces résultats laissent penser que l'allélopathie a un rôle important dans le développement, la productivité et la longévité des plantations de caféiers dans le monde entier.

WALLER (G.R.), CHOU (C.H.).- Allelopathic constituents of Coffea arabica : caffeine, dimethylxanthines and plant phenolics. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 8 p., 4 tabl., 4 fig., 25 réf.

Caffeine, theobromine, theophylline and paraxanthine --- all alkaloids --- are produced by coffee plants (Coffea arabica) and have been shown to have a pronounced allelopathic effect on rye grass, fescue, and lettuce seed. Seven plant phenolic compounds were found to have an allelopathic effect as well. The eleven substances were identified by paper and thin-layer chromatography and mass spectrometry. This is the first report of the occurrence of paraxanthine in Coffea arabica. There is almost a total lack of information regarding the allelopathic effect of Coffea arabica, one of the most important beverage plants for human beings. Furthermore, allelopathic substances have been detected in coffee fruits, leaves, stems, and root tissues ; in a very recent conference on ecology, Anaya *et al.* (A.A. Anaya, S. del Amo, G. Roy - Ocotla and L.M. Oritx, Abst. Papers 2nd Int. Cong. Ecol., Jerusalem, Israel, September 10-16, 1978, Vol. 1., p. 9) noted that allelopathy occurs in coffee plantations, but none of the compounds responsible were isolated. We show that fallen leaves exhibit remarkable phytotoxic effects on seed germination and root growth of all tested species, ranging from 41 % to 100 % inhibition for seed germination and 68 % to 100 % for radicle growth. These findings suggest that allelopathy has an important role in the development, productivity, and longevity of coffee plantations throughout the world.

WALLER (G.R.), SUZUKI (T.), ROBERTS (M.F.).- Métabolisme de la caféine par des extraits acellulaires de Coffea arabica. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 9 p., 4 tabl., 3 fig., 21 réf.

Des extraits acellulaires préparés à partir de plantules, de cerises de caféiers non mûres et de cerises partiellement mûres ont montré que seuls les fruits verts non mûrs possédaient une activité méthyltransférase et 7-méthyl-N-nucléoside hydrolasique. Les extraits acellulaires ont catalysé le transfert des groupes méthyl de la S-adenosyl-L-(¹⁴CH₃)-méthionine vers la 7-méthylxanthine et la 7-méthylxanthosine, produisant la théobromine, et vers la théobromine produisant la caféine. Les deux méthyltransférases ont montré un pH maximal de 8,5 et des réactions semblables vis-à-vis des chélateurs de métaux, des réactifs thiols et des ions Mg²⁺ qui sont légèrement stimulants, bien que non indispensables, pour l'activité des enzymes. La paraxanthine s'est révélée être la plus active des méthylxanthines en tant qu'accepteurs de méthyl ; cependant sa formation à partir des 1-méthylxanthines et de la 7-méthylxanthine n'était pas décelable. Les valeurs Km apparentes sont les suivantes : 7-méthylxanthine 0,2 mM, théobromine 0,2 mM, paraxanthine 0,07 mM et S-adenosyl-L-méthionine 0,01 mM avec chaque substrat. Nous affirmons pour la première fois que des systèmes acellulaires obtenus à partir de cultures stériles de tissu de cal de Coffea arabica peuvent former de la caféine de la même manière. Les résultats permettent de penser que la voie de la biosynthèse de la caféine chez Coffea arabica est la suivante : 7-méthylxanthosine → 7-méthylxanthine → théobromine → caféine. Des résultats d'expériences récentes montrent que la (2-¹⁴C)-xanthine peut être métabolisée en urée par des extraits acellulaires de cultures de tissu de cal et de petits fruits verts de Coffea arabica, comme cela a déjà été observé dans des expériences sur Camellia sinensis.

WALLER (G.R.), SUZUKI (T.), ROBERTS (M.F.).- Cell-free metabolism of caffeine in Coffea arabica. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 9 p., 4 tabl., 3 fig., 21 réf.

Cell-free extracts prepared from seedlings, partially ripe and unripe coffee fruits showed that only the unripe green fruits contained significant methyltransferase and 7-methyl-N⁹-nucleoside hydrolase activity. The cell-free extracts catalysed the transfer of methyl groups from S-adenosyl-L-(¹⁴CH₃)-methionine to 7-methylxanthine, and 7-methylxanthosine, producing theobromine and to theobromine producing caffeine. The two methyltransferases exhibited a sharp pH max at 8.5 and a similar pattern of effects with metal chelators, thiol reagents, and Mg²⁺ ions, which were slightly stimulating though not essential to enzyme activity. Paraxanthine was shown to be the most active among methylxanthines as methyl acceptors ; however its formation from 1-methylxanthines and 7-methylxanthine was not detectable. The apparent Km values are as follows: 7-methylxanthine 0.2 mM, theobromine 0.2 mM, paraxanthine 0.07 mM and S-adenosyl-L-methionine with each substrate 0.01 mM. We report for the first time that cell-free systems from sterile callus tissue cultures of C. arabica can form caffeine in an identical manner. The results suggest the pathway for caffeine biosynthesis in Coffea arabica is as follows : 7-methylxanthosine → 7-methylxanthine → theobromine → caffeine. Recently, we have obtained tentative results that (2-¹⁴C)-xanthine can be metabolized to urea by cell-free extracts of small green fruits and callus tissue cultures of C. arabica similar to the Camellia sinensis experiments.

SNOECK (J.), REFFYE (Ph. de).- Influence des engrais sur l'architecture et la croissance du caféier Robusta. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 9 p., 1 fig., 3 graph., 4 tabl., 2 réf.

En Côte d'Ivoire, sur divers types de sol, l'engrais azoté donne des accroissements de récolte très significatifs et rentables. Il a paru intéressant de tenter de déterminer quelle était la part du développement végétatif des caféiers dans ces augmentations.

L'étude de la croissance de troncs âgés de dix-neuf mois, portant leur première récolte après le recépage, montre une excellente relation entre le nombre total de noeuds fructifères et cette récolte. Les deux doses d'azote permettent d'accroître le nombre de noeuds fructifères respectivement de 27 % et de 43 %, tandis que la production augmente de 32 % et de 62 %.

Les courbes de croissance et la simulation mathématique montrent clairement la part du développement accru des caféiers dans les surcroûts de récolte enregistrés.

SNOECK (J.), REFFYE (Ph. de).- Influence of fertilizers on the architecture and growth of Robusta coffee tree. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 9 p., 1 fig., 3 graph., 4 tabl., 2 réf.

In the Ivory Coast, on different soil types, nitrogen fertilizer increases significantly and economically the yield of coffee trees. It seemed of interest to determine what was the part of vegetative development in these increments.

The growth study of stems 19 months old, bearing their first crop after cutting back, shows a very good relation between the total number of bearing nodes and this hanging crop. The two levels of nitrogen increase the number of bearing nodes by 27 % and 43 % respectively, while the corresponding yield increases are 32 % and 62 %.

The growth curves and the mathematical simulation clearly show the part of the increased development of the coffee trees responsible for the yield increments.

BETTENCOURT (A.J.), LOPES (J.), GODINHO (I.L.).- Amélioration génétique du caféier. Transfert de facteurs de résistance à Hemileia vastatrix Berk. et Br. à des cultivars de Coffea arabica à rendements élevés. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 12 p., 6 tabl., 27 réf.

Des caféiers porteurs de facteurs génétiques responsables de la résistance aux races de H. vastatrix ont été croisés avec des arbres de quarante-quatre cultivars ou sélections de C. arabica en vue d'obtenir, à partir de la génération F₃, des recombinaisons dotées aussi bien de la résistance aux races du champignon que d'une bonne production.

De 1960 à 1979, ont été analysés, pour la résistance à la rouille et d'autres caractéristiques agronomiques, 6.853 plantules de caféiers issues de 308 populations F₁ (200 hybrides simples, 83 rétrocroisements et 25 hybrides complexes) et 15.298 plantules de caféiers issues de 370 descendances F₂ à F₅.

Etant donné les résultats obtenus concernant la résistance à la rouille, l'adaptation et le rendement, il a été possible, par sélections successives, de choisir quelques descendances très prometteuses, soit celles des hybrides CIFC HW 26 et CIFC H.46 (Caturra Vermelho x Hybride de Timor), CIFC H.361 (Villa Sarchi x Hybride de Timor) et CIFC H.528 (BC₁ de CIFC HW 26/13 avec le Catuai) présentant toutes la résistance aux races connues de rouille (groupe A) ; CIFC H.275 (Caturra Vermelho x S.795) et CIFC 315 (Mundo Novo x S.795), dont la résistance est assurée par le facteur SH₃, associé ou non à SH₂; CIFC 101 (S.333 x Dilla et Alghe) possédant les facteurs SH₁ et SH₂ ; et CIFC H.175 (Caturra Vermelho x S.12 Kaffa) porteuses des facteurs SH₁ et SH₄.

Il y a de fortes chances pour que les sélections mentionnées puissent être exploitées à l'échelle industrielle étant donné les bonnes caractéristiques agronomiques de certaines de leurs descendances F₃, F₄ et F₅. Parmi celles-ci, les plus importantes sont celles issues des hybrides CIFC HW 26 et CIFC H.46 (Caturra Vermelho x Hybride de Timor) porteuses du groupe A de résistance, homozygotes pour l'allèle Ct (port réduit) et présentant des caractéristiques de rendement, vigueur et qualité à la tasse semblables à celles des variétés traditionnelles d'Arabica. Ces sélections sont, à l'heure actuelle, en essais de vulgarisation au Brésil où elles sont dénommées Catimor.

BETTENCOURT (A.J.), LOPES (J.), GODINHO (I.L.).- Genetic improvement of coffee. Transfer of factors for resistance to Hemileia vastatrix Berk. & Br. into high yielding cultivars of Coffea arabica L. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 12 p., 6 tabl., 27 réf.

Coffee trees possessing genetic factors which condition the resistance to the races of Hemileia vastatrix were crossed with trees of 44 cultivars or selections of Coffea arabica with the aim to obtain, from the F₃ onwards, recombinations with resistance to the fungus as well as good yield.

From 1960 to 1979 were analysed for rust resistance and agronomic traits 6853 coffee seedlings from 308 F₁ populations (200 simple hybrids, 83 backcrosses and 25 complex hybrids), as well as 15298 coffee seedlings from 370 progenies F₂ to F₅.

With a basis on the analysis for rust resistance and on the data for adaptation and yield, it was possible through successive selections, to choose some very promising progenies namely those derived from the hybrids CIFC HW 26 and CIFC H 46 (Caturra Vermelho x Híbrido de Timor), CIFC H 361 (Villa Sarchi x Híbrido de Timor) and CIFC H 528 (BC₁ of CIFC HW 26/13 to Catuai), all with resistance to the known rust races (group A) ; CIFC H 275 (Caturra Vermelho x S.795) and CIFC 315 (Mundo Novo x S.795) with the SH₃ factor single or associated to SH₂ ; CIFC 101 (S.333 x Dilla & Alge) with the factors SH₁ and SH₂ ; and CIFC H 175 (Caturra Vermelho x S.12 Kaffa) with the factors SH₁ and SH₄.

These selections possess good prospectives of being used in commercial scale, in view of the good agronomic characteristics of some progenies F₃, F₄ and F₅. Of particular importance are those derived from the hybrids CIFC HW 26 and CIFC H 46 (Caturra Vermelho x Híbrido de Timor) with resistance of group A, homozygosity for the allele Ct (short size) and with yield, vigour and quality of liquor identical to those of the traditional Arabicas. They are under extensive experimentation in Brasil where they were designated as Catimor.

CARNEIRO (M.F.I.N.).- Mutation provoquée par voie chimique de la race I de Hemileia vastatrix Berk. et Br. en race XXIV. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 4 p., 1 tabl., 14 réf.

Quatre échantillons de 10 mg d'urédospores de l'isolat d'une seule spore 1285 (race I de Hemileia vastatrix) ont été soumis à un traitement au méthane éthyle sulfonate (EMS) pendant 2 h aux concentrations suivantes : A - 0,5 x 10⁻²M, B - 1,0 x 10⁻²M, C - 1,25 x 10⁻²M, et D - 1,5 x 10⁻²M. Après le traitement, les urédospores ont été inoculées à des caféiers sensibles. Les inoculum soumis aux concentrations A, B et C d'EMS ont donné des réactions de sensibilité d'un type semblable à celui des réactions des témoins, tandis que l'inoculum soumis à la concentration D a donné aussi bien des réactions typiques de résistance que des réactions de sensibilité caractérisées par des pustules de dimension plus petite. A partir de ces pustules on a obtenu un nouvel isolat qui, après inoculation sur les identificateurs, s'est révélé être différent de l'isolat initial et appartenir à la race XXIV de H. vastatrix.

CARNEIRO (M.F.I.N.).- Chemical induced mutation of race I of Hemileia vastatrix Berk. & Br. into race XXIV. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 4 p., 1 tabl., 14 réf.

Four 10 mg uredospore samples of the single spore isolate 1285 (race I of H. vastatrix) were submitted to ethyl methane sulphonate (EMS) treatment during 2 hours at the following concentrations : A - 0.5 x 10⁻²M, B - 1.0 x 10⁻²M, C - 1.25 x 10⁻²M and D - 1.5 x 10⁻²M. After the treatment, the uredospores were inoculated on susceptible coffee plants. Inoculum submitted to EMS concentrations A, B, and C produced susceptible reaction types similar to those of the controls, whereas inoculum from concentration D produced both resistant reaction types and some susceptible ones characterized by pustules of smaller size. From these pustules a new isolate was obtained which, after the inoculation on the differentials, proved to be different from the original and belong to race XXIV of H. vastatrix.

RODRIGUES Jr (C.J.).- Résistance de certaines espèces de caféier appartenant aux Mozambicoffea à la rouille Hemileia vastatrix Berk. et Br. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 3 p., 2 réf.

Certaines espèces de caféier appartenant aux Mozambicoffea, telles que C. eugenioides, C. racemosa, C. kivuensis, C. zanguebariae et C. salvatrix, ont été inoculées à Oeiras avec différentes races physiologiques de Hemileia vastatrix Berk. et Br. Les tests de sélection concernant C. eugenioides et C. racemosa, espèces les mieux représentées quant au nombre d'échantillons reçus et au nombre de plantes inoculées, ont révélé que la plupart des plantes de la première espèce sont résistantes et que la plupart des plantes de la seconde sont sensibles. L'observation de caféiers C. racemosa ayant des réactions de résistance à H. vastatrix est contraire à la notion généralisée de sa sensibilité totale à la rouille. La seule plante de C. zanguebariae mise à l'épreuve était apparemment résistante. Certaines plantes de C. kivuensis se sont révélées sensibles et d'autres résistantes. Quant aux plantules de C. salvatrix mises à l'épreuve, certaines étaient sensibles et d'autres n'ont pu être classées étant donné la faiblesse des réactions observées.

RODRIGUES Jr (C.J.).- Resistance to Hemileia vastatrix Berk. & Br. of some Mozambicoffea coffee species. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 3 p., 2 réf.

Some of the Mozambicoffea coffee species such as C. eugenioides, C. racemosa, C. kivuensis, C. zanguebariae and C. salvatrix have been inoculated at Oeiras with different physiologic races of Hemileia vastatrix. The screening tests of C. eugenioides and C. racemosa, the best represented species regarding the number of accessions received and the number of plants inoculated, have shown that the former presents most of the plants with resistance, and the latter most of the plants with susceptibility. The finding of C. racemosa plants showing reactions of resistance to H. vastatrix is contrary to the generalized idea of its fully susceptibility. The single plant of C. zanguebariae tested was apparently resistant. C. kivuensis showed some plants susceptible and some with resistance. As to the C. salvatrix seedlings tested, some were susceptible and others indefinite in view of the inconsistency of the reactions presented.

Van der VOSSSEN (H.A.M.).- Effet stimulant des fongicides sur le caféier Arabica au Kenya. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 4 p., 5 réf.

Des pulvérisations de fongicides sur caféier Arabica, au Kenya, provoquent des accroissements notables du rendement, même quand les arbres ne sont pas très malades. Le premier effet est un retard de deux à trois mois dans la chute des feuilles, car les fongicides semblent éliminer la microflore de la surface des feuilles, qui accroît les teneurs en éthylène endogène et, par conséquent, provoque la sénescence des feuilles et leur abscission prématurée, spécialement sous conditions de déficit hydrique. Il y a des différences notables entre génotypes pour les seuils d'abscission foliaire, comme l'indique l'abscission provoquée par le CEPA, mais, parmi le matériel génétique de C. arabica disponible, un très petit nombre de génotypes se sont révélés plus résistants à la chute prématurée des feuilles que le cv. SL 28 sélectionné localement. On en conclut que les pulvérisations "stimulantes" de fongicides seront toujours efficaces au Kenya en accroissant les rendements, même après l'introduction de nouveaux cultivars résistant aux maladies. Des pulvérisations occasionnelles de fongicides accroissent de façon dramatique l'intensité de l'antracnose des baies et de la rouille des feuilles, mais seulement chez les génotypes sensibles. De telles pulvérisations seraient très utiles en programmes de sélection pour différencier plus efficacement les génotypes sensibles et résistants en champs de sélection.

Van der VOSSEN (H.A.M.) - Tonic effect of fungicides on Arabica coffee in Kenya. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 4 p., 5 réf.

Fungicide sprays on Arabica coffee in Kenya cause marked increases in yield even when the trees are not noticeably diseased. The initial effect is a 2 - 3 months delay in leaf fall, because fungicides appear to remove the leaf surface microflora, which causes increased levels of endogenous ethylene and consequently induce the leaves to senesce and abscise prematurely especially under conditions of water stress. There were marked genotypic differences in thresholds for leaf abscission as indicated by CEPA - induced abscission, but in the available germ plasm of C. arabica very few genotypes were more resistant to premature leaf fall than the locally selected cv SL 28. It is concluded that "tonic" sprays of fungicide will continue to be effective in Kenya in increasing yield even after the introduction of new disease-resistant cultivars. Occasional fungicide sprays also dramatically increase the severity of coffee berry disease and leaf rust but only on susceptible genotypes. Such sprays were found to be very useful in the breeding programme to differentiate more effectively resistant and susceptible genotypes in selection fields.

SIEVERS (S.), ABLANQUE (E.), BAUTISTA (E.), CHAPARRO (F.) et al. - Relations entre génétique et chimie dans le système Coffea spp./Hemileia vastatrix. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 10 p., 5 fig., 2 tabl., 12 réf.

La connaissance fondamentale de la composition foliaire des plantes pourrait être une nécessité préalable à l'étude de la résistance à la rouille des feuilles Hemileia vastatrix et des phénomènes d'interactions plante - pathogène.

Nous essayons d'établir des corrélations entre la génétique et les constituants foliaires en comparant, à l'aide de méthodes physicochimiques, biochimiques et de physiologie végétale, des feuilles saines de différents génotypes de caféier.

Nous avons étudié, par spectrométrie de masse des produits de pyrolyse, les caractéristiques de la pyrolyse de feuilles saines de génotypes sensibles et résistants de caféiers. Nous avons également comparé à l'aide de cette technique quatre races de H. vastatrix et des échantillons de feuilles d'un génotype sensible à différents stades d'infection.

Les teneurs des feuilles de caféier en éléments biologiques ont été estimées par spectrométrie d'émission optique couplée à une source plasma et par analyse instrumentale par activation thermique des neutrons. Les composés volatils des feuilles de caféier ont été séparés et identifiés par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse.

Les activités oxydantes des enzymes sont estimées en comparant des extraits foliaires de différents génotypes de caféiers.

Nous pourrions obtenir, grâce à des méthodes de cultures de tissus mises au point, un matériel végétal homogène cultivé sous conditions contrôlées.

SIEVERS (S.), ABLANQUE (E.), BAUTISTA (E.), CHAPARRO (F.) et al. - Relationship between genetics and chemistry in the system Coffea spp./Hemileia vastatrix. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 10 p., 5 fig., 2 tabl., 12 réf.

Basic knowledge of plant (leaf) composition could be prerequisite to study resistance against leaf rust (H. vastatrix) and the phenomena of plant-pathogen interaction. Comparing healthy leaves from different coffee genotypes with physico-chemical, biochemical and plant physiological methods, we try to establish correlations between genetics and components of leaves.

The possibility of using pyrolysis-mass spectrometry to establish characteristic pyrolysis patterns of healthy leaves from susceptible and resistant coffee genotypes was studied. Also some races of H. vastatrix and leaf samples from different genotypes at different stages of infection were compared with this technique.

Bioelement contents of coffee leaves were estimated using plasma optical emission spectrometry and thermal neutron activation instrumental analysis. Volatile compounds of coffee leaves

were separated and will be identified using gas chromatography - mass spectrometry.

Oxidative enzyme activities were estimated comparing leaf extracts from different coffee genotypes.

Tissue culture methods have been established and will provide us with homogeneous plant material grown under controlled conditions.

SIEVERS (S.), ABLANQUE (E.), BAUTISTA (E.), CHAPARRO (F.) *et al.* - Relación entre genética y química en el sistema *Coffea* spp./*Hemileia vastatrix*. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 10 p., 5 fig., 2 tabl., 12 réf.

Conocimientos básicos sobre la composición química de las plantas (hojas) podrían ser un prerrequisito para estudiar resistencia contra la roya (*H. vastatrix*) y los fenómenos de la interacción planta - patógeno. Comparando hojas sanas de diferentes genotipos de café tratamos de establecer una correlación entre la genética y los componentes de la hoja utilizando métodos físico-químicos, bioquímicos y fitofisiológicos. La posibilidad de usar pirólisis - espectrometría de masas para establecer patrones característicos de pirólisis fue estudiada usando hojas sanas de genotipos de café susceptibles y resistentes. Además más razas de *H. vastatrix* y muestras de hojas de varios genotipos en diferentes estadios después de la infección fueron comparados con esta técnica.

El contenido de bioelementos en hojas de café fue estimado usando espectrometría óptica de emisión de plasma y análisis instrumental de activación de neutrones térmicos.

Compuestos separados por cromatografía de gases se identificaron por espectrometría de masas.

Las actividades de enzimas oxidativas fueron estimadas comparando extractos de hojas de diferentes genotipos de café. Los métodos de cultivo de tejido fueron establecidos y nos proveerán material vegetal homogéneo y obtenido en condiciones controladas.

SIEVERS (S.), ABLANQUE (E.), BAUTISTA (E.), CHAPARRO (F.) *et al.* - Beziehungen zwischen Genetik und Chemie im System *Coffea* spp./*Hemileia vastatrix*. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 10 p., 5 fig., 2 tabl., 12 réf.

Gründliche Kenntnisse über die Zusammensetzung der Pflanzen (Blätter) könnten eine Voraussetzung für das Studium der Resistenz gegen Kaffeeroß (*H. vastatrix*) und die Phänomene der Wechselwirkungen zwischen Pflanze und Pathogen sein. Indem wir gesunde Blätter verschiedener Kaffeegenotypen mit physikochemischen, biochemischen und pflanzenphysiologischen Methoden vergleichen, versuchen wir eine Korrelation zwischen Genetik und Blattkomponenten zu finden.

Es wurde die Möglichkeit studiert, Pyrolyse-Massenspektrometrie für die Auffindung charakteristischer Pyrolysemuster gesunder Blätter von suszeptiblen und resistenten Kaffeearten einzusetzen. Weiterhin wurden mit dieser Technik einige Rassen von *H. vastatrix* und Blattproben verschiedener Genotypen in verschiedenen Stadien nach Infektion verglichen.

Der Bioelementgehalt von Kaffeeblättern wurde mit optischer Plasmaemissionspektrometrie und mit thermischer Neutronenaktivierungsanalyse bestimmt. Die flüchtigen Komponenten der Kaffeeblätter wurden gaschromatographisch aufgetrennt und werden mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert.

In Blätterextrakten verschiedener Kaffeegenotypen wurden die Aktivitäten oxidativer Enzyme bestimmt. Gewebekulturmethoden wurden eingeführt und werden uns mit unter kontrollierten Bedingungen angezogenem homogenem Pflanzenmaterial für biochemische Untersuchungen versorgen.

WATSON (A.G.) - Mécanisation de la production du café. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 6 p., 2 diag., 4 graph., 2 photos, 1 tabl.

La société "FMC do Brasil" s'est engagée en 1978 dans un programme de fabrication de matériel destiné à la mécanisation des différentes opérations que comporte la production du café. Le premier objectif était la mécanisation de la récolte.

Deux prototypes furent construits et essayés en 1979. L'un est une machine qui enjambe la rangée de caféiers ; elle secoue et récolte les fruits. L'autre est une machine tirée par un tracteur qui secoue seulement les cerises.

Le mécanisme destiné à détacher les fruits consiste en un cylindre de 2 m de long, porteur d'anneaux de doigts en fibre de verre longs de 60 cm, qui pénètre dans les arbustes.

Les essais ont montré que lorsque les doigts oscillent avec une amplitude de 30 mm, à un rythme allant de 800 à 1.150 cpm, 95% des cerises des variétés Catuaí et Mundo Novo étaient détachés.

Le mécanisme destiné à recueillir les cerises, dans la machine enjambeuse, consiste en un plateau transporteur coulissant qui enserme la base des arbres de façon à former un tapis uniforme sous les branches. Les essais ont montré que 90 à 99 % des fruits détachés des variétés Catuaí et Mundo Novo étaient recueillis.

La société FMC se propose en cours de l'année 1980 de procéder à des récoltes à l'échelle commerciale avec des modèles améliorés, et de commencer la commercialisation des récolteuses en 1981.

Les plans d'avenir requièrent la mise au point d'équipements destinés à mécaniser d'autres opérations impliquées dans la production du café, à savoir les traitements phytosanitaires, la taille, l'entretien du sol ou le paillage et l'épandage des engrais, en partant du châssis enjambeur auto-propulsé comme élément de base.

WATSON (A.G.), - The mechanization of coffee production. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 6 p., 2 diag., 4 graph., 2 photos, 1 tabl.

FMC do Brasil decided in 1978 to embark on a program to produce equipment to mechanize operations in coffee production.

Our first objective was to mechanize the harvest operation.

Two prototypes were built and tested in 1979. One is an "over-the-row" machine which shakes off and collects the fruit and the other is a tractor pulled machine which only shakes off the fruit.

The fruit-removal mechanism consists of a 2m long cylinder bearing rings of fiber glass fingers, 60cm long, which project into the bushes. Tests showed that when the fingers oscillate with a 30mm amplitude within a range of 800 to 1.150 cpm, 95 % of the fruit on varieties Catuaí and Mundo Novo were removed.

The fruit-catching mechanism, on the over-the-row machine, consists of a sliding tray conveyor which closes around the base of the bushes to form a complete carpet under the branches. Tests showed that 90 to 99 % of the fruit shaken off varieties Catuaí and Mundo Novo were caught.

During 1980, FMC plans to carry out commercial harvesting with improved models and begin marketing harvesters in 1981.

Future plans call for development of equipment to mechanize other operations in coffee production such as, spraying, pruning, cultivation or mulching and fertilizer applications using the self propelled, over-the-row frame as the basic vehicle.

JACQUET (M.), VINCENT (J.-C.), CAYLA (L.), ELMALEH (C.), GBAHOUE (L.), HAHN (J.). - Production de gaz méthane par digestion anaérobie de la pulpe de café. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 16 p., 6 fig., 5 tabl., 7 réf.

La digestion anaérobie de la pulpe de café peut fournir du méthane et permet de couvrir une partie des besoins énergétiques des centres de traitement. Les résidus de digestion sont utilisables comme compost.

Deux séries d'expérimentation ont été conduites et on a déterminé qu'il était nécessaire de soumettre la pulpe à une aération préalable avant la mise en route de la digestion. La phase de latence est relativement longue quand on laisse la digestion se mettre en route spontanément (20 jours). Il est possible de la réduire par apport d'un ensemencement.

En fonctionnement discontinu, le dégagement du gaz combustible dure environ 70 jours, la quantité de gaz produite atteint 138 l/kg de matière sèche introduite. Le gaz contient 70 % de méthane en moyenne.

Les analyses élémentaires effectuées sur la pulpe permettent de déterminer que la proportion du carbone disponible effectivement converti en gaz reste faible (16 %). Cette dernière considération nous amène à orienter la suite de cette étude vers la recherche d'une méthode de pré-traitement de la pulpe (chimique ou biochimique) et d'adaptation de la microflore conduisant à une dégradation plus poussée du substrat.

JACQUET (M.), VINCENT (J.-C.), CAYLA (L.), ELMALEH (C.), GBAHOUE (L.), HAHN (J.).- Production of methane gas by anaerobic digestion of coffee pulp. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 16 p., 6 fig., 5 tabl., 7 réf.

The anaerobic digestion of coffee pulp can give methane and enable part of the energy requirements of processing centres to be covered. The digestion residues can be used as compost.

Two series of experiments were carried out and it was found that the pulp had to be subjected to prior aeration before starting up the digestion process. The latent phase is relatively long when the digestion process is allowed to start spontaneously (20 days). It is possible to reduce this time by seeding.

In batch operation, the liberation of combustible gas lasts about 70 days, the quantity of gas produced reaching 138 l/kg of the dry matter introduced. The gas contains 70 % of methane on the average.

Analyses of the pulp revealed that the proportion of the available carbon actually converted into gas remained low (16 %). This led us to direct the continuation of this study toward a search for a pulp pre-treatment method (chemical or biochemical) and an adaptation of the microflora to obtain a more complete degradation of the substrate.

ROLZ (C.).- Biotechnologie dans le traitement du café vert. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 8 p., 2 fig., 26 réf.

La fermentation et le séchage du café sont des opérations clés du traitement des cafés verts par voie humide. L'optimisation de ces étapes doit comprendre des dispositifs appropriés de traitement de l'eau et d'utilisation des sous-produits, puisqu'à notre époque la protection du milieu environnant doit être particulièrement observée, les sources d'énergie fossile sont beaucoup plus chères et la demande d'aliments pour animaux a augmenté. La solution de ce problème nécessite l'évaluation des différentes possibilités. Ce travail décrit les possibilités étudiées à l'Institut de Recherche d'Amérique Centrale pour l'Industrie (ICAITI) et qui comprennent : un séchoir à café autonome consommant peu d'énergie, le pressage de la pulpe de café, l'utilisation en compost, l'ensilage, la production de biomasse par voie microbienne dans les substrats de fermentation solides et sous eau, la production de biogaz et des systèmes non traditionnels de traitement de l'eau.

ROLZ (C.).- Biotechnology in green coffee processing. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 8 p., 2 fig., 26 réf.

Coffee fermentation and drying are key unit operations during the processing of washed green coffees. Their operational optimization should include appropriate schemes of water usage and by-products utilization, specially now when environmental protection is being enforced, fossil fuel energy sources are much more expensive and demand for animal feed has increased. Solution to this problem calls for the evaluation of available alternatives. This work describes those alternatives being developed at ICAITI and which include : low cost-energy self sufficient coffee dryer, coffee pulp pressing, composting, ensilage, microbial biomass production in submerged and solid substrate fermentations, biogas production and non-traditional water treatment systems.

KAMMACHER (P.).- Sur le comportement méiotique des dihaploïdes de Coffea arabica L. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 7 p., 4 fig., 1 tabl., 23 réf.

Du fait de l'origine allotétraploïde de C. arabica, les haploïdes qu'on peut obtenir dans cette espèce font partie de la catégorie des dihaploïdes segmentaires, formés de l'assemblage de deux génomes partiellement homologues. Le processus de la méiose est compliqué chez ces plantes par le fait que la formation de paires de chromosomes homologues est inopérante. Il existe cependant des possibilités d'associations de chromosomes, parmi lesquelles la conjugaison de chromosomes homéologues est particulièrement significative au point de vue génétique. Sous ce rapport, on a pu estimer d'après l'étude de 500 cellules observées chez cinq haploïdes différents que les deux génomes juxtaposés chez C. arabica ont des structures telles que leurs deux lots de 11 chromosomes s'associent à la méiose de manière à faire apparaître 17,42 univalents et 2,29 bivalents.

Il était déjà acquis que l'un de ces génomes reproduit la structure du génome C, qui est le génome de base de tous les Coffea diploïdes connus. Trois des chromosomes du second génome ont une contrepartie assez exacte dans le génome C, tandis que trois autres chromosomes y trouvent des partenaires avec un degré d'homologie résiduelle beaucoup plus faible.

Comme les deux génomes ne sont homéologues que pour une partie de leur garniture chromosomique on peut supposer qu'une différenciation prononcée était déjà installée au moment de la formation de l'allotétraploïde primitif dont est issu C. arabica. On peut admettre d'après les résultats de cette étude que le second génome de C. arabica provient non de Coffea, mais d'un genre affine à Coffea. Il est du reste possible que cette origine remonte à un taxon de Rubiacées sans survivant dans la nature actuelle, ce qui laisserait ouvert le problème des origines botaniques de C. arabica.

On a pu noter aussi que la stérilité des haploïdes de C. arabica n'est pas totale malgré les difficultés du passage des chromosomes à travers la méiose. Cette circonstance semble liée au fait qu'au cours de la méiose de ces dihaploïdes la condition euploïde est restaurée au départ du processus dans une faible proportion de cellules, mais les gamètes fonctionnels qui apparaissent de la sorte ne représentent que la restauration du patrimoine génétique de C. arabica.

KAMMACHER (P.).- On the meiotic behaviour of Coffea arabica dihaploids. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 7 p., 4 fig., 1 tabl., 23 réf.

Because of the allotetraploid origin of C. arabica, the haploids which can be obtained in this species are part of the category of segmentary dihaploids formed by the combination of two partially homologous genomes. The meiosis process is complicated in these plants by the fact that the formation of pairs of homologous chromosomes does not occur. There exist, however, several possibilities of chromosomes combinations, among which the conjugation of homologous chromosomes is particularly significant from the genetic point of view. In this context, it has been possible to estimate, on the basis of a study of 500 cells observed in five different haploids, that the two adjacent genomes in C. arabica have structures such that their two sets of 11 chromosomes combine during meiosis to give 17.42 univalents and 2.29 bivalents.

It was already known that one of these genomes reproduces the structure of genome C, which is the basic genome of all the known Coffea diploids. Three of the chromosomes of the second genome have quite an exact counterpart of the genome C, whereas the other three chromosomes find partners with a degree of residual homology which is much lower.

As these two genomes are homeologous only for a part of their chromosome complement, it can be supposed that pronounced differentiation was already installed at the time the original allotetraploid was formed, from which C. arabica was derived. It can be agreed that, following the results obtained in this study, the second genome of C. arabica does not come from Coffea, but a genus related to Coffea. It is moreover possible that this origin goes back to a Rubiaceae taxon without any survivors in nature at present, which would leave open the question of the botanical origins of C. arabica.

It was also be noted that the sterility of C. arabica haploids is not complete, despite the difficulties the chromosomes have going through meiosis. This circumstance seems to be linked to the fact that during the meiosis of these dihaploids, the euploid condition is restored at the beginning of the process in a small proportion of cells, but the functional gametes which appear in this way represent only a restoration of the genetic patrimony of C. arabica.

OROZCO-CASTAÑO (F.J.).- Características de la variedad Erecta-Cenicafé, nueva variedad de C. arabica. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 6 p., 6 tabl., 5 réf.

On a trouvé au Centre National de Recherche sur le Café (CENICAFE), dans le cadre d'un essai sur la variété Caturra du C. arabica, deux arbres de type Caturra présentant une croissance orthotrope presque verticale. On a effectué l'analyse génétique de cette caractéristique à l'aide de l'autofécondation et de croisements dirigés. L'étude des descendances obtenues par autofécondation a permis de conclure qu'un des arbres est homozygote pour le facteur croissance érigée. En outre, tous les croisements faits avec cet arbre ont présenté des branches érigées. On en a conclu que cette caractéristique est contrôlée par une paire de facteurs de dominance complète. Etant donné son origine et ses caractéristiques, il s'agit d'une nouvelle variété dont le génotype est ErErCtCt.

Les caractéristiques morphologiques de l'arbre et des feuilles ont été également étudiées chez les descendances de cette variété en les comparant à celles de la variété Caturra.

Il existe, dans presque tous les caractères étudiés, des différences avec la variété Caturra. La variété Erecta-Cenicafé a un port bas, mais légèrement supérieur à celui de la variété Caturra ; la largeur de la couronne de l'arbre est inférieure ; les feuilles sont plus grandes et arrondies ; l'angle de base de la feuille est plus grand ; la nervation et les domaties sont différentes. Le nombre de branches secondaires est légèrement inférieur et l'angle de sortie des branches primaires est très aigu.

A la fin de cette étude est présenté le schéma du programme d'amélioration de cette variété établi au Cenicafé, programme basé sur l'étude de la production des caractéristiques du grain et de l'introduction de la résistance à la rouille.

OROZCO-CASTAÑO (F.J.).- Characteristics of the variety Erecta-Cenicafé, a new variety of C. arabica. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 6 p., 6 tabl., 5 réf.

In an experiment at Cenicafé, using C. arabica trees (var. Caturra), two trees of the Caturra type were found to have orthotropic growth that was almost vertical. The genetic analysis of this characteristic was made by means of self pollination and guided crossings. By studying the progenies of the self pollination, it was concluded that one of the trees is homozygous for the factor of the erect growth of the branches. Also, all of the crossings made with this tree showed erected branches. It was concluded that this characteristic is controlled by a pair of factors of complete resistance. Because of its origin and characteristics, it is described as a new variety coded ErErCtCt.

The morphological characteristics of the tree and the leaves, in the progenies of this variety compared with the Caturra variety, were also studied.

In almost the totality of the studied characteristics existed differences with the Caturra variety. The Erect-Cenicafé has a small bearing but it is a little greater than the Caturra variety, the tree width is minor ; the leaves are larger and more circular ; the base angle of the leaves is more ample. The number of secondary branches is a little lower and the angle of the primary branches is very acute.

Finally, the scheme of improvement begun at Cenicafé, with this variety, based on the study of the production and bean characteristics and in the introduction of rust resistance is presented.

OROZCO-CASTAÑO (F.J.).- Características de la variedad Erecta-Cenicafé, nueva variedad de C. arabica. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 6 p., 6 tabl., 5 réf.

En Cenicafé se encontraron, dentro de un ensayo con la variedad Caturra de C. arabica, dos árboles de tipo Caturra con crecimiento ortotrópico casi vertical. Se hizo el análisis genético de esta característica mediante autofecundación y cruzamientos dirigidos. Por el estudio de las progenies de autofecundación pudo concluirse que uno de los árboles es homocigoto por el factor crecimiento erecto. Además, todos los cruzamientos hechos con este árbol, presentaron sus ramas erectas. Se concluyó que esta característica está controlada por un par de factores de dominancia completa. Por su origen y por sus características se describe como una nueva variedad con genotipo ErErCtCt.

Se estudiaron además las características morfológicas del árbol y las hojas, en las progenies de esta variedad, comparándolas con la variedad Caturra.

En casi la totalidad de los caracteres estudiados existen diferencias con la variedad Caturra. El Erecta-Cenicafé tiene porte bajo pero un poco mayor al de la variedad Caturra ; la anchura de la copa del árbol es menor ; las hojas son más grandes y redondas ; el ángulo de la base de la hoja es más amplio ; la nervación y las domacias son diferentes. El número de ramas secundarias es un poco menor y el ángulo de salida de las ramas primarias es muy agudo.

Finalmente, se presenta el esquema de mejoramiento iniciado en Cenicafé con esta variedad, basado en el estudio de la producción y características del grano y en la introducción de la resistencia a roya.

CASTILLO-ZAPATA (J.), MORENO-RUIZ (G.).- Sélection de croisements dérivés de l'hybride de Timor pour l'obtention de variétés améliorées de café pour la Colombie. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 15 p., 1 fig., 8 tabl., 24 réf.

L'hybride de Timor est une population d'origine interspécifique qui est intensivement utilisée en Colombie pour l'amélioration du caféier, particulièrement pour sa résistance à Hemileia vastatrix.

On étudie dans ce travail deux groupes de descendance F₃ du croisement du dit hybride avec la variété Caturra de Coffea arabica. On analyse, dans un de ceux-ci, la production de quatre récoltes, les caractéristiques des graines et la croissance des plantes chez seize descendance F₃ et quatre variétés témoins de type Caturra, semées en une localité. Dans l'autre groupe, on analyse la stabilité de la production au cours de trois récoltes chez sept descendance F₃ du même croisement et quatre variétés de type Caturra, semées en trois localités.

Dans les deux groupes d'essais, la production des descendance fut semblable à celle atteinte par les témoins, mais on a observé des différences significatives dans deux localités.

On a remarqué les hautes valeurs des variances des arbres au sein des descendance et de l'interaction "génotype x localité". La variance des arbres au sein des descendance fut plus élevée que chez les témoins ($P = 0,01$), considérés comme homogènes. Si cette dernière variation n'est due qu'au milieu environnant, on en déduit que 67 % de la variation entre "arbres" F₃ serait d'origine génétique et qu'une amélioration de 29 % de la production pourrait être obtenue en sélectionnant 5 % de la population.

Les descendance diffèrent beaucoup dans leur stabilité, mesurée par la contribution à la variance de l'interaction "génotype x localité", interaction qui varie de 0,5 % à 38 %. Les descendance les plus productives sont également les plus stables.

Bien que les caractéristiques de croissance montrent des différences entre descendance, avec une transmission héréditaire considérable, ces mesures biométriques n'étaient pas en corrélation avec la production. La vigueur a montré une faible transmission héréditaire.

La dimension des graines et les pourcentages de graines vides et de caracolis ont une transmission héréditaire moyenne ou élevée. La variation entre arbres fut très forte parmi les graines vides et les caracolis avec des coefficients de répétabilité de 0,85 à 0,56, bien que la dimension des graines fut homogène entre arbres avec une valeur de $R = 0,16$.

On conclut que les matériaux hybrides montrent un niveau de production semblable à celui des variétés type Caturra, mais la grande variation d'origine génétique qu'ils présentent, aussi bien entre les descendance qu'entre les arbres qui les constituent, permet de faire une sélection effective des types agronomiques supérieurs. Ces types sont exploités pour obtenir une variété "composée" et qui sera appelée variété "Colombia".

CASTILLO-ZAPATA (J.), MORENO-RUIZ (G.).- Selection of cross breeding derived from Timor hybrid in order to obtain better coffee varieties for Colombia. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 15 p., 1 fig., 8 tabl., 24 réf.

The Timor hybrid is a population of interspecific origin that is intensively used in Colombia for the improvement of coffee especially for its resistance to Hemileia vastatrix.

Two groups of F₃ progenies of the cross Caturra Coffea arabica x Timor hybrid are studied in this work. In one of these two groups, the production of 4 harvests, seed characteristics and growth measures of the plants are analyzed, in 16 progenies of F₃ and 4 varieties of control type Caturra planted in one location. In the other group, the stability of the production during 3 harvests is analyzed in 7 progenies of F₃ of the same cross and 4 varieties of Caturra type, planted in three locations.

In both groups of experiments, the production of progenies was similar to that obtained by the control but in two locations significant differences were observed.

The high values of tree variances within progenies and the interaction of "genotype x location" were distinctly seen. The tree variances within progenies were higher than in the control (P = 0.01), considered as homogeneous populations.

If this last variation is only ambiental, it is possible to infer that 67 per cent of the variation among trees of the F₃ progenies would be of genetic origin and would allow an increase of the production by 29 per cent by selecting 5 per cent of the population.

The progenies differ widely in relation with stability, measured by the contribution to the variance of the interaction of genotype x location which varied between 0.5 per cent to 38.0 per cent. The more productive progenies were also the more stable.

Although the characteristics of growth show differences among progenies with large heritability, these biometric measures were not correlated with the production, the vigor showed a low heritability.

The seed size and the percentages of empty seed and pea beans had a medium or high heritability. The variation among trees was very high in empty seed and pea berries, with a repetition coefficient of 0.85 and 0.56 respectively. The seed size was homogeneous among trees (R = 0.16).

It is concluded that the hybrid materials show a similar level of production with the Caturra type varieties, but the wide variation of genetic origins, that the materials showed both within progenies and among trees of the progenies, let us make an effective selection of superior agronomical types. These types are being used to make up a variety with a composed constitution denominated the "Colombia" variety.

CASTILLO-ZAPATA (J.), MORENO-RUIZ (G.).- Selección de cruzamientos derivados del híbrido de Timor, en la obtención de variedades mejoradas de café para Colombia. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 15 p., 1 fig., 8 tabl., 24 réf.

El Híbrido de Timor es una población de origen interespecífico que se está empleando intensamente en Colombia para el mejoramiento del café, especialmente por su resistencia a Hemileia vastatrix.

Se estudian en este trabajo dos grupos de progenies F₃ del cruzamiento de dicho híbrido con la variedad Caturra de Coffea arabica. En uno de ellos se analiza la producción de 4 cosechas, características de las semillas y medidas de crecimiento de las plantas, en 16 progenies F₃ y 4 variedades testigo de tipo Caturra, sembradas en una localidad. En el otro grupo se analiza la estabilidad de la producción durante 3 cosechas en 7 progenies F₃ del mismo cruzamiento y 4 variedades de tipo Caturra, sembradas en 3 localidades.

En ambos grupos de experimentos la producción de las progenies fue similar a la alcanzada por los testigos, pero en dos localidades se observaron diferencias significativas.

Se destacaron los altos valores de las varianzas de árboles dentro de las progenies y de la interacción de "genotipo por localidad". La varianza de árboles dentro de las progenies fue mayor que en los testigos (P = 0.01), considerados como homogéneos. Si esta última variación es únicamente ambiental, se deduce que el 67 % de la variación entre "árboles" F₃ sería de origen genético y permitiría un avance en la producción del 29 % al seleccionar el 5 % de la población.

Las progenies difieren ampliamente en su estabilidad, medida por la contribución a la varianza de la interacción de "genotipo por localidad", que osciló entre 0.5 % y 38.0 %. Las progenies más productivas fueron también las más estables.

Aunque las características del crecimiento muestran diferencias entre progenies, con heredabilidad considerable, estas medidas biométricas no estuvieron correlacionadas con la producción. El vigor mostró una baja heredabilidad.

El tamaño de la semilla y los porcentajes de semillas vacías y caracoles tuvieron heredabilidad mediana o alta. La variación entre árboles fue muy alta en las semillas vacías y caracoles, con coeficientes de repetibilidad de 0.85 y 0.56, mientras que el tamaño de las semillas fue homogéneo entre árboles, con un valor de $R = 0.16$.

Se concluye que los materiales híbridos muestran un nivel de producción similar al de las variedades tipo Caturra, pero la amplia variación de origen genético que presentan, tanto entre las progenies como entre los árboles que las forman, permite hacer una selección efectiva de tipos agronómicos superiores. Estos tipos se están aprovechando para conformar una variedad de naturaleza compuesta denominada variedad "Colombia".

CADENA-GÓMEZ (G.), BURITICÁ-CÉSPEDES (P.).- Expression de la résistance horizontale à la rouille (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.) chez *Coffea canephora* variété Conilón. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 12 p., 1 fig., 3 tabl., 28 réf.

Afin d'identifier l'expression de la résistance à *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. chez *Coffea canephora* variété Conilón, des observations ont été réalisées en champ et des expériences en laboratoire et en serre, à l'Institut agronomique de Campinas, S.P., Brésil, en 1977.

En champ, des différences quantitatives entre les plantes de la variété Conilón et celles de la variété Mundo Novo, utilisées comme témoins, ont été déterminées ; ces différences s'expriment par un indice d'infection moindre et un plus petit pourcentage de défoliation provoqués par la rouille.

Les coefficients de corrélation furent hautement significatifs entre les variables climatiques et biologiques étudiées, la variété étant le facteur déterminant du comportement de la maladie.

Trois essais ont été réalisés en serre pour lesquels des plantes de la variété Conilón obtenues à partir de semences ou par enracinement de boutures et des plantes de la variété Mundo Novo servant de témoins ont été utilisées. Une méthodologie d'inoculations quantitatives fut appliquée et on a déterminé l'indice d'infection (lésions par surface foliaire inoculée), l'indice de sporulation (pourcentage de pustules et production d'urédospores par pustule) et la période d'incubation.

On a trouvé des coefficients de corrélation hautement significatifs entre le pourcentage de pustules et la période d'incubation ($r = 0,54$ et $r = 0,81$) ; et également entre le nombre de spores par pustule et le nombre de lésions par cm^2 de surface foliaire ($r = 0,79$ et $r = 0,63$) dans les deux essais comportant des plantes multipliées par voie végétative.

En laboratoire, deux essais utilisant des disques de feuilles de Conilón et des disques de feuilles de Mundo Novo comme témoin ont été utilisés. L'indice d'infection par la rouille, l'indice de sporulation et la période d'incubation ont été déterminés. L'indice de sporulation et la période d'incubation (PI) sont en corrélation entre eux ($r = -0,58$ et $r = -0,64$) et avec la réaction des plantes en champ, un plus petit indice de sporulation correspondant aux plantes ayant des périodes d'incubation plus prolongées.

Les caractéristiques de résistance exprimées chez la variété Conilón en champ, en serre et en laboratoire ainsi que l'absence de gène de résistance verticale à la rouille, laissent supposer qu'une résistance horizontale existe chez cette variété.

CADENA-GÓMEZ (G.), BURITICÁ-CÉSPEDES (P.).- Expression of the horizontal resistance to rust (Hemileia vastatrix Berk. & Br.) in Coffea canephora var. Conilón. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 12 p., 1 fig., 3 tabl., 28 réf.

To identify the expression of the resistance to Hemileia vastatrix Berk. & Br. in Coffea canephora, Conilón variety, field observations, laboratory, and greenhouse experiments were realized during 1977 in the Campinas agronomic Institute, S.P., Brazil.

In the field, quantitative differences within Conilón plants and Mundo Novo plants (used as control) were determined, which were expressed by a lower index of infection to rust and a lower percentage of defoliation to rust.

The correlated coefficients were very significant within the climatical and biological variables studied. The variety was the determinant factor in the behaviour of the disease.

In the greenhouse three tests, using Conilón plants obtained from seeds and by the rooting of stem cuttings and Mundo Novo plants as the control, were realized. A methodology for quantitative inoculations was developed and the infection index was determined (lesions per inoculated foliar area), sporulation index (percentage of pustules and uredospore production) and incubation period.

Very significant correlated coefficients were obtained between : pustule percentage and the incubation period ($r = 0.54$ and $r = 0.81$) between uredospore per pustule and lesions per square centimeter of foliar area ($r = 0.79$ and $r = 0.63$).

In the laboratory, two experiments using discs from the leaves of Conilón and discs from those of Mundo Novo, as the control, were realized. The sporulation index and the incubation period were correlated to each other ($r = -0.58$ and $r = -0.64$) and with the plants reaction in the field, corresponding to a lower sporulation index for the plants with the incubation periods prolonged.

The resistance characteristics expressed by the Conilón variety in the field, the laboratory and greenhouse conditions and the absence of genes of vertical resistance to rust suggest the existence of horizontal resistance in that variety.

CADENA-GÓMEZ (G.), BURITICÁ-CÉSPEDES (P.).- Expresión de resistencia horizontal a la roya (Hemileia vastatrix Berk. y Br.) en Coffea canephora variedad Conilón. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 12 p., 1 fig., 3 tabl., 28 réf.

Para identificar la expresión de resistencia a Hemileia vastatrix Berk. y Br. en Coffea canephora, variedad Conilón, durante 1977 se realizaron observaciones de campo y experimentos de laboratorio y invernadero en el Instituto Agronómico de Campinas, S.P., Brasil.

En el campo se determinaron diferencias cuantitativas entre las plantas de Conilón y las de Mundo Novo utilizadas como testigo, que se expresan por un menor índice de infección y un porcentaje menor de defoliación a causa de la roya.

Los coeficientes de correlación fueron altamente significativos entre las variables climáticas y biológicas estudiadas, siendo la variedad el factor determinante del comportamiento de la enfermedad.

En el invernadero se realizaron tres ensayos utilizando plantas de Conilón obtenidas de semillas y por enraizamiento de estacas y plantas de Mundo Novo como testigo. Se desarrolló una metodología de inoculaciones cuantitativas y se determinó el índice de infección (lesiones por área foliar inoculada), índice de esporulación (porcentaje de pústulas y producción de uredosporas por pústula) y período de incubación (PI).

Se obtuvieron coeficientes de correlación altamente significativos entre : porcentaje de pústulas y PI ($r = 0.54$ y $r = 0.81$) ; entre esporas por pústula y lesiones por cm^2 de área foliar ($r = 0.79$ y $r = 0.63$) en los dos ensayos con plantas propagadas vegetativamente.

En el laboratorio se realizaron dos experimentos utilizando discos de hojas de Conilón y como testigo discos de Mundo Novo. Se determinó el índice de infección por roya, índice de esporulación y período de incubación. El índice de esporulación y el PI se correlacionaron entre sí ($r = -0.58$ y $r = -0.64$) y con la reacción de las plantas en el campo, correspondiendo un menor índice de esporulación para las plantas con períodos de incubación mas prolongados.

Las características de resistencia expresadas en la variedad Conilón en el campo, invernadero y laboratorio y la ausencia de genes de resistencia vertical a la roya, sugieren la existencia de resistencia horizontal en esa variedad.

IDOWU (O.L.).- Comparaison de la survie du scolyte des grains de café Hypothenemus (Stephanoderes) hampei (Ferr.) dans deux macrohabitats de Coffea canephora dans le Nigeria du Sud. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 7 p., 2 tabl., 12 réf.

Le scolyte des grains de café, Hypothenemus hampei, est un des déprédateurs les plus importants de Coffea canephora dans le Nigeria du Sud, endommageant de 5 à 80 % des fruits récoltables au cours des différentes saisons de l'année. Des études comparatives de la survie des différents stades de développement du déprédateur dans des fruits récoltés sur des arbres ou ramassés dans la litière ont montré que le déprédateur survivait dans les deux macrohabitats pendant la plus grande partie de l'année. Les populations de divers stades étaient cependant très faibles immédiatement après la cueillette de la récolte principale (décembre - mars de l'année suivante), particulièrement dans la litière. Divers facteurs, tel que l'absence de cerises favorables à l'infestation et au développement ultérieur, les conditions de chaleur et de sécheresse prévalant pendant cette période et l'action destructrice des ennemis naturels sont, semble-t-il, responsables de la mise en échec des populations de ce déprédateur.

Compte tenu de cela et du coût élevé des gages de la main-d'oeuvre nécessaire à la récolte régulière des fruits pendant la plus grande partie de l'année, on pense que le mode de lutte par les récoltes sanitaires (élimination de toutes les cerises laissées après la récolte) serait non seulement inutile mais encore non rentable pendant cette période. Les mesures de lutte intensive comprenant les récoltes sanitaires et l'application d'insecticides ne devraient être limitées qu'à la récolte principale (mai - décembre). Ceci non seulement diminuerait le coût de la lutte et protégerait les ennemis naturels du déprédateur, mais aussi réduirait la quantité de résidu d'insecticide dans les grains, ce qui serait tout avantage aussi bien pour les planteurs que pour les consommateurs de café.

IDOWU (O.L.).- Comparative survival of the coffee-berry borer, Hypothenemus (Stephanoderes) hampei (Ferr.) under two macrohabitats of Coffea canephora in Southern Nigeria. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 7 p., 2 tabl., 12 réf.

The coffee-berry borer Hypothenemus hampei is one of the major pests of C. canephora in Southern Nigeria accounting for between 5 and 80 % damage of harvestable fruits at various seasons of the year. Studies of the comparative survival of the various developmental stages of the pest on fruits collected from the tree and from the litter showed that the pest survived in both macrohabitats for most period of the year. Populations of various stages however were very low immediately after harvest of the major crop (December - March of the following year), particularly in the litter. Various factors such as lack of suitable berries for infestation and further development, the prevailing hot and dry environmental conditions during this period, and destructive effective of natural enemies are suggested as checking the populations of this pest.

In view of this, and the high cost of hiring labour to harvest fruits continuously for most part of the year, it is also suggested that the rampaseen approach to control would not only be unnecessary but uneconomical during this period. Intensive control measures embracing the use of rampaseen and insecticide application should be limited to the major crop (May - December). This would not only save cost of control and protect the natural enemies of the pest, but also reduce the amount of insecticide residue in the seeds - all to the advantage of both the farmers and consumers of coffee.

FILANI (G.A.).- Efficacité comparée de quatre pulvérisateurs pour l'application d'un fongicide cuprique à la surface des feuilles de caféiers. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 8 p., 4 tabl., 3 fig., 10 réf.

Trois pulvérisateurs pneumatiques et un pulvérisateur à moteur ont été évalués pour leur efficacité relative dans le traitement, par pulvérisation, des Coffea arabica contre Hemileia vastatrix, agent de la rouille des feuilles. Les caractéristiques et les dimensions du jet pulvérisé, la vitesse d'écoulement, la vitesse d'application, la dimension des gouttelettes et les dépôts effectifs de produits chimiques ont été estimés pour chacune des pompes. Dans presque tous les cas, le pulvérisateur Falcon a été trouvé le plus approprié ; le pulvérisateur à moteur Yanmar MS1, bien que le plus efficace en ce qui concerne le dépôt de cuivre à la surface des feuilles, gaspille beaucoup de fongicide, est trop cher et trop compliqué pour être acheté, utilisé et entretenu convenablement par le planteur de caféiers moyen.

FILANI (G.A.).- Comparative efficiency of four spraying pumps in delivering copper fungicide on coffee leaf surface. IX^e Colloque Scientifique International sur le Café, Londres, 16-20 juin 1980. ASIC (Paris), 1981, 8 p., 4 tabl., 3 fig., 10 réf.

Three different pneumatic and a motorised mist-blower were evaluated for their relative efficiency in spraying Coffea arabica against Hemileia leaf rust disease. The spray pattern and their sizes, flow rate, application rate, droplet size and actual chemical deposits of each of the pumps were determined. In almost all cases, Falcon was found to be most suitable, Yanmar MS1 the motorised mist-blower, although was found most efficient in its delivery of copper on leaf surfaces, it was found to be very wasteful of fungicides, and too expensive and complicated for the ordinary coffee farmer to purchase, use and maintain properly.

