

## Biologie de la conservation des semences de caféiers : aspects fondamentaux et conséquences pratiques. Une revue

Stéphane Dussert<sup>1</sup>  
Emmanuel Couturon<sup>2</sup>  
Florent Engelmann<sup>1</sup>  
Thierry Joët<sup>1</sup>

<sup>1</sup> IRD  
UMR Diade  
911, avenue Agropolis  
BP64501  
34394 Montpellier  
France  
<stephane.dussert@ird.fr>  
<florent.engelmann@ird.fr>  
<thierry.joet@ird.fr>

<sup>2</sup> IRD  
UMR Diade  
BP 50172  
97492 Sainte Clotilde  
France  
<emmanuel.couturon@ird.fr>

### Résumé

Depuis le début des années 1990, les semences des caféiers ont été adoptées par de nombreux laboratoires internationaux comme le système modèle pour l'étude de la physiologie des semences de type « intermédiaire ». À la différence des semences orthodoxes, dont la longévité augmente lorsqu'elles sont déshydratées et placées à basse température, les semences intermédiaires ne sont que partiellement tolérantes à la dessiccation et au froid. Dans les plages étroites de teneurs en eau et de températures qui peuvent ainsi être utilisées, la longévité des semences intermédiaires est très réduite, ce qui constitue une contrainte majeure pour la conservation de la biodiversité de ces espèces. Le développement de nouvelles techniques de chimie analytique a permis d'imputer la faible longévité des semences de caféiers à des dommages cellulaires de plusieurs natures : une hydrolyse des lipides neutres conduisant à une accumulation d'acides gras libres déstabilisant les membranes ; la perte sélective d'une classe de phospholipides ; une perte et une oxydation des deux principaux antioxydants hydrophiles des cellules, l'acide ascorbique et le glutathion. Grâce à ces nouvelles connaissances sur les processus impliqués dans le vieillissement des semences de caféiers, nous proposons pour la première fois dans cet article des recommandations techniques très précises pour la préparation et le stockage à court terme des lots de semences. Parallèlement, grâce à des approches biophysiques, utilisant notamment la microcalorimétrie, la compréhension des mécanismes impliqués dans la tolérance des semences de caféiers à une exposition aux très basses températures a progressé de manière significative. Sur la base de ces connaissances, une technique de cryoconservation très efficace a été mise au point pour ces semences, permettant d'envisager désormais la sauvegarde à long terme des ressources génétiques du genre *Coffea*.

**Mots clés :** albumen ; cryoconservation ; dessiccation ; embryon ; membrane ; semence intermédiaire ; vieillissement.

**Thèmes :** productions végétales ; ressources naturelles et environnement.

### Abstract

**Coffee seed conservation biology: Fundamental aspects and practical implications. A review**

Since the early 1990s, the coffee seed has been designated by several international laboratories as the model system for studying the physiology of seeds of the "intermediate" category. In contrast to orthodox seeds, longevity of which increases when they are dehydrated and stored at low temperature, intermediate seeds are only partially tolerant to desiccation and low temperatures. In the narrow ranges of water contents and temperatures which can thus be used, the longevity of intermediate seeds remains very short, which constitutes a major limitation for the conservation of the biodiversity of these species. The development of new analytical chemistry techniques made it possible to demonstrate that the poor longevity of coffee seeds was associated with several types of

Pour citer cet article : Dussert S, Couturon E, Engelmann F, Joët T, 2012. Biologie de la conservation des semences de caféiers : aspects fondamentaux et conséquences pratiques. Une revue. *Cah Agric* 21 : 106-14. doi : 10.1684/agr.2012.0552

cellular damage : neutral lipid hydrolysis leading to the accumulation of free fatty acids<sup>e-</sup> which destabilize membranes, selective loss of a class of phospholipids, loss and oxidation<sup>t-</sup> of the two major hydrophilic antioxidants, ascorbic acid and glutathione. Thanks to the knowledge gained on the processes involved in coffee seed ageing, we propose for the first time in this paper highly accurate technical recommendations for the preparation and the short-term storage of seed lots. Meanwhile, through biophysical approaches including differential scanning calorimetry, the understanding of the mechanisms involved in coffee seed tolerance to ultra-low temperature exposure has significantly progressed. Based on this knowledge, a very effective cryopreservation technique has been developed for coffee seeds, facilitating the long-term conservation of *Coffea* genetic resources.

**Key words:** ageing; cryopreservation; desiccation; embryo; endosperm; intermediate seed; membrane.

**Subjects:** natural resources and environment; vegetal productions.

**M**aintenir la viabilité des semences de caféiers au cours du temps est essentiel pour au moins deux raisons. Il s'agit tout d'abord de répondre aux besoins de conservation à court terme des producteurs de semences commerciales et des planteurs, qui souhaitent pouvoir stocker leurs lots de quelques mois à quelques années. Cette demande s'étend aux sélectionneurs et biologistes de la filière qui souhaitent maintenir leurs matériels d'étude pour de courtes durées. Le second aspect concerne la conservation *ex situ* des ressources génétiques des espèces du genre *Coffea*, pour laquelle il faut disposer d'une méthode efficace et peu coûteuse de conservation à long terme.

Les semences des caféiers ont un comportement complexe qui ne correspond à aucune des deux grandes catégories définies par leur viabilité après déshydratation (Roberts, 1973) : les semences orthodoxes et les semences récalcitrantes. Contrairement à ces dernières, les semences de caféier peuvent être partiellement déshydratées sans perte de viabilité. Mais, à la différence des semences orthodoxes, elles ne supportent pas une dessiccation extrême et, à basse teneur en eau, leur longévité ne semble pas augmenter quand on abaisse la température de conservation. Sur la base de ces observations, Ellis *et al.* (1990) ont défini une troisième catégorie en relation avec leur comportement en conservation : les semences intermédiaires. Depuis une vingtaine d'années, la semence des caféiers est ainsi devenue le système modèle pour l'étude de la physiologie de ces semences de la

catégorie intermédiaire. Elle contient d'autres espèces cultivées d'importance majeure, telles que les agrumes et le palmier à huile, mais aussi de nombreuses espèces forestières de milieux tropicaux. De nombreux travaux fondamentaux ont ainsi été menés sur le développement de la graine de caféier et sa germination (Eira *et al.*, 2006 ; Joët *et al.*, 2009), mais aussi sur les mécanismes mis en jeu dans son comportement en conservation. Ils ont permis des avancées technologiques répondant aux besoins de conservation à court et long terme. L'ensemble des dernières connaissances fondamentales et appliquées dans ce domaine fait l'objet de cette synthèse.

## Sensibilité à la dessiccation des semences de caféiers

Parmi les 103 espèces de caféiers décrites à ce jour (Davis *et al.*, 2006), l'espèce la plus largement cultivée dans le monde, *C. arabica*, est celle qui a fait l'objet du plus grand nombre de travaux concernant le niveau de sensibilité à la dessiccation de ses semences. La plupart de ces études rapportent que les semences de cette espèce peuvent être partiellement déshydratées sans perte de viabilité (Bacchi, 1955 ; Van der Vossen, 1977 ; Ellis *et al.*, 1990 ; Dussert *et al.*, 1999 ; Dussert *et al.*, 2001 ; Dussert *et al.*, 2003 ; Dussert

*al.*, 2006 ; Eira *et al.*, 1999). Cependant, cette littérature indique des valeurs très disparates en ce qui concerne le seuil de déshydratation supporté : la teneur en eau létale varie de 5 à 16 % de la masse fraîche (MF) selon les auteurs. Elle témoigne aussi de la difficulté à quantifier un caractère à variation continue : un lot de semences est une population dans laquelle chaque semence possède son propre seuil de tolérance : l'humidité relative létale peut varier de plus ou moins 10 % autour de la valeur médiane au sein d'un lot. Afin de faire face à ces divergences d'approches et de résultats, une méthode simple permettant de quantifier la sensibilité à la dessiccation des semences a été développée (Dussert *et al.*, 1999). Elle permet d'estimer ce caractère par la valeur médiane de l'état hydrique correspondant à la perte de 50 % de la viabilité initiale. Cette méthode permet de quantifier la sensibilité à la dessiccation non seulement en termes de teneur en eau, la variable la mieux connue pour décrire l'état hydrique des semences, mais également en termes de potentiel hydrique et d'activité de l'eau, qui sont des paramètres appréciés par les biologistes pour décrire les phénomènes biophysiques et biochimiques affectant les semences lors de leur déshydratation (ou leur refroidissement). Afin de bien quantifier la sensibilité à la dessiccation des semences, la méthode donnant les résultats les plus reproductibles consiste à utiliser une gamme d'atmosphères dont l'humidité relative varie entre 5 et 95 %, gamme qui peut être aisément obtenue à partir de différentes solutions salines saturées (Dussert *et al.*, 1999). Par exemple, une

solution saturée de sulfate d'ammonium disposée au fond d'un bocal fermé crée une humidité relative constante de 81 % à 25 °C (figure 1A). La teneur en eau de semences placées dans la partie haute de ce bocal atteint un équilibre hydrique avec l'atmosphère en seulement quelques jours

lorsque cette expérimentation est réalisée à 25 °C. La relation entre l'humidité relative de l'atmosphère et la teneur en eau des semences à l'équilibre est appelée « isotherme de sorption » (figure 1B). L'effet de l'humidité relative de l'atmosphère sur la viabilité des semences se

traduit par une courbe de réponse de type sigmoïde, qui reflète la variabilité des semences d'un même lot pour leur seuil individuel de tolérance à la dessiccation (figure 1C). Dans le cas du lot de semences de *C. arabica* présenté dans la figure 1, l'humidité relative à laquelle 50 % de la viabilité initiale est

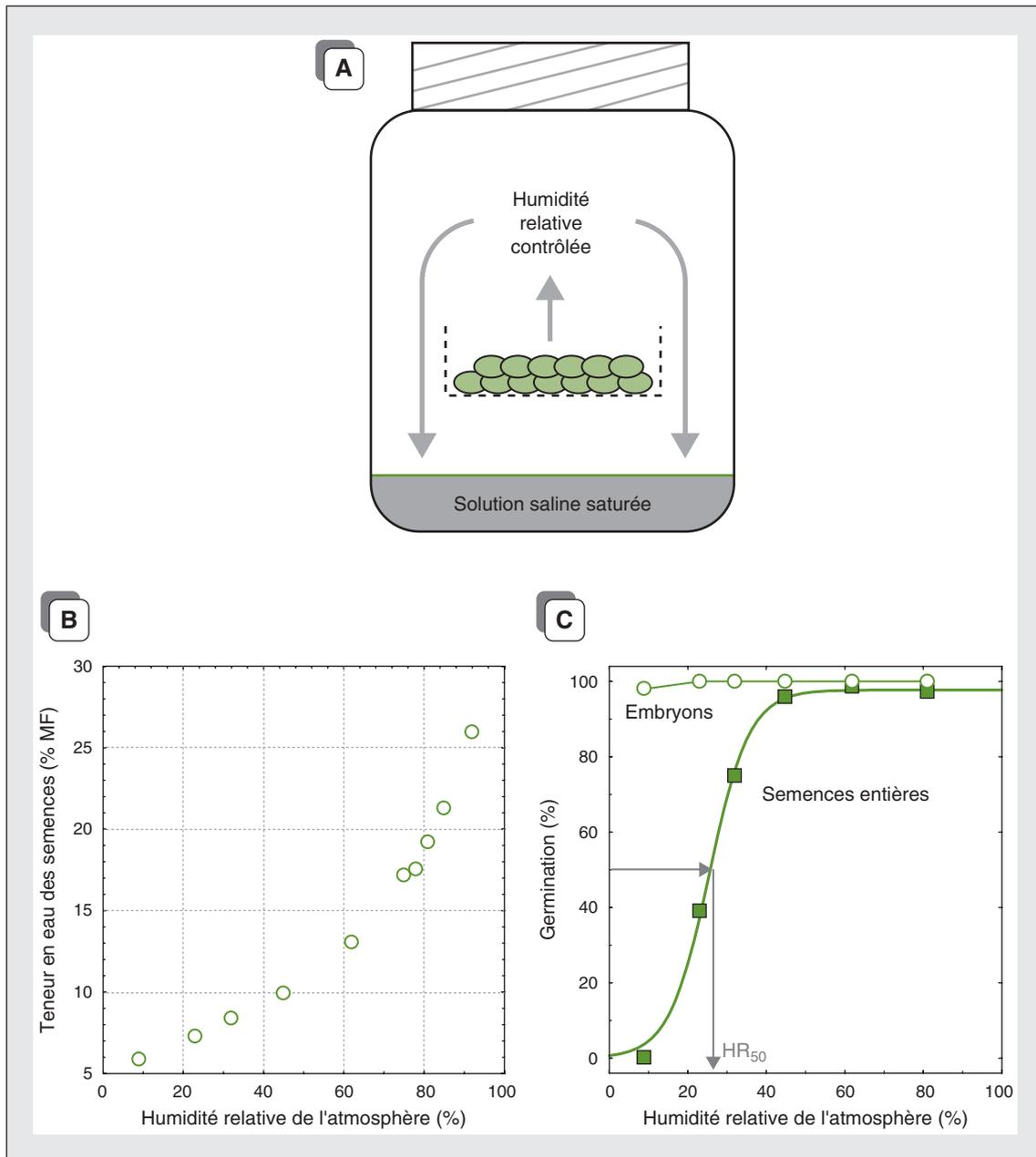


Figure 1. Mesure de la sensibilité à la dessiccation des semences de caféiers (*C. arabica*).

Figure 1. Measurement of coffee (*C. arabica*) seed desiccation sensitivity.

A) schéma représentant le dispositif de déshydratation. Les graines sont placées dans un panier en matière plastique disposé au-dessus d'une solution saline saturée à l'intérieur d'un bocal en verre à capuchon vissant (hermétique). Les flèches grises indiquent les mouvements des molécules d'eau ; B) teneurs en eau des semences obtenues en utilisant une gamme d'atmosphères dont l'humidité relative est contrôlée à l'aide de différentes solutions salines saturées ; C) taux de germination des semences et des embryons isolés. La sensibilité à la dessiccation est quantifiée par la variable HR<sub>50</sub> qui décrit l'humidité relative à laquelle 50 % de la viabilité des semences est perdue.

perdue,  $HR_{50}$ , est de 26 %, ce qui correspond à une teneur en eau des semences de 8 % MF.

Grâce à cette approche, il a pu être montré qu'il existe une très grande variabilité pour ce caractère à l'intérieur du genre *Coffea* :  $HR_{50}$  varie de 15 à 60 % (entre 5 % et 15 % MF en termes de teneur en eau) pour la quinzaine d'espèces testées (Dussert *et al.*, 1999 ; Dussert *et al.*, 2001 ; Eira *et al.*, 1999). Ainsi, d'une espèce à une autre, les possibilités de développer des méthodes de conservation à court et à long terme vont être très différentes. Mais cette variabilité fait également du genre *Coffea* un modèle d'étude très séduisant pour la recherche des mécanismes impliqués dans la sensibilité à la dessiccation des semences intermédiaires. Il est en effet possible de tester l'existence d'une corrélation significative entre toute variable décrivant le seuil de tolérance, telle que  $HR_{50}$ , et tout autre caractère quantitatif potentiellement impliqué dans la tolérance à la dessiccation, comme par exemple la teneur en di- et oligo-saccharides des semences (Chabrilange *et al.*, 2000). Point important, les embryons extraits des semences après leur dessiccation et placés sur un milieu nutritif favorable se développent tous en plantules, même pour les humidités relatives les plus basses (5-10 %), auxquelles les semences entières ne germent plus (*figure 1B*). Donc, des deux tissus qui composent la semence de caféier, c'est l'albume qui détermine le seuil de sensibilité à la dessiccation de la semence entière. Ce résultat est essentiel pour la recherche des mécanismes impliqués dans ce caractère chez les caféiers, puisqu'il cible le tissu sur lequel il convient de mener les investigations.

## Conservation à court terme des semences de caféiers

### Effet de la teneur en eau des semences

L'effet de la teneur en eau sur la longévité des semences de *C. arabica* a fait l'objet d'une littérature conflictuelle (Van der Vossen, 1977 ; Ellis *et al.*,

1990 ; Hong et Ellis, 1995). Certains auteurs ont conclu que cette longévité était inversement proportionnelle à leur teneur en eau (par exemple Bacchi, 1958) tandis que d'autres ont rapporté un effet négatif de la dessiccation (par exemple Couturon, 1980). En fait, la plupart des auteurs recherchaient *a priori* une relation monotone entre longévité et teneur en eau (Roberts, 1973). Nous avons donc voulu vérifier si les données publiées à ce jour étaient ou non contradictoires. Pour chacune des études publiées et pour chaque teneur en eau testée, nous avons calculé la longévité médiane des semences de *C. arabica*,  $L_{50}$ , qui correspond à la durée de conservation au bout de laquelle 50 % de la viabilité initiale est perdue. Les valeurs de  $L_{50}$  estimées à partir des données observées à des températures de conservation similaires par Bacchi (1958), Bendana (1962), Couturon (1980) et Van der Vossen (1977) (*figure 2*) montrent qu'il existe en fait deux optimums de teneur en eau pour la conservation à court terme des semences de caféier. Le premier (« bas ») se situe précisément à une teneur en eau de 10 % MF. Le second (« haut ») se situe à des teneurs en eau élevées, autour de 40 % MF. Les valeurs moyennes de  $L_{50}$  observées pour ces deux états hydriques optimums sont du même ordre de grandeur, autour de 40 mois (*figure 2*).

Par ailleurs, aucune des études réalisées à ce jour ne mentionne l'existence d'une interaction entre la température de conservation et la teneur en eau des semences sur leur longévité. L'effet de la teneur en eau sur la longévité des semences des autres espèces de caféiers n'a fait l'objet que de peu de travaux. Un effet négatif de la dessiccation sur la longévité des semences de *C. canephora* et *C. stenophylla* a néanmoins été constaté (Couturon, 1980 ; Hong et Ellis, 1995). Les durées de vie médiane,  $L_{50}$ , observées pour ces deux espèces étaient par ailleurs inférieures à celle observée pour les semences de *C. arabica* dans les mêmes conditions.

### Bases physiologiques du vieillissement rapide des semences de caféiers

Lorsqu'elles sont conservées à une température autour de 20 °C, les

semences de caféier montrent donc une perte rapide de leur viabilité dans trois plages hydriques (*figure 3*).

À des teneurs en eau inférieures à 10 % MF (humidités relatives inférieures à 45 %), leur conservation est en fait limitée par leur sensibilité à la dessiccation. Cette sensibilité ne permet donc pas de bénéficier du gain de longévité observé chez les semences orthodoxes lorsqu'on poursuit leur déshydratation dans cette plage hydrique (Ellis et Roberts, 1980).

Aux teneurs en eau les plus élevées, supérieures à 40 % MF, des phénomènes de pourrissement et de germination partielle des semences sont observés. Enfin, les semences de caféiers présentent une longévité particulièrement faible à des teneurs en eau intermédiaires, situées autour de 20 % MF. Ce phénomène de vieillissement rapide des semences dans la plage hydrique intermédiaire est le plus mal connu. Grâce au développement de nouvelles méthodes de biochimie analytique, comme par exemple la mise au point d'une méthode permettant une mesure précise des acides gras libres dans des semences riches en lipides (Laffargue *et al.*, 2007), les bases physiologiques du vieillissement rapide des semences conservées à des teneurs en eau proches de 20 % MF et à 15-25 °C ont pu être partiellement clarifiées (*figure 3*). Dans cette plage hydrique, plusieurs types de stress et de dommages cellulaires ont été observés (Dussert *et al.*, 2006a). Il existe par exemple une très bonne corrélation inverse entre le degré d'hydrolyse des lipides neutres (triacylglycérols), qui conduit à l'accumulation d'acides gras libres, et la viabilité des semences (bas de la *figure 3*). Les acides gras libres déstabilisent les systèmes membranaires et conduisent très rapidement à la perte de l'intégrité cellulaire (Crowe *et al.*, 1989). Dans cette plage hydrique, les membranes subissent un autre type de dommage : la perte sélective d'une classe de phospholipides, les phosphatidyléthanolamines, selon un mécanisme encore inconnu. Enfin, la chute rapide des deux principaux antioxydants hydrophiles, l'acide ascorbique et le glutathion réduit, témoigne du stress oxydant important subi par les semences dans cette plage hydrique intermédiaire.

Mais ces phénomènes d'altération cellulaire dans la plage hydrique

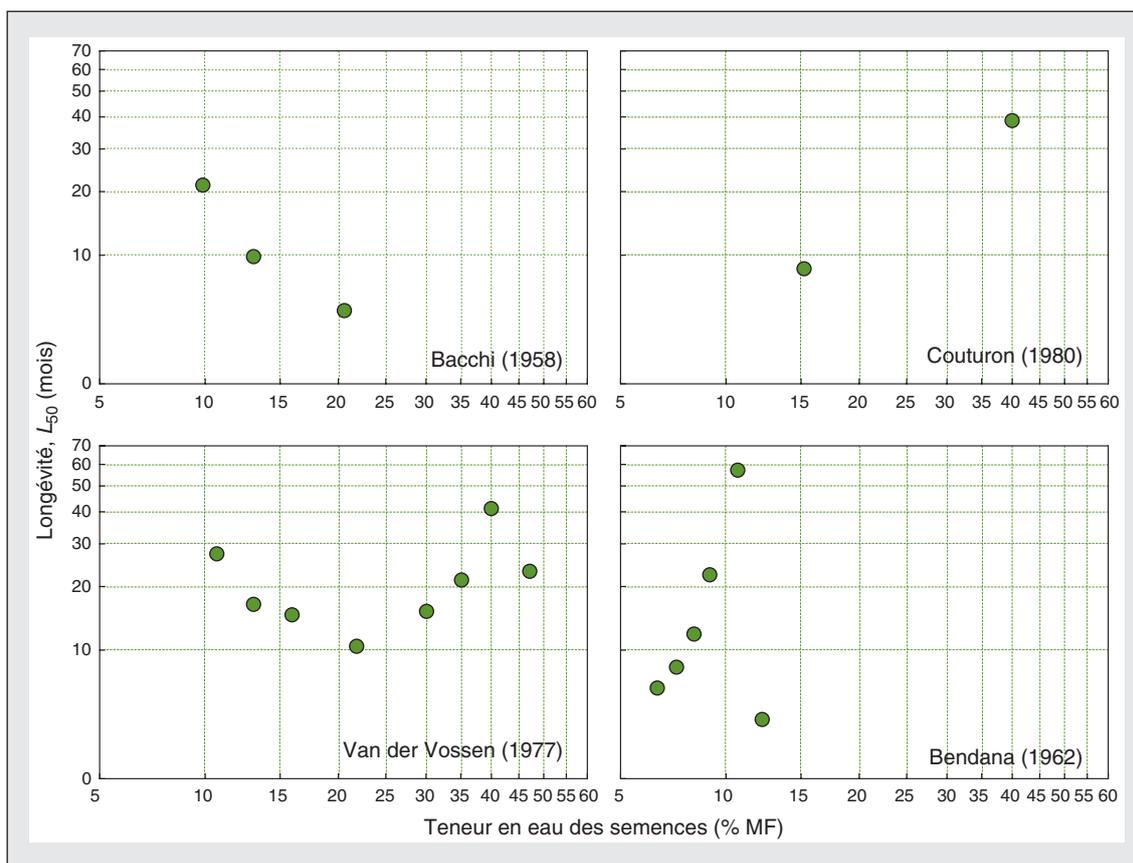


Figure 2. Effet de la teneur en eau des semences de *C. arabica* sur leur longévité à 15-25 °C.

Figure 2. Effect of the moisture content of *C. arabica* seeds on their longevity at 15-25 °C.

La longévité médiane des semences,  $L_{50}$ , a été calculée à l'aide d'une loi logistique appliquée aux données publiées par Bacchi (1958), Bendana (1962), Couturon (1980) et Van der Vossen (1977).

intermédiaire ne sont pas spécifiques des semences intermédiaires. Les mêmes types de stress ont été observés dans cette gamme de teneurs en eau chez les semences et pollen orthodoxes (Van Bilsen *et al.*, 1993 ; De Vos *et al.*, 1994). En conclusion, la réelle contrainte spécifique des semences intermédiaires sur ces aspects reste leur niveau élevé de sensibilité à la dessiccation.

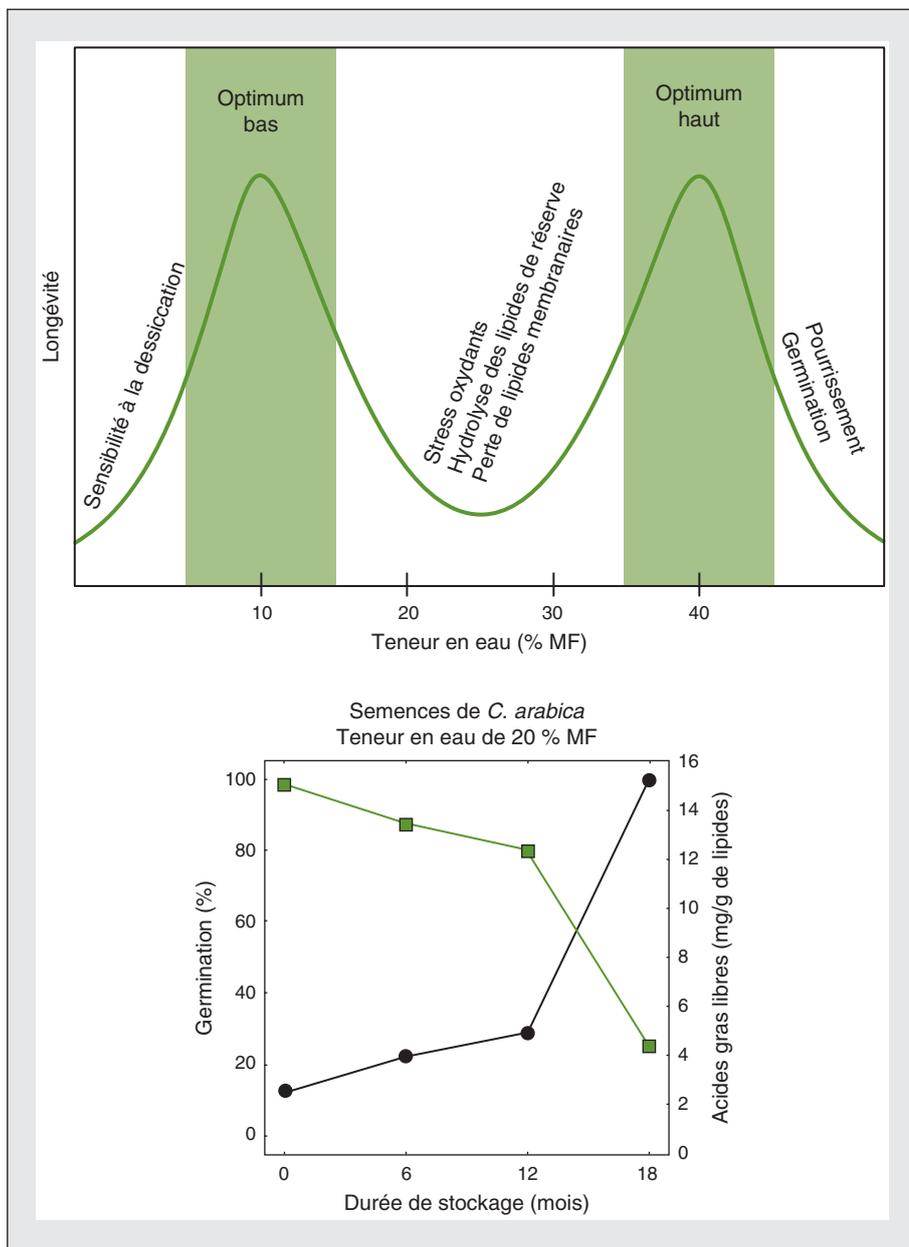
### Effet de la température de conservation et du mode de réhydratation des semences

Peu d'études se sont intéressées à l'effet de la température de conservation sur la viabilité à court terme des semences de caféiers. Deux travaux

(Van der Vossen, 1977 ; Couturon, 1980) montrent une diminution de la longévité des semences lorsque la température de conservation se situe au-dessus de 20 °C. Les travaux les plus anciens concernant l'abaissement de la température de conservation ont montré qu'il avait un effet négatif sur la longévité des semences de *C. arabica* (Van der Vossen, 1977 ; Ellis *et al.*, 1990) et *C. canephora* (Hong et Ellis, 1995). La sensibilité au froid des semences de *C. arabica* a cependant été réétudiée plus récemment en analysant les effets combinés de la température de stockage et du mode de réhydratation des semences avant leur semis (Dussert *et al.*, 2006b). Lorsque des semences de *C. arabica* à une teneur en eau de 10 % (HR de 45 %) sont conservées pendant 1 an à 5 °C puis sont placées directement ensuite en conditions de germination,

leur viabilité apparaît très altérée en comparaison des semences conservées à 20 °C (figure 4). En revanche, si les semences sont préhumidifiées pendant 24 heures dans une atmosphère saturée en eau ou si elles sont préchauffées à 40 °C pendant 4 heures avant leur semis, elles ne montrent plus aucune perte de viabilité par rapport aux semences conservées à 20 °C.

Ces deux traitements, la préhumidification et le préchauffage, sont connus pour prévenir les dommages membranaires survenant lors de l'imbibition lorsque les membranes cellulaires ont été rigidifiées par une exposition au froid (Hoekstra *et al.*, 1999). En fonction de leur composition en phospholipides et en acides gras, certains systèmes membranaires passent en effet de l'état cristallin (fluide) à l'état gel (rigide) lorsqu'ils



**Figure 3.** Schéma de synthèse des mécanismes impliqués dans la perte de viabilité des semences dans les plages hydriques basse, intermédiaire et haute qui encadrent les deux états hydriques optimaux pour la longévité des semences.

**Figure 3.** Synthetic scheme of the mechanisms involved in seed viability loss within the low, intermediary and high hydration windows that border the two optimal hydration levels for seed longevity.

L'évolution inverse de l'accumulation d'acides gras libres (ronds noirs) et de la perte de viabilité (carrés verts) présentée dans le bas de la figure illustre un des mécanismes de vieillissement rapide des semences identifié dans la plage hydrique intermédiaire (teneur en eau autour de 20 % de masse fraîche [MF]).

sont exposés au froid. La préhumidification ou le préchauffage des semences permettent de faciliter la transition de phase inverse et ainsi de refluidifier les membranes avant de les exposer aux contraintes physiques imposées par l'eau libre du milieu de germina-

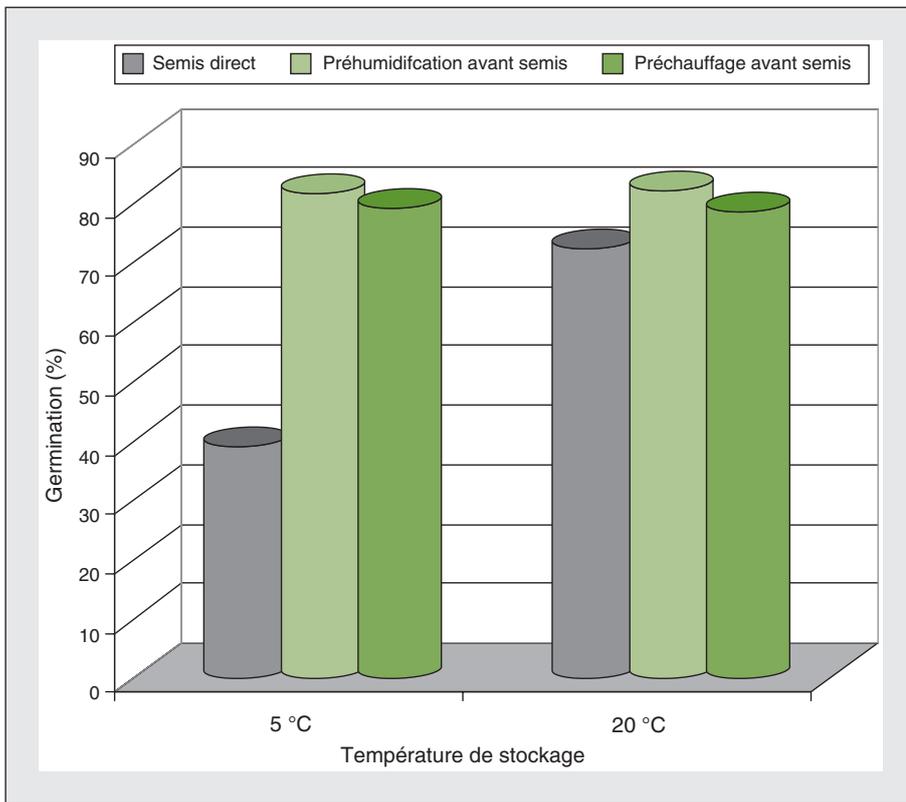
tion (Hoekstra *et al.*, 1988 ; Sacande *et al.* 2001).

Non seulement l'apparente perte de viabilité des semences de *C. arabica* exposées au froid correspond à des dommages liés à l'imbibition, mais il a été de plus montré que le stockage des

semences à 5 °C ralentit le stress oxydant, l'hydrolyse des lipides neutres et la perte sélective de certains phospholipides (Dussert *et al.*, 2006a). Ces résultats importants remettent en question un des deux critères retenus par Ellis *et al.* (1990) pour la définition des semences intermédiaires : l'effet négatif de l'abaissement de la température de stockage sur la longévité. Comme chez les semences orthodoxes, le froid ralentit les mécanismes de vieillissement cellulaire. La spécificité des semences intermédiaires quant à l'effet du froid résiderait donc principalement dans le comportement thermotropique de leurs membranes, notamment la température à laquelle les membranes changent d'état et se rigidifient.

### En pratique

Après le dépulpage des fruits par voie humide, les graines en parche destinées à la semence ne doivent pas suivre la procédure de séchage classiquement utilisée pour le café vert. Un ressuyage suivi d'un séchage rapide sous ombrage, dans un espace ventilé, est suffisant pour atteindre la teneur en eau optimale « haute » de 40 % MF (à la récolte la teneur en eau des graines est de 50 % MF). Les semences doivent alors être conditionnées dans des sacs en plastique fermés de manière hermétique pour éviter toute déshydratation supplémentaire. Pour les unités de production de semences ou les laboratoires équipés d'une chambre, ou d'une enceinte régulée dont l'humidité relative peut être précisément stabilisée à 45 %, le maintien des semences à teneur en eau optimale « basse » (10 % MF) pourra être envisagé. Cette option, qui offre théoriquement la plus grande longévité, requiert néanmoins une technicité plus élevée. Dans tous les cas, il est fortement recommandé de maintenir les lots à 15 °C. Le gain de longévité par rapport à un stockage à température ambiante (autour de 25 °C) est important (Van der Vossen, 1977) et cette température de stockage n'induit pas les dommages à l'imbibition observés à des températures plus basses. L'utilisation d'un réfrigérateur, ou d'une chambre froide, à 5 °C est envisageable si une préhumidification ou un préchauffage des semences sont réalisés en sortie de stockage avant le



**Figure 4.** Effet du mode de réhydratation sur le pourcentage de germination de semences de *C. arabica* à 10 % de masse fraîche (MF) conservées pendant 1 an à 5 et 20 °C.

**Figure 4.** Effect of the rehydration procedure on the germination percentage of *C. arabica* seeds at 10 % fresh weight moisture content stored for 1 year at 5 and 20 °C.

semis. Cette piste est à explorer pour des essais de conservation à moyen terme des semences de caféiers.

## Conservation à long terme des semences de caféiers

Pour les espèces à semences intermédiaires, la cryoconservation – le stockage dans l’azote liquide à -196 °C – est la seule technique disponible permettant la conservation à long terme des ressources génétiques (Engelmann, 2009). De plus, une étude récente montre que le coût de conservation d’une accession de caféier à moyen et long terme est bien moindre en utilisant la cryoconservation qu’en maintenant cette accession dans une collection en champ, comme cela est traditionnellement fait pour les

espèces à semences intermédiaires et récalcitrantes (Dulloo *et al.*, 2009).

### État hydrique optimal pour la cryoconservation des semences

La plage de teneurs en eau au sein de laquelle les graines de caféiers tolèrent une exposition à -196 °C est extrêmement étroite (Eira *et al.*, 1999 ; Dussert *et al.*, 2001). En général, elle se réduit même à un état hydrique optimal très précis. Chez *C. arabica*, par exemple, cet état optimal est atteint à l’équilibre dans une atmosphère ayant une humidité relative de 81 %. Toute humidité relative très légèrement inférieure ou supérieure à 81 % (plus ou moins 1 %) conduit à une chute brutale du taux de survie des semences cryoconservées (Dussert *et al.*, 2006b).

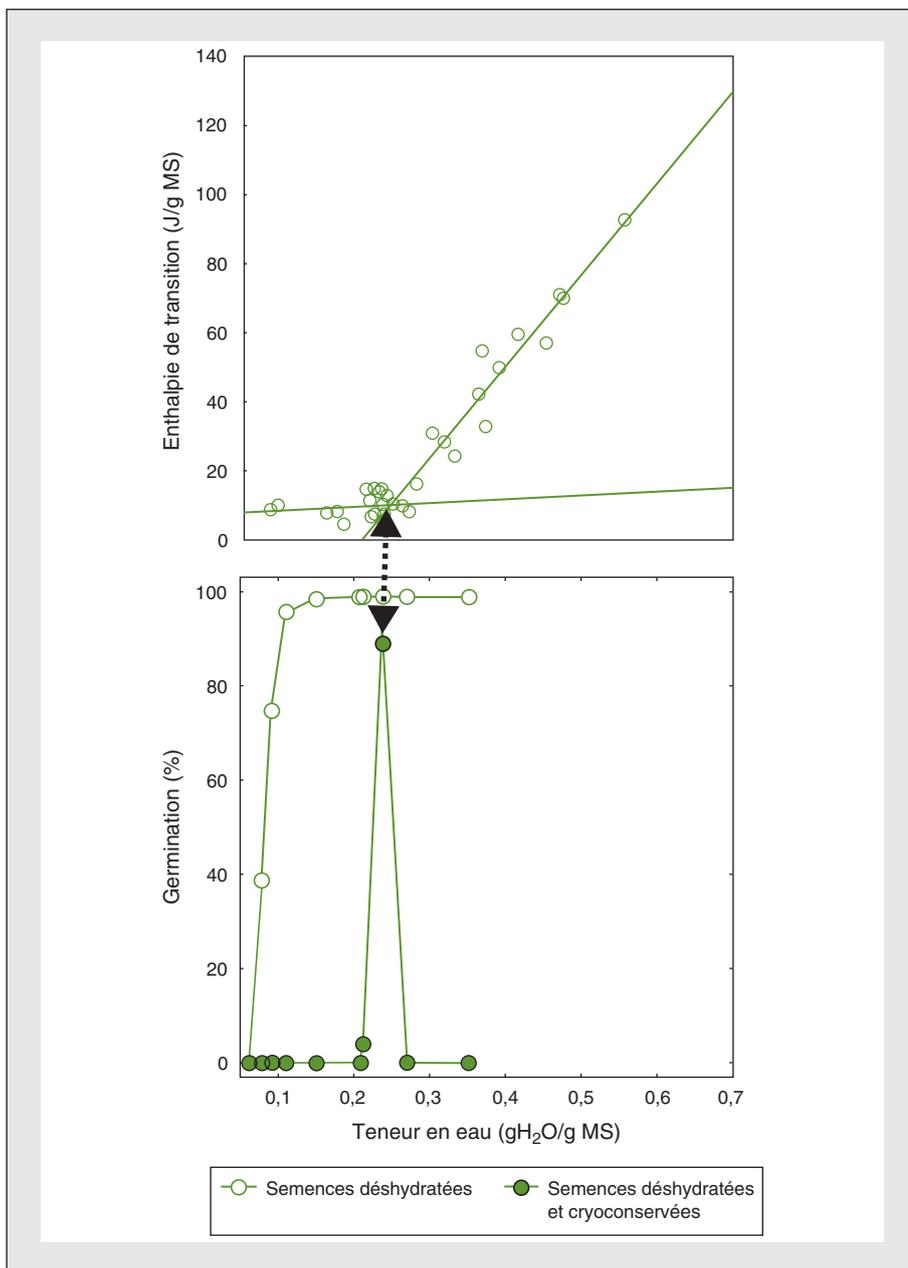
Exprimé en teneur en eau, l’état hydrique optimal pour la cryoconservation des semences diffère beaucoup

selon les espèces de caféiers (Dussert *et al.*, 2001). Néanmoins, il correspond toujours à l’état hydrique en dessous duquel l’eau contenue dans les cellules ne cristallise plus lors de leur refroidissement. Ceci a pu être démontré à l’aide de la microcalorimétrie différentielle à balayage qui permet de mesurer les flux de chaleur dans un tissu lors de son refroidissement et de son réchauffement. La cristallisation étant un phénomène exothermique, il est ainsi possible de mesurer la quantité de glace qui se forme dans les semences en fonction de leur teneur en eau (figure 5). Dans les semences de *C. arabica*, l’enthalpie de transition (flux de chaleur mesuré) décroît de manière linéaire en abaissant la teneur en eau des semences de 0,6 à 0,23 g H<sub>2</sub>O/g MS (de 37 à 18 % MF). En dessous de ce seuil, seule la chaleur associée à la cristallisation des lipides de réserve est enregistrée (figure 5). Cette teneur en eau seuil est appelée teneur en eau non cristallisable. Chez toutes les espèces de caféiers testées, elle coïncide avec l’état hydrique optimal pour la cryoconservation, démontrant ainsi qu’il est strictement nécessaire d’éviter la formation de glace intracellulaire pour la survie des semences.

L’état hydrique optimal pour la cryoconservation des semences est en revanche très peu variable entre les espèces du genre *Coffea* lorsqu’il est exprimé en termes d’humidité relative à l’équilibre (Dussert *et al.*, 2001) : il est toujours atteint par déshydratation dans une atmosphère dont l’humidité relative est proche de 80 %. La variabilité observée lorsque l’état hydrique optimal est décrit par la teneur en eau reflète en réalité celle existant au sein du genre pour la teneur en lipides des semences (10 à 35 % MS) : plus les semences sont riches en lipides, plus la teneur en eau optimale est basse. Cette teneur peut d’ailleurs être prédite en fonction de la teneur en lipides (Hor *et al.*, 2005).

### Effets des modes de refroidissement et de réchauffement des semences

Le contrôle de l’état hydrique des semences de caféiers n’est pas



**Figure 5.** Concordance entre l'état hydrique optimal pour la cryoconservation des semences (en bas) et la teneur en eau non cristallisable telle que mesurée par microcalorimétrie différentielle à balayage (en haut).

**Figure 5.** Correspondence between the optimal hydration status for seed cryopreservation (lower graph) and the unfrozen water content of seeds, as measured by Differential Scanning Calorimetry (upper graph).

toujours suffisant pour qu'elles tolèrent une exposition à  $-196^{\circ}\text{C}$ . Trois groupes d'espèces peuvent globalement être identifiés dans le genre *Coffea* (Dussert *et al.*, 2001).

Dans le premier groupe d'espèces, dont les semences sont les plus tolérantes à la dessiccation (par exemple *C. pseudozanguebariae*, *C. racemosa* et *C. sessiflora*), ces dernières

peuvent être simplement immergées dans l'azote liquide et réchauffées pendant quelques minutes à  $40^{\circ}\text{C}$  pour supporter sans dommages la cryoconservation.

Pour les espèces du second groupe qui inclut *C. arabica*, un contrôle précis de la vitesse de refroidissement ( $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) et de la vitesse de réchauffement ( $58^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) est nécessaire pour avoir

un taux de germination identique à celui des graines témoins (Dussert *et al.*, 2006b). Ce protocole a permis d'obtenir des taux de survie très élevés (supérieurs à 80 %) pour toutes les accessions de *C. arabica* testées jusqu'à présent (une centaine environ au CATIE, Costa Rica, et une autre centaine à l'IRD, Montpellier), qu'elles correspondent à des variétés traditionnelles, des mutants, des lignées introgressées ou des formes sauvages.

Le troisième groupe contient les espèces dont les semences sont les plus sensibles à la dessiccation (par exemple *C. brevipes* et *C. canephora*). À ce jour, les conditions nécessaires pour que leurs semences supportent la cryoconservation n'ont pas été définies. En revanche, après leur réchauffement, les embryons extraits des semences cryoconservées germent *in vitro* (Dussert *et al.*, 1997 ; Dussert *et al.*, 2001), ce qui constitue une alternative intéressante pour la sauvegarde à long terme des ressources génétiques des espèces de ce troisième groupe. Cela montre à nouveau la différence qui existe entre l'embryon et l'albumen pour leurs seuils respectifs de tolérance aux stress hydrique et thermique.

## Perspectives

Bien que des progrès aient été faits dans la compréhension des mécanismes impliqués dans le vieillissement des semences de caféiers, et sur les bases de l'état hydrique optimal pour la cryoconservation, de nombreux aspects de leur comportement restent à élucider. Par exemple, l'effet des basses températures positives ( $+5^{\circ}\text{C}$ ) n'a été que partiellement exploré. La raison pour laquelle les semences de *C. arabica* doivent être refroidies lentement pour supporter la cryoconservation est toujours inconnue. Il serait également intéressant de comprendre pourquoi la plage d'humidité relative au sein de laquelle les semences tolèrent une immersion dans l'azote liquide est si étroite, alors que celle entre la teneur en eau non cristallisable (humidité relative de 80 %) et le seuil de sensibilité à la dessiccation (humidité relative de 30 %) est assez large. Enfin, comme nous l'avons vu, la sensibilité à la dessiccation des

semences intermédiaires reste le principal obstacle tant pour leur conservation à court terme que pour leur cryoconservation.

À ce jour, la nature des dommages responsables de la perte de viabilité de ces semences lors de leur déshydratation, et les bases de la variabilité interspécifique observée pour ce caractère, n'ont pas été élucidées. Grâce au développement récent d'outils de génomique fonctionnelle chez le caféier (Joët *et al.*, 2012), nous avons entrepris la comparaison du transcriptome de la semence de caféier au cours de sa maturation à celui d'une semence orthodoxe. Mais cette approche devra être complétée par d'autres stratégies. Notamment, plusieurs résultats suggèrent que les changements d'état des membranes sont responsables de dommages qui prennent place lors de l'imbibition des semences. Dans cette perspective, les nouveaux outils d'analyse globale des lipides (Welti *et al.*, 2007) devraient permettre de caractériser de manière précise la composition des systèmes membranaires des semences de caféiers et, à terme, de mieux décrire leur comportement biophysique lors de la déshydratation et de la réhydratation des semences. ■

## Références

- Bacchi O, 1955. Seca de semente de café ao sol. *Bragantia* 14 : 225-36.
- Bacchi O, 1958. Estudos sobre a conservação de sementes IV-café. *Bragantia* 17 : 261-70.
- Bendana F, 1962. The physiology of coffee seeds I. Problems related to storage. *Coffee* 4 : 73-5.
- Chabrilange N, Dussert S, Engelmann F, Doubeau S, Hamon S, 2000. Desiccation tolerance in relation to soluble sugar contents in seeds of ten coffee (*Coffea* L.) species. *Seed Science Research* 10 : 393-6.
- Couturon E, 1980. Le maintien de la viabilité des graines de caféiers par le contrôle de leur teneur en eau et de la température de stockage. *Café Cacao Thé* 24 : 27-32.
- Crowe JH, Mckersie BD, Crowe LM, 1989. Effects of free fatty acids and transition temperature on the stability of dry liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 979 : 7-10.
- Davis AP, Govaerts R, Bridson SM, Stoffelen P, 2006. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 152 : 465-512.
- De Vos RCH, Kraak HL, Bino RJ, 1994. Ageing of tomato seeds involves glutathione oxidation. *Physiologia Plantarum* 92 : 131-9.
- Dulloo ME, Ebert AW, Dussert S, Gotor E, Astorga C, Vasquez N, *et al.*, 2009. Cost efficiency of cryopreservation as a long term conservation method for coffee genetic resources. *Crop Science* 49 : 2123-38.
- Dussert S, Chabrilange N, Engelmann F, Anthony F, Hamon S, 1997. Cryopreservation of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds : importance of the precooling temperature. *CryoLetters* 18 : 269-76.
- Dussert S, Chabrilange N, Engelmann F, Hamon S, 1999. Quantitative estimation of seed desiccation sensitivity using a quantal response model : application to nine species of the genus *Coffea* L. *Seed Science Research* 9 : 135-44.
- Dussert S, Chabrilange N, Rocquelin G, Engelmann F, Lopez M, Hamon S, 2001. Tolerance of coffee (*Coffea* spp.) seeds to ultra-low temperature exposure in relation to calorimetric properties of tissue water, lipid composition and cooling procedure. *Physiologia Plantarum* 112 : 495-504.
- Dussert S, Chabrilange N, Montillet JL, Agnel JP, Engelmann F, Noiro M, 2003. Basis of coffee seed sensitivity to liquid nitrogen exposure : oxidative stress or imbibitional damage? *Physiologia Plantarum* 119 : 534-43.
- Dussert S, Engelmann F, 2006. New determinants of coffee (*Coffea arabica* L.) seed tolerance to liquid nitrogen exposure. *CryoLetters* 27 : 169-78.
- Dussert S, Davey MW, Laffargue A, Doubeau S, Swennen R, Etienne H, 2006. Oxidative stress, phospholipid loss and lipid hydrolysis during drying and storage of intermediate seeds. *Physiologia Plantarum* 127 : 192-204.
- Eira MTS, Walters C, Caldas LS, Fazuoli LC, Sampaio JB, Dias MC, 1999. Tolerance of *Coffea* spp. seeds to desiccation and low temperature. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 11 : 97-105.
- Eira MTS, Amaral da Silva EA, de Castro RD, Dussert S, Walters C, Bewley D, *et al.*, 2006. Coffee seed physiology. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18 : 149-63.
- Ellis RH, Roberts EH, 1980. Improved equations for the prediction of seed longevity. *Annals of Botany* 63 : 601-11.
- Ellis RH, Hong TD, Roberts EH, 1990. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. *Journal of Experimental Botany* 41 : 1167-74.
- Engelman F, 2009. Biotechnologies et conservation des ressources phylogénétiques. *Cahiers Agricultures* 18 : 481-5. doi : 10.1684/agr.2009.0346
- Hoekstra FA, van der Wal EW, 1988. Initial moisture content and temperature of imbibition determine extent of imbibitional injury in pollen. *Journal of Plant Physiology* 133 : 257-62.
- Hoekstra FA, Golovina EA, van Aelst AC, Hemminga MA, 1999. Imbibitional leakage from anhydrobiotes revisited. *Plant, Cell and Environment* 22 : 1121-31.
- Hong TD, Ellis RH, 1995. Interspecific variation in seed storage behaviour within two genera - *Coffea* and *Citrus*. *Seed Science and Technology* 23 : 165-81.
- Hor HY, Kim YJ, Ugap A, Chabrilange N, Sinniah UR, Engelmann F, *et al.*, 2005. Optimal hydration status for cryopreservation of intermediate oily seeds : *Citrus* as a case study. *Annals of Botany* 95 : 1153-61.
- Joët T, Laffargue A, Salmona J, Doubeau S, Descroix D, Bertrand B, *et al.*, 2009. Metabolic pathways in tropical dicotyledonous albuminous seeds : *Coffea arabica* as a case study. *New Phytologist* 182 : 146-62.
- Joët T, Pot D, Pires Ferreira L, Dussert S, Marraccini P, 2012. Identification des déterminants moléculaires de la qualité du café par des approches de génomique fonctionnelle. Une revue. *Cahiers Agricultures* 21 : 125-33. doi : 10.1684/agr.2012.0548
- Laffargue A, De Kochko A, Dussert S, 2007. Development of solid-phase extraction and methylation procedures to analyse free fatty acids in lipid-rich seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 45 : 250-7.
- Roberts EH, 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology* 1 : 499-514.
- Sacandé M, Golovina EA, van Aelst AC, Hoekstra FA, 2001. Viability loss of neem (*Azadirachta indica*) seeds associated with membrane phase behaviour. *Journal of Experimental Botany* 52 : 919-31.
- Van Bilsen DGJL, Hoekstra FA, 1993. Decreased membrane integrity in aging *Typha latifolia* L. pollen. Accumulation of lysolipids and free fatty acids. *Plant Physiology* 101 : 675-82.
- Van der Vossen HAM, 1977. Methods of preserving the viability of coffee seed in storage. *Kenya Coffee* 45 : 31-5.
- Welti R, Shah J, Li W, Li M, Chen J, Burke JJ, *et al.*, 2007. Plant lipidomics : Discerning biological function by profiling plant complex lipids using mass spectrometry. *Frontiers in Bioscience* 12 : 2494-506.