

# NOTES TECHNIQUES

## EFFETS DE L'HYPOXIE ET DE LA TEMPÉRATURE SUR LA CONSERVATION IN VITRO DE POUSSÉS FEUILLÉES DE *COFFEA ARABICA* L.

L. JOUVE, F. ENGELMANN, A. CHARRIER \*

### INTRODUCTION

La conservation des ressources génétiques caféières est actuellement réalisée sous forme de collections en champ, solution qui est coûteuse et qui laisse le matériel végétal exposé à tous les risques inhérents à la culture en conditions naturelles. La culture *in vitro* offre de nombreux avantages, comparativement aux autres techniques de conservation : réduction de la surface nécessaire, taux de multiplication élevé, risque de perte des génotypes théoriquement réduit à zéro, absence de contaminations, réduction des coûts de production et d'entretien.

Pour la conservation à long terme, la culture *in vitro* est utilisée conjointement avec la cryoconservation (stockage dans l'azote liquide à  $-196^{\circ}\text{C}$ ). Pour le stockage à moyen terme, le ralentissement de la croissance est le plus souvent obtenu par une diminution de la température de culture jusqu'à  $0-5^{\circ}\text{C}$  (Druart, 1985). Cependant, pour les espèces tropicales, qui sont généralement sensibles au froid

et ne supportent que des températures plus élevées, de l'ordre de  $8$  à  $15^{\circ}\text{C}$  (Banerjee et de Langhe, 1985), d'autres moyens doivent être recherchés pour limiter la croissance. Quelques essais ont notamment été réalisés en réduisant la quantité d'oxygène disponible pour les tissus, soit simplement en les recouvrant d'huile minérale, dans le cas de cals de différentes espèces (Caplin, 1959 ; Auge-reau *et al.*, 1986 ; Moriguchi *et al.*, 1988) ou de pousses feuillées de pêcher (Chatti-Dridi, 1988), soit en utilisant des atmosphères contrôlées dans le cas des vitroplants de chrysanthème et de tabac (Bridgen et Staby, 1981) ou dans celui d'embryons somatiques de palmier à huile (Engelmann, 1990).

Les travaux portant sur la conservation *in vitro* du caféier sont peu nombreux. Il a été montré que des embryons somatiques de *C. arabica* et de *C. canephora* pouvaient résister à la congélation dans l'azote liquide (Bertrand-Desbrunais *et al.*, 1988 ; Bertrand-Desbrunais et Charrier, 1990). Kartha *et al.* (1981) ont pu conserver pendant deux ans sans repiquage des plants racinés de *C. arabica* sur un milieu dépourvu de sucre et contenant 50 % de la solution minérale utilisée. Till (1984) a stocké pendant trois mois des pousses feuillées de *C.*

\* Laboratoire de Ressources Génétiques et Amélioration des Plantes Tropicales, ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1, France.

28 JUL. 1992

ORSTOM Fonds Documentaire

N° : 36.378 ep1

Cote : B M p27

*arabica* et de l'hybride Arabusta à 8 °C sur milieu standard ou additionné de polyéthylène glycol à 10 %. Bertrand-Desbrunais et Charrier (1990) ont montré qu'il existait de grandes différences de comportement pour la multiplication et le stockage *in vitro* d'une quinzaine d'espèces de caféier. La recherche de conditions de stockage optimales, applicables à un grand nombre d'espèces, est donc un objectif prioritaire.

Le but de cette étude est d'observer l'effet d'un abaissement de la température et d'une diminution de la quantité d'oxygène par immersion sous de la paraffine liquide sur la conservation de pousses feuillées de caféier en culture *in vitro*.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Matériel végétal

Cet essai a été réalisé sur *C. arabica* cultivar « Moka de Tahiti ». Les explants utilisés sont des microboutures de vitroplants, constituées de portions d'axes orthotropes, avec deux paires de feuilles, mesurant environ 10 mm (fig. 1).

### Méthode

Les pousses feuillées issues des microboutures sont cultivées sur un milieu adapté de celui mis au point par Dublin (1981), contenant des macro et microéléments de Murashige et Skoog (1962), les vitamines de Morel et Wetmore (1951), 1 ml.l<sup>-1</sup> d'une solution de fer-EDTA (24,9 g.l<sup>-1</sup> d'EDTA et 24,9 g.l<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O), 1,3 · 10<sup>-6</sup> M de benzylaminopurine et 0,12 M de saccharose. Le pH est ajusté à 5,5 avant autoclavage. Le milieu est solidifié par l'addition de 2 g.l<sup>-1</sup> de gelrite. Les pousses feuillées sont cultivées dans des tubes en pyrex de 150 × 24 mm, contenant 20 ml de milieu. L'huile de paraffine (Réf. : Merck 7162 1000) est répartie dans les tubes, après autoclavage, de telle sorte que le niveau soit 1 cm au-dessus de la bouture. En fin de conservation, les pousses feuillées sous paraffine sont plongées dans une solution de Mercryl laurylé à 0,3 % afin d'éliminer la paraffine, puis rincées dans de l'eau stérile avant leur repiquage sur milieu Standard.

Les cultures sont placées dans des chambres à différentes températures : 27 °C (témoin), 21, 12 et 4 °C. L'éclairage est assuré par des tubes fluorescents lumière du jour (type grolux), avec une photopériode de 12 heures de lumière sur 24. La quantité de lumière est de 55 ± 5 μE.m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup> à 27, 21 et 12 °C, et de 10 ± 1 μE.m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup> à 4 °C.

Pour cet essai, la durée de conservation est de quatre mois. Pour chaque condition, la moitié des



Fig. 1. — Aspect d'une pousse feuillée de *C. arabica* lors de la mise en conservation sous huile de paraffine

plants sont conservés sur milieu Standard, l'autre moitié sous paraffine (milieu Paraffine). A la fin de la période de stockage, dix tubes sont prélevés dans chaque condition. Sur chaque plant, sont mesurés la taille, le nombre de feuilles, le poids de matière fraîche, le poids de matière sèche. L'aspect général du plant (couleur, bourgeons développés, etc.) est observé. Cinq plants sont alors repiqués sur milieu Standard et mis en conditions de reprise, à 27 °C. Au bout d'un mois, les mesures et observations décrites précédemment sont renouvelées afin de quantifier la reprise.

Un indice de croissance a été calculé, à partir d'une Analyse des Composantes Principales, intégrant la taille, le nombre de feuilles, le poids de matière fraîche, le poids de matière sèche, ainsi que leurs variations. Pour l'analyse statistique, on a utilisé les tests de Comparaison Multiple des Moyennes et d'analyse de variance (Newman, 1939 ; Keuls, 1952).

## RÉSULTATS

### Conservation

A 4 °C, quel que soit le milieu considéré, la survie est nulle. Cette température est létale dès le premier mois de conservation (résultats non présentés). Sur milieu Standard, les différentes températures de

stockage sont très bien supportées, alors que sur milieu Paraffine la mortalité est importante à 27 °C et diminue aux températures inférieures (21 et 12 °C) (tableau I).

Sur milieu Standard (fig. 2), l'indice de croissance varie suivant la température de conservation. A 27 °C, la croissance est significativement supérieure à celle observée aux autres températures. Les résultats obtenus à 21 et 12 °C ne sont pas significativement différents après quatre mois de conservation. Sur milieu Paraffine, la croissance est inférieure à celle observée sur milieu Standard : les plants immergés dans la paraffine liquide ont une croissance très faible pendant la durée de stockage, non significativement différente quelle que soit la température.

Le nombre de bourgeons axillaires débouffés par bouture diminue avec l'abaissement de la température (fig. 3). Sur milieu Standard, la conservation à 27 °C permet le développement d'un nombre de bourgeons axillaires significativement plus important qu'à 12 °C. La différence n'est cependant pas significative entre 27 et 21 °C ainsi qu'entre 21 et 12 °C. Sur milieu Paraffine, le nombre de bourgeons développés est équivalent quelle que soit la température de stockage et dans tous les cas inférieur à celui observé sur milieu Standard.

En fin de conservation, tous les plants maintenus à 4 °C sont totalement nécrosés (fig. 4 et 5, p. 208). Sur milieu Standard, comme sur milieu Paraffine, le stockage à 27, 21 ou 12 °C permet aux boutures de

garder un bel aspect. Elles présentent une belle couleur vert-noir.

### Reprise

Aucune perte n'est observée après un mois de reprise chez les plants conservés sur milieu Standard (tableau I). Seules certaines pousses feuillées conservées à 21 °C immergées dans la paraffine meurent pendant la reprise. Aucune conclusion ne peut cependant être tirée, étant donné la faible taille des échantillons. Il faut signaler aussi qu'après trois mois de stockage, des pertes avaient été observées pour toutes les températures de stockage sur milieu Paraffine (résultats non présentés).

L'intensité de la reprise de croissance dépend du milieu de conservation et non de la température de stockage (fig. 6, p. 209). Les boutures maintenues sur milieu Standard ont une croissance supérieure à celles stockées sur milieu Paraffine.

Après un mois en conditions standard, l'aspect général des plants est assez bon. Les plants vivants forment des feuilles bien vertes. Dans tous les cas, une bonne reprise des bourgeons développés pendant la conservation a été remarquée chez les boutures conservées sur milieu Standard. Chez les plants stockés sous paraffine, la croissance des rameaux qui ont commencé leur développement pendant la conservation est plus lente, mais ils présentent un bel aspect.

TABLEAU I

Survie de pousses feuillées de *C. arabica* après quatre mois de conservation (conservation), ou après quatre mois de conservation et un mois de culture à 27 °C, sur milieu Standard (reprise), en fonction des conditions de leur stockage. Les effectifs sont de dix pousses feuillées pendant la conservation, cinq pendant la reprise

	Milieu Standard				Milieu Paraffine			
	27 °C	21 °C	12 °C	4 °C	27 °C	21 °C	12 °C	4 °C
Conservation (10 boutures)	9/10	10/10	10/10	0/10	4/10	8/10	9/10	0/10
Reprise (5 boutures)	5/5	5/5	5/5	0/5	4/4	2/5	5/5	0/5

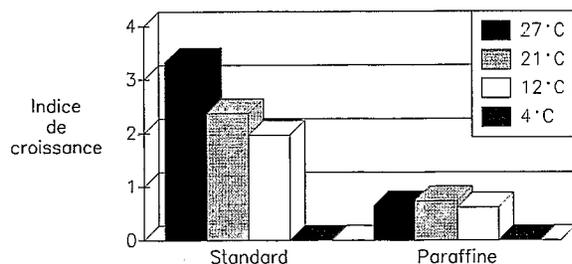


Fig. 2. — Indice de croissance de pousses feuillées de *C. arabica* après quatre mois de conservation dans différentes conditions

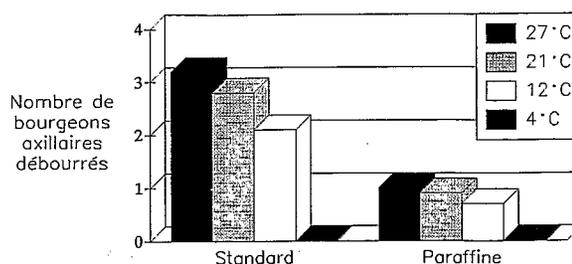


Fig. 3. — Nombre moyen de bourgeons axillaires développés par pousse feuillée de *C. arabica* après quatre mois de conservation dans différentes conditions



Fig. 4. — Aspect des pousses feuillées de *C. arabica* après quatre mois de conservation à 27, 21, 12 et 4 °C (de gauche à droite), sur milieu Standard

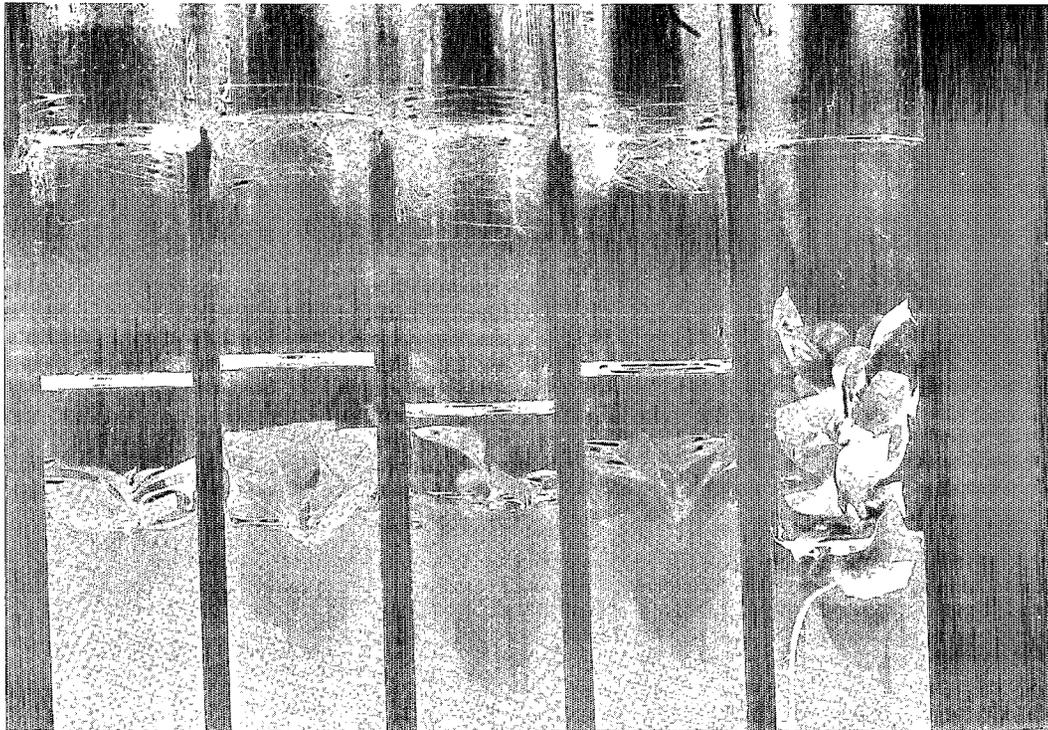


Fig. 5. — Aspect des pousses feuillées de *C. arabica* après quatre mois de conservation à 27, 21, 12 et 4 °C, sous paraffine liquide et à 27 °C dans l'air (de gauche à droite)

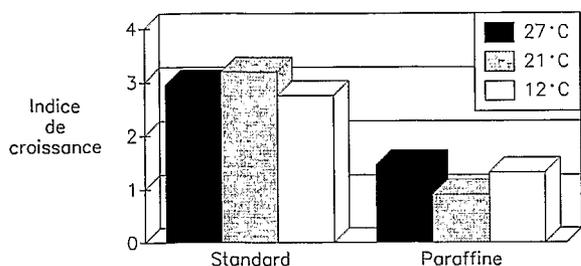


Fig. 6. — Indice de croissance de boutures de *C. arabica* après un mois de culture à 27 °C, sur milieu Standard, en fonction des conditions de leur conservation

## DISCUSSION - CONCLUSION

La température de stockage a des effets sur la survie et la croissance des pousses feuillées, pendant et après la conservation. Dans tous les cas, une température de 4 °C entraîne rapidement une mortalité totale, alors que la survie sur milieu Standard est complète à partir de 12 °C. Cette observation reflète la tolérance relative au froid de *C. arabica*, qui ne peut supporter que de brefs séjours à des températures basses, de l'ordre de 3 ou 4 °C, mais dont l'optimum de croissance est atteint, en conditions naturelles, pour des températures comprises entre 15 et 24 °C. Sur milieu Paraffine, la survie est diminuée à 27 °C, par rapport aux autres conditions thermiques. Ceci est sans doute dû au fait que, à cette température, le métabolisme n'est pas ralenti. Les plants meurent donc par asphyxie, du fait de la faible quantité d'oxygène disponible.

Sur le milieu Standard, la croissance est d'autant plus ralentie que la température de stockage est basse. Il n'en est pas de même sur milieu Paraffine. Dans ce cas, c'est d'abord l'hypoxie qui est responsable du ralentissement observé, puisque la diminution de croissance est la même, quelle que soit la température. On observe un comportement différent avec des boutures de pêcher conservées sous paraffine, chez lesquelles la croissance à 25 °C est

en effet supérieure à celle mesurée à 8 °C (Chatti-Dridi, 1988).

Au cours de la reprise à 27 °C sur milieu Standard, on note une bonne survie dans toutes les conditions. Cependant, la reprise de croissance est nettement plus faible chez les plants conservés sous paraffine. Ce comportement pourrait être dû à la présence d'une couche d'huile résiduelle sur les feuilles et les tiges, malgré le lavage, ce qui empêche la respiration de s'effectuer convenablement. Le même phénomène pourrait expliquer la mortalité totale observée par Chatti-Dridi (1988) lors de la remise en culture directe de boutures de pêcher, sans lavage, en conditions standard. Il serait intéressant, dans le cas de la présente étude, de pouvoir suivre la reprise de croissance sur plusieurs cycles de culture, afin de savoir dans quel délai on retrouve le taux de croissance habituel.

Un autre inconvénient de cette technique de conservation sous paraffine est à considérer : la quantité d'oxygène disponible pour les explants n'est pas connue et difficilement contrôlable. Au contraire, l'utilisation d'atmosphères contrôlées, avec un taux d'oxygène défini, dans les essais effectués avec des vitroplants de chrysanthème et de tabac (Bridgen et Staby, 1981) ou des embryons somatiques de palmier à huile (Engelmann, 1990) a permis d'obtenir une survie importante et surtout une reprise de croissance immédiate du matériel après le stockage, condition essentielle pour l'utilisation de toute technique de conservation.

En conclusion, nous avons montré au cours de cet essai que l'on pouvait ralentir la croissance de pousses feuillées de *C. arabica* pendant quatre mois *in vitro* par une diminution de la température de culture et/ou de la quantité d'oxygène en immergeant les cultures sous une couche d'huile de paraffine. Il convient maintenant d'étudier notamment l'effet de ces modifications sur d'autres espèces de caféier et d'augmenter la durée de conservation. L'utilisation des atmosphères contrôlées, pour réaliser des conditions d'hypoxie, devrait également être envisagée.

## REFERENCES

- AUGEREAU (J. M.), COURTOIS (D.), PETIARD (V.). — Long term storage of callus cultures at low temperatures or under mineral oil layer. *Plant Cell Reports* (Berlin), vol. 5, 1986, p. 372-376.
- BANERJEE (N.), de LANGHE (E.). — A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (banana and plantain). *Plant Cell Reports* (Berlin), vol. 4, 1985, p. 351-354.

- BERTRAND-DESBRUNAIS (A.), FABRE (J.), ENGELMANN (F.), DEREUDDRE (J.), CHARRIER (A.). — Reprise de l'embryogenèse adventive d'embryons somatiques de caféier (*Coffea arabica*) après leur congélation dans l'azote liquide. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Série III* (Paris), vol. 307, 1988, p. 795-801.
- BERTRAND-DESBRUNAIS (A.), CHARRIER (A.). — Conservation des ressources génétiques caféières en vitrothèque. *in* : 13<sup>e</sup> Colloque Scientifique International sur le Café, Paipa, Colombie, 21-25 août 1989, ASIC (Paris), 1990, p. 438-446.

- BRIDGEN (M. P.), STABY (G. L.). — Low pressure and low oxygen storage of *Nicotiana tabacum* and *Chrysanthemum* × *Morifolium* tissue cultures. *Plant Science Letters* (Amsterdam), vol. 22, 1981, p. 177-186.
- CAPLIN (S. M.). — Mineral oil overlay for conservation of plant tissue cultures. *American Journal of Botany* (Baltimore), vol. 46, 1959, p. 324-329.
- CHATTI-DRIDI (B.). — Expériences préliminaires sur la conservation à court terme et l'amélioration de la micropropagation *in vitro* dans le cas du pêcher (*Prunus persica*). Mémoire de fin d'études, ENSH, Versailles, 1988, 87 p.
- DRUART (P.). — *In vitro* germplasm preservation technique for fruit trees. In: *In Vitro* Techniques, Propagation and Long Term Storage, sous la direction de A. Schäfer-Menuhr, Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publ., 1985, p. 167-172.
- DUBLIN (P.). — Induction de bourgeons néoformés et embryogenèse somatique. Deux voies de multiplication des caféiers cultivés. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XXIV, 1980, p. 121-129.
- ENGELMANN (F.). — Utilisation d'atmosphères à teneur en oxygène réduite pour la conservation des cultures d'embryons somatiques de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Série III* (Paris), vol. 310, 1990, p. 679-684.
- KARTHA (K. K.), MROGINSKI (L. A.), PAHL (K.), LEUNG (N. L.). — Germplasm preservation of coffee (*Coffea arabica* L.) by *in vitro* culture of shoot apical meristems. *Plant Science Letters* (Amsterdam), vol. 22, 1981, p. 301-307.
- KEULS (M.). — The use of studentized range in connection with analysis of variance. *Euphytica* (Wageningen), vol. 1, 1952, p. 112-122.
- MOREL (G.), WETMORE (R. M.). — Fern callus tissue culture. *American Journal of Botany* (Baltimore), vol. 38, 1951, p. 141-143.
- MORIGUCHI (T.), KOZAKI (I.), MATSUTA (N.), YAMAKI (S.). — Plant regeneration from grape callus stored under a combination of low temperature and silicone treatment. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* (Dordrecht), vol. 15, 1988, p. 67-71.
- MURASHIGE (T.), SKOOG (F.). — A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* (Copenhagen), vol. 15, 1962, p. 473-497.
- NEWMAN (D.). — The distribution of range in samples from a normal population expressed in terms of an independent estimate of standard deviation. *Biometrika* (Londres), vol. 31, 1939, p. 20-30.
- TILL (M.). — La multiplication et conservation *in vitro* de plantes ligneuses. Revue des techniques mises au point et des possibilités d'application de ces techniques à des plantes tropicales pérennes dans un but de préservation de la diversité génétique (banque de gènes). Expérimentation sur *Coffea* sp. Mémoire d'ingénieur agronome, Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique), 1984, 99 p.

JOUVE (L.), ENGELMANN (F.), CHARRIER (A.). — Effets de l'hypoxie et de la température sur la conservation *in vitro* de pousses feuillées de *Coffea arabica* L. *Café Cacao Thé* (Paris), vol. XXV, n° 3, juil.-sept. 1991, p. 205-210, 1 tabl., 6 fig., 17 réf.

Cette expérimentation avait pour objectif d'observer les effets de l'hypoxie et de la température sur la conservation *in vitro* de pousses feuillées de *C. arabica*. Les pousses feuillées ont été placées pendant quatre mois à 27, 21, 12 et 4 °C, soit dans l'atmosphère standard de culture (air confiné), soit en hypoxie, immergées sous une

couche de paraffine. A 4 °C, la mortalité est totale, dans toutes les conditions. Pour les autres températures, on obtient une bonne survie, sauf avec des pousses feuillées recouvertes de paraffine, stockées à 27 °C. Pendant la conservation, la croissance des pousses feuillées placées dans l'air diminue progressivement avec la température, alors que, chez celles placées en hypoxie, le ralentissement de croissance est identique, quelle que soit la température. Au bout d'un mois de reprise à 27 °C, après la période de stockage, on observe une bonne survie, mais la reprise de croissance des pousses conservées sous paraffine est plus faible.