

Un exemple de transfert de technologie réussi dans le domaine de la micropropagation : la multiplication de *Coffea arabica* par embryogenèse somatique

Hervé Etienne¹
 Benoît Bertrand¹
 Christophe Montagnon¹
 Roberto Bobadilla Landey¹
 Eveline Dechamp¹
 Isabelle Jourdan¹
 Edgardo Alpizar²
 Eduardo Malo²
 Frédéric Georget¹

¹ Cirad
 UMR RPB
 TA A-98/IRD
 IRD
 911, avenue Agropolis
 BP 64501
 34394 Montpellier cedex 5
 France
 <herve.etienne@cirad.fr>
 <benoit.bertrand@cirad.fr>
 <christophe.montagnon@cirad.fr>
 <ravenlandey@hotmail.com>
 <eveline.dechamp@ird.fr>
 <isabelle.jourdan@cirad.fr>
 <frederic.georget@cirad.fr>

² Exportadora Atlantic S.A.
 ECOM Coffee Group
 De la Rotonda Jean Paul Genie 350 metros
 este
 Centro Ejecutivo San Marino
 Módulo A-101
 Managua
 Nicaragua
 <ealpizar@ecomtrading.com>
 <EGarcia@ecomtrading.com>

Résumé

Parmi les techniques possibles de micropropagation, la multiplication végétative par embryogenèse somatique est de loin la plus prometteuse pour la diffusion rapide et à grande échelle d'individus élités. Pourtant à ce jour, il n'existe que de très rares exemples de procédés de propagation par embryogenèse somatique appliqués au niveau commercial. Les verrous sont multiples et se situent le plus souvent au niveau d'un effet génotypique important en particulier pour l'obtention de tissus embryogènes, au niveau de la qualité des embryons somatiques régénérés, de l'incidence de variations somaclonales et plus généralement au niveau du manque de reproductibilité et d'efficacité de certaines étapes, conduisant à des coûts de production jusqu'ici prohibitifs. Les recherches sur l'embryogenèse somatique du caféier ont débuté dans différents instituts, y compris le Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (Cirad), dès la fin des années 1970. Entre 1995 et 2001, le Cirad a fait évoluer la technique utilisée à l'échelle d'un laboratoire de recherche vers un procédé permettant la diffusion industrielle d'hybrides F1 de *Coffea arabica* extrêmement prometteurs. Au cours de cette période, deux innovations technologiques ont rendu le transfert industriel économiquement possible : la production en masse d'embryons somatiques en bioréacteurs à immersion temporaire et la possibilité de les semer directement en pépinière. Parallèlement, des données rassurantes concernant la conformité génétique des plantes régénérées étaient obtenues (fréquence de variations somaclonales < 3 %). En 2002, le Cirad en partenariat avec le groupe ECOM a décidé le transfert industriel de la méthode d'embryogenèse somatique pour diffuser en Amérique centrale quatre clones d'hybrides d'Arabica sélectionnés pour des systèmes de culture agroforestiers. Le présent article décrit chez le caféier les différentes étapes et les difficultés qui ont dû être surmontées jusqu'à un transfert technologique réussi en 2010 et à un des tout premiers exemples d'application commerciale de la technique d'embryogenèse somatique.

Mots clés : coûts de production ; embryogenèse somatique ; pépinière ; transfert de technologie ; variation somaclonale.

Thèmes : amélioration génétique ; productions végétales.

Abstract

An example of successful technology transfer in micropropagation: *Coffea arabica* multiplication by somatic embryogenesis

Of all the possible micropropagation techniques, vegetative propagation by somatic embryogenesis is by far the most promising one for the rapid, large-scale dissemination of elite individuals. Yet, to date, examples of somatic embryogenesis processes applied at an industrial scale are very few and far between. There are many complications. They usually involve a major genotypic effect, particularly for obtaining embryogenic tissues, or are

Pour citer cet article : Etienne H, Bertrand B, Montagnon C, Bobadilla Landey R, Dechamp E, Jourdan I, Alpizar E, Malo E, Georget F, 2012. Un exemple de transfert de technologie réussi dans le domaine de la micropropagation : la multiplication de *Coffea arabica* par embryogenèse somatique. *Cah Agric* 21 : 115-24. doi : 10.1684/agr.2012.0553

related to the quality of regenerated somatic embryos, the incidence of somaclonal variation and, more generally, a lack of reproducibility and efficiency at certain stages of the process, leading to production costs that are prohibitive. Research on coffee somatic embryogenesis began at the end of the 1970s at various institutes, including Cirad. Between 1995 and 2001, Cirad moved the technique forward from a research laboratory scale to a technique enabling industrial dissemination of extremely promising *Coffea arabica* F1 hybrids. Over that period, two technological innovations made technology transfer economically feasible : mass production of somatic embryos in temporary immersion bioreactors and the possibility of sowing them directly in the nursery. At the same time, reassuring data were obtained on the genetic conformity of regenerated plants (somaclonal variation frequency < 3%). In 2002, in partnership with the ECOM group, Cirad decided to transfer the somatic embryogenesis method on an industrial scale to Central America so that four Arabica hybrid clones, that were selected for agroforestry-based farming systems could be disseminated throughout that part of the world. This article describes the different stages and the difficulties we had to overcome in coffee tree before successful technology transfer could occur in 2010. It describes one of the first examples of somatic embryogenesis technology applied at a commercial scale.

Key words: nursery; production costs; somaclonal variation; somatic embryogenesis; technology transfer.

Subjects: genetic improvement; vegetal productions.

Introduction

L'embryogenèse somatique, une technologie très attendue !

Lorsqu'elle est initiée, comme chez le caféier, à partir de tissus (ou « explants ») prélevés sur l'arbre adulte, l'embryogenèse somatique permet la propagation végétative rapide et massive de génotypes élites en s'affranchissant des longs et coûteux processus de sélection généalogique. À ce jour, il n'existe pourtant que de très rares exemples d'application commerciale de procédés d'embryogenèse somatique. On peut citer comme exemples le pin à encens (*Pinus taeda*) (Gupta et Hartle, 2010), le palmier à huile (Khaw *et al.*, 1999) ou encore le caféier, que ce soit l'espèce *C. arabica* (présent article) ou *C. canephora* (Sampote *et al.*, 2006 ; Ducos *et al.*, 2010), pour lesquels la production annuelle dépasse à présent un à plusieurs millions de plantes. Pourtant, de l'avis général, cette technique de multiplication végétative est de loin la plus prometteuse pour capturer au plus vite le gain génétique par la diffusion rapide et à grande échelle des individus élites. Cela est

d'autant plus vrai pour les espèces ligneuses dont les cycles biologiques et, partant, les délais pour la production de variétés nouvelles, sont longs. Les blocages pour développer cette technologie sont multiples et se situent le plus souvent au niveau d'un effet génotypique important, en particulier pour l'obtention de tissus embryogènes, au niveau de la qualité des embryons somatiques régénérés, de l'incidence de variations somaclonales et plus généralement au niveau du manque de reproductibilité et d'efficacité de certaines étapes conduisant à des coûts de production jusqu'ici prohibitifs.

Diffuser au plus vite le progrès génétique chez l'espèce *C. arabica*

Les recherches sur l'embryogenèse somatique du caféier ont débuté dans différents instituts, y compris au Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (Cirad), dès la fin des années 1970 mais sans objectif très clair. Au début des années 1990, le Cirad en partenariat avec le réseau de recherche centraméricain PROMECAFE se lance dans la création d'hybrides F1 intraspécifiques chez

C. arabica en croisant les variétés traditionnellement cultivées en Amérique latine et des individus sauvages originaires d'Éthiopie et du Kenya. Les hybrides ainsi obtenus se révèlent extrêmement prometteurs car ils présentent un fort niveau d'hétérosis, avec des gains de rendement de l'ordre de 40 % comparés aux meilleures variétés cultivées, et certains d'entre eux produisent un café dont la qualité organoleptique s'avère supérieure à celle des variétés de référence (Bertrand *et al.*, 2005 ; Bertrand *et al.*, 2012). La nécessité de disposer d'un procédé d'embryogenèse somatique capable de propager massivement les meilleurs clones d'hybrides F1 d'Arabica s'impose rapidement auprès des co-obtenteurs de ces nouvelles variétés. Mais un pas important de la technique reste à franchir pour industrialiser les techniques mises au point en laboratoire de recherche et permettre la production annuelle de plusieurs millions de plants. Les co-obtenteurs décident de financer la recherche nécessaire pour réussir ce premier changement d'échelle. Il sera réalisé sous la direction du Cirad au CATIE (*Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza*), centre de recherche régional situé au Costa Rica.

Résultats

État des lieux avant le transfert technologique (1995-1996) :

repérage des points à améliorer

Plusieurs limitations sont identifiées qui s'opposent à l'industrialisation du procédé d'embryogenèse somatique développé jusqu'ici par le Cirad. Les coûts de production selon les conditions de culture varient de 1,5 à 2 dollars US/plante alors qu'un semencier conventionnel se vend 0,25-0,35 dollar US ! Handicap supplémentaire, en Amérique latine, les densités de plantation pratiquées pour l'Arabica se situent entre 6 000 et 8 000 arbres/hectare en raison du nanisme des variétés utilisées qui a permis l'intensification de la production depuis les années 1960. Le surcoût nécessaire pour planter des vitroplants doit être limité même si une plus-value significative est espérée avec du matériel hybride. Le calcul a également permis d'identifier précisément les étapes du procédé responsables de ce coût de production élevé ; il s'agit des étapes tardives incluant la germination et le développement en plantules possédant au moins deux paires de feuilles pour supporter le choc de l'acclimatation aux conditions *ex vitro*. Cette période de croissance *in vitro* demande classiquement une main-d'œuvre importante à cause de l'inévitable repiquage mensuel et de la fabrication des milieux nutritifs gélifiés mais aussi la mobilisation de surfaces importantes dans les salles de culture. La deuxième limitation est le risque non évalué jusqu'alors que le procédé d'embryogenèse somatique puisse provoquer une fréquence élevée de variations somaclonales. Ces « erreurs de photocopie » sont indésirables car les plants « variants » ne présentent plus toutes les qualités agronomiques de la « plante mère » sélectionnée. Les variations somaclonales représentent un problème récurrent pour les cultures *in vitro* et particulièrement pour les systèmes d'embryogenèse somatique qui font intervenir des concentrations relativement élevées d'auxines telles que le 2,4-D et l'acide indole 3-acétique (AIA) pour induire la formation et la

multiplication de cellules embryogènes. L'implication de ces régulateurs de croissance dans l'induction des variations somaclonales est connue depuis longtemps (Karp, 1994).

Des innovations technologiques et des informations rassurantes sur la conformité génétique (1996-2001)

Au cours de cette période, deux innovations techniques rendent un transfert technologique économiquement possible : i) la production en masse d'embryons somatiques prégermés en bioréacteurs à immersion temporaire (Etienne-Barry *et al.*, 1999 ; Albarrán *et al.*, 2005) ; et ii) la possibilité de se semer directement sur substrat horticole pour obtenir une régénération de plantules photo-autotrophes en pépinière (Etienne-Barry *et al.*, 1999 ; Etienne-Barry *et al.*, 2002a ; Etienne-Barry *et al.*, 2002b). Ces deux sauts technologiques permettent de déplacer la plus grande partie des étapes tardives (germination, conversion des embryons en plantes) du laboratoire vers la pépinière, ce qui réduit considérablement les coûts de production. Le prix de revient d'une plantule est ainsi estimé à 0,5 dollar US. Le pari est fait qu'une réduction des coûts sera encore possible en passant aux conditions de production industrielle. Parallèlement, des données rassurantes concernant la conformité génétique des plantes régénérées sont obtenues. D'une part, la fréquence des variants somaclonaux au champ s'avère relativement faible (inférieure à 3 %). D'autre part, les seules variations observées en cinq années sont qualitatives, c'est-à-dire aisément identifiables au niveau phénotypique, et non quantitatives. Par exemple, la quantité de café produite ou la teneur du grain en éléments biochimiques ne sont pas modifiées (Etienne et Bertrand, 2001). Sept types de variants phénotypiques sont alors décrits ; les variants Angustifolia (feuilles étroites), Variegata (panachure des feuilles) et Nain sont les plus fréquents (Etienne et Bertrand, 2003). Par ailleurs sont précisées des conditions de multiplication du matériel embryogène en suspensions cellulaires permettant de limiter la régénération

de variants somaclonaux. En 2001, le procédé est donc considéré comme transférable au niveau industriel, d'autant plus qu'il a fonctionné sur la totalité des 19 hybrides F1 testés.

Montage du partenariat (2003)

À partir de 1999-2000, le Cirad est décidé à aller jusqu'au terme du processus de valorisation de l'embryogenèse somatique pour multiplier à grande échelle les hybrides F1 mais aussi pour acquérir une expérience utile pour les autres espèces tropicales pour lesquelles l'application de cette technologie est envisagée. Il recherche un partenaire intéressé par ce transfert technologique chez *C. arabica*. Un contrat est signé avec le groupe suisse ECOM en 2003. À cette époque, les essais agronomiques à partir de clones d'hybrides F1 révèlent leur remarquable adaptation aux conditions agroforestières et confirment l'excellence de certains hybrides F1 au niveau organoleptique (Bertrand *et al.*, 2011). Or la majorité des caféières en Amérique latine est conduite en agroforesterie. L'adoption des hybrides F1 pourrait permettre d'augmenter les quantités et la qualité du café produit. Les partenaires choisissent le Nicaragua comme lieu de transfert technologique pour diffuser les hybrides d'Arabica dans toute l'Amérique centrale. Chacun des deux partenaires est cependant conscient de la difficulté d'un tel transfert technologique mais probablement pour des raisons différentes. Le Cirad est concentré sur les difficultés d'ordre technique liées au transfert technologique proprement dit et au changement d'échelle important à réussir (passer d'une production annuelle de 50 000 plantes à plusieurs millions). De son côté, le principal souci du partenaire est l'accueil réservé au nouveau matériel car il s'inquiète à juste titre de sa double particularité : hybride F1 et vitroplant. A cette date il n'existe pas d'exemple connu de programme de sélection ayant conduit à la diffusion commerciale d'hybrides F1 ou de vitroplants. Le marché est à créer de toutes pièces et les réticences de la part des « lobbies antihybrides » et de certains consommateurs risquent d'être nombreuses.

Construction des infrastructures et premiers ajustements (2004-2006)

Le choix a été fait de construire un laboratoire fonctionnel de 300 m² (figure 1A), une structure assez petite pour limiter les coûts de production. Il est également décidé de le localiser sur

le même site qu'une grande usine de traitement de café à Sebaco, une petite ville située à 100 km de la capitale Managua, l'objectif étant que les nombreux producteurs qui livrent leur café pour traitement à l'usine, puissent également découvrir le matériel hybride et se familiariser avec cette méthode innovante de micropropagation *in vitro*. Une collection de « pied mères » d'hybrides sélectionnés est installée

à proximité du laboratoire. Elle fournira le matériel végétal de base nécessaire à la propagation *in vitro*. Six à huit copies clonales obtenues par bouturage horticole ou greffage de chaque hybride sélectionné y sont maintenues à l'état végétatif (pas de fructification) et dans un excellent état sanitaire afin de favoriser la réactivité des explants introduits en culture *in vitro*. Les pépinières d'acclimatation



Figure 1. Les laboratoires de propagation *in vitro* du caféier de Sebacco au Nicaragua et de Xalapa au Mexique.

Figure 1. Coffee *in vitro* propagation laboratories of Sebacco, Nicaragua and Xalapa, Mexico.

Laboratoires de Sebacco au Nicaragua. A) vue extérieure ; B) salle des suspensions cellulaires ; C) salle de repiquage ; D) salle de culture en bioréacteurs de Xalapa au Mexique ; E) vue extérieure ; F) salle de préparation des milieux.

des embryons somatiques, d'endurcissement et de grossissement sont mises en place dans une ferme appartenant à l'un des producteurs du groupe, située à 30 km du laboratoire, dans la zone de culture du caféier.

Durant ces deux années, un certain nombre de difficultés techniques, liées notamment à la qualité de l'eau et aux fréquentes coupures d'électricité, ont dû être résolues. Il a par ailleurs fallu former le personnel nécessaire.

Production industrielle et changement d'échelle (2007-2011)

Au cours de l'année 2007, la plupart des problèmes techniques sont réglés et une équipe de 25 personnes, dont 11 travaillant au laboratoire, est formée et organisée. L'activité de production démarre début 2007 et augmente

régulièrement au cours des trois années suivantes : 30 000 plantes sont vendues en 2007, 280 000 en 2008, 650 000 en 2009, 1 000 000 en 2010 et 1 400 000 plantes en 2011. À terme, l'objectif de production annuelle de ce laboratoire, sans modification ou supplément de moyens, est de 5 millions de plantes. Ce changement d'échelle peut être atteint par des optimisations techniques sur le procédé. Au cours de cette période, une dizaine de clones d'hybrides F1 ont été produits. La plantation de 3 millions de vitroplants de caféiers cultivés en conditions agroforestières en Mésio-Amérique et au Mexique a été réalisée. Les premières productions préindustrielles sont l'occasion de tester chaque étape du procédé d'embryogenèse somatique, d'identifier des points de blocage et de réaliser des optimisations importantes. Nous détaillons cette expérience étape par étape dans la suite.

Performances au niveau industriel des différentes étapes du procédé

Les différentes étapes du procédé d'embryogenèse somatique sont schématisées dans la *figure 2*. L'ensemble du clonage, allant de l'introduction des fragments de feuilles jusqu'à la production de plantes pouvant être transférées au champ, nécessite près de 2 ans dont 8 mois de pépinière. La production commerciale a commencé après vérification de la conformité génétique de tous les pieds mères en utilisant des marqueurs moléculaires de type microsatellites (SSR).

Production des tissus embryogènes

Cette étape ne pose pas de problème chez l'Arabica sinon qu'elle est relativement longue (8-10 mois). La totalité des explants réagit en produisant un cal primaire cicatriciel (*figure 3A*) et 10 à 40 % d'entre eux selon les génotypes

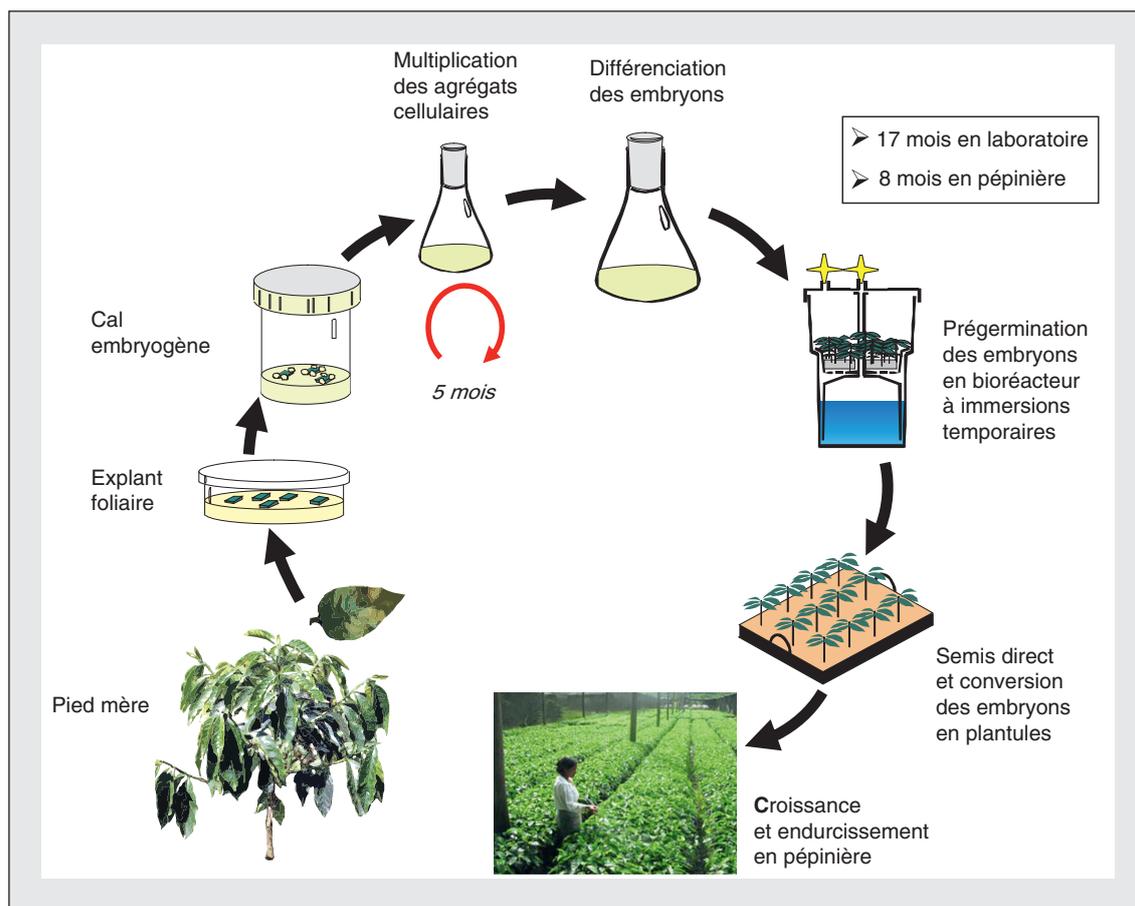


Figure 2. Représentation schématique du procédé industriel de propagation *in vitro* du caféier par embryogenèse somatique.

Figure 2. Schematic representation of the coffee somatic embryogenesis process transferred at the industrial scale.

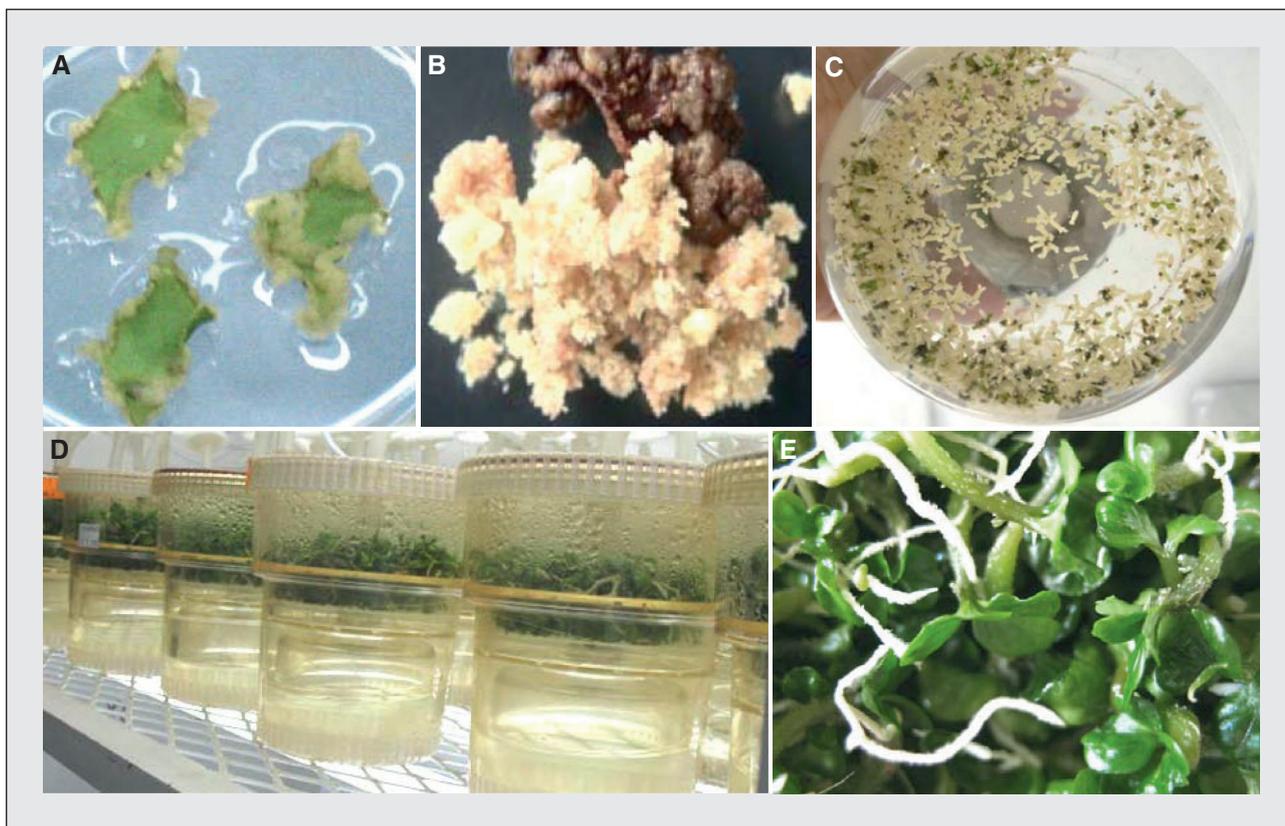


Figure 3. Différents stades de développement des tissus de caféier cultivés au cours des phases *in vitro* du procédé d'embryogenèse somatique.

Figure 3. Development stages of coffee tissues during the *in vitro* steps of the somatic embryogenesis process.

A) explant foliaire un mois après introduction *in vitro* ; B) cal embryogène 8 mois après introduction ; C) différenciation des embryons somatiques en fioles d'Erlenmeyer ; D) prégermination des embryons en bioréacteurs à immersion temporaire de type RITA® ; E) embryons somatiques prégermés prêts pour leur transfert *ex vitro*.

produisent un cal secondaire embryogène (*figure 3B*). Ces fréquences sont suffisantes pour une production à grande échelle, d'autant plus que les tissus embryogènes sont multipliés par la suite sous forme de suspensions d'agrégats cellulaires. Un effet génotypique relativement marqué existe mais il est facilement pris en compte en adaptant les quantités d'explants foliaires introduits.

Multiplication des tissus embryogènes et différenciation des embryons

Ces deux étapes sont réalisées en milieu liquide en fioles d'Erlenmeyer sous agitation (*figure 1B*). Plusieurs millions d'embryons sont produits annuellement sur 4 m² de tables d'agitation. Elles ne posent aucun problème au niveau industriel mais requièrent un savoir-faire technique important par rapport aux autres étapes, en particulier pour l'établissement initial des suspensions. Ces

étapes permettent également une synchronisation importante du développement du matériel végétal qui perdurera par la suite et permettra de réduire le travail associé au tri des embryons acclimatables. À chacune de ces étapes correspond ainsi un stade unique de développement, c'est-à-dire agrégats embryogènes puis embryons au stade torpille pleinement développés au terme de l'étape de différenciation (*figure 3C*).

Prégermination des embryons somatiques en bioréacteurs

Quatre millions d'embryons prégermés ont été produits en 2010 dans des bioréacteurs à immersion temporaire d'un litre de type RITA® (Teisson et Alvard, 1995 [*figures 1C, 1D, 3D*]). La collecte de l'ensemble des embryons prégermés (*figure 3E*) capables de régénérer des plantules en pépinière nécessite 2 à 3 récoltes à partir de ces bioréacteurs. Des essais avec des

bioréacteurs plus grands ont montré plusieurs avantages : un gain d'efficacité, en produisant une plus grande quantité d'embryons acclimatables pour une même quantité de travail ; moins de bioréacteurs donc moins d'investissement et moins de travail de nettoyage des différentes pièces constitutives ; un brassage des embryons obtenus dans un volume plus grand bien plus efficace et qui s'accompagne d'une meilleure synchronisation au cours des premières étapes de la germination. Cette optimisation se traduit directement par la possibilité de récolter en une seule fois la totalité des embryons transférables en pépinière.

Semis direct des embryons prégermés en sol horticole et conversion en plantules

Il s'agit de l'étape la plus délicate du procédé. Ce transfert est réalisé sous hygrométrie saturante sous tunnels à



Figure 4. Pépinières de vitroplants de caféier au Nicaragua.

Figure 4. Nurseries of somatic embryo-derived coffee plants in Nicaragua.

A et B) vue des tunnels d'acclimatation ; C) aspect des plantules obtenues par semis des embryons prégermés ; D et F) transfert des plantules en tubes de 200 mL et E) endurcissement ; G et H) vues des pépinières de grossissement (ferme « La Cumplida », Matagalpa, Nicaragua).

couverture plastique (figure 4A). Les embryons somatiques y sont cultivés à forte densité sur un substrat inerte à base de tourbe (figure 4B). Actuellement, cette étape constitue un goulot d'étranglement au niveau industriel puisqu'en moyenne, pour l'ensemble des 11 génotypes propagés, seulement 50 % des embryons régénèrent des plantules (figure 4C). Un effet

génotypique assez fort est observé entre les clones d'hybrides propagés. La durée moyenne nécessaire à la conversion en plantes après semis est relativement longue (22 à 24 semaines) en comparaison avec les plantules issues de semences (14 à 15 semaines). La conversion en plantes est asynchrone et deux ou trois récoltes successives sont nécessaires.

Ces observations illustrent la marge de progression importante possible sur cette étape.

Grossissement en pépinière

Les plantules présentant 2 à 3 paires de feuilles sont transférées dans des conditions de pépinière plus traditionnelles où elles sont acclimatées aux conditions extérieures en

réduisant progressivement l'humidité relative et en augmentant l'intensité lumineuse (figures 4D, 4E, 4G, 4H). Cette étape est bien maîtrisée et ne pose aucune difficulté. Même si la croissance initiale des plants issus d'embryons somatiques est plus lente et plus hétérogène que celle de leurs homologues issus de graines, en fin de séjour en pépinière ils ont rattrapé leur retard et s'avèrent même plus vigoureux que ces derniers (Menéndez-Yuffa *et al.*, 2010, [figure 4H]). Neuf pour cent des plantes sont écartées au cours du contrôle de qualité réalisé au terme de l'étape de pépinière. Pour l'essentiel, ces plantes présentent des défauts horticoles (manque de vigueur, tige courbée...); quelques plantes exhibant des modifications précoces du phénotype liées à des variations somaclonales (Variegata [figure 5A] et Angustifolia [figure 5B])

sont également écartées mais elles ne représentent que 0,3 % de la totalité de la production. L'effet génotypique est faible ou inexistant au cours de l'étape de grossissement des plants. La principale difficulté pour le changement d'échelle à cette étape concerne le choix du container. Des volumes trop grands imposaient l'utilisation de quantités de substrat horticole et des surfaces de pépinière très importantes, et compliquaient ultérieurement le transport des plants auprès des producteurs, puis la plantation au champ, en particulier dans les zones montagneuses. Le choix d'un petit tube de polypropylène de 200 mL a été fait (figure 4F) étant donné la vocation du laboratoire de diffuser les vitroplants dans un substrat inerte, indemne de nématodes et de maladies du sol, sur l'ensemble de la zone centraméricaine (figure 5D).

Conformité génétique des plantes issues d'embryogenèse somatique

L'obtention d'informations sur les variations somaclonales était l'une des attentes de ce transfert technologique. Nous n'avons jusqu'ici identifié chez *C. arabica* que des variations morphologiques (qualitatives) et avons montré que des plants phénotypiquement normaux poussaient et produisaient normalement. Certains variants phénotypiques ne peuvent être détectés qu'au stade adulte, un ou deux ans après plantation. Les premières observations dans les parcelles commerciales du Nicaragua révèlent une fréquence d'environ 0,8 % (comptage réalisé en champs sur environ 220 000 caféiers plantés en 2008), ce qui est tout à fait acceptable



Figure 5. De la pépinière de vitroplants au champ.

Figure 5. From the vitroplant nursery to the field.

A) variant panaché (« variegata ») ; B) variant « angustifolia » ; C) clone d'hybride F1 d'Arabica en fructification ; D) transport des vitroplants chez les producteurs ; E) plantation d'hybrides F1 d'Arabica dans des systèmes agroforestiers.

commerciallement. Les variations concernent principalement des variants nains (84 % des variations observées). La rareté des variations somaclonales au niveau génétique dans les conditions de production utilisées a récemment été confirmée à l'aide des marqueurs moléculaires de type AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). La comparaison des profils électrophorétiques obtenus avec des plantes régénérées par embryogenèse somatique avec ceux des plantes mères met en évidence un très faible niveau de polymorphisme. Les variations d'origine épigénétique sont également rares comme le montrent les analyses dérivées de la technique AFLP telles que les MSAP (*Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism*) et les S-SAP (*Sequence-Specific Amplification Polymorphism*) permettant de détecter respectivement le polymorphisme associé aux changements de méthylation de l'ADN et à la réactivation d'éléments transposables.

Afin de garantir à l'échelle industrielle la conformité génétique des plantes issues d'embryogenèse somatique, nous avons développé une stratégie de « dilution du risque ». Outre le tri précoce des plants en pépinière au moment de l'expédition des plants, la stratégie en amont repose sur les points suivants : i) diminuer au maximum la présence de régulateurs de croissance (2,4D) dans les suspensions cellulaires et la durée de l'étape de multiplication ; ii) mettre en place une traçabilité totale de la production par lot. Un lot de production représentant l'ensemble des plants issus de la descendance *in vitro* d'une même séquence d'introduction (même date d'introduction, même hybride, même pied mère) ; iii) mettre en place une traçabilité totale de la production par lignée cellulaire (même cal embryogène d'origine) au sein des lots de culture ; iv) mélanger plusieurs lots et plusieurs lignées au moment de l'expédition des plants (au moins 5 lots de culture différents constitués chacun d'au moins 5 lignées cellulaires différentes) ; v) et enfin, limiter le nombre de plants produits par lignée et par lot.

Conclusion

Depuis plus de 30 ans, le Cirad développe des recherches académiques sur l'embryogenèse somatique du caféier.

Cet investissement important de la part d'un institut de recherche public a généré une trentaine de publications scientifiques. Par ailleurs, de nombreuses innovations techniques ont été mises au point sur ce procédé de micropropagation dans le cadre de ces recherches. Pour le partenaire industriel ECOM, certaines d'entre elles ont été suffisamment déterminantes pour le convaincre de se lancer dans l'aventure d'un transfert industriel avec le Cirad afin de propager de nouvelles variétés hybrides d'*Arabica* permettant d'assurer l'approvisionnement en café de qualité.

Le transfert technologique de l'embryogenèse somatique est achevé chez l'espèce *C. arabica* et démontre la faisabilité d'une propagation de masse par embryogenèse somatique. Un changement d'échelle conséquent a été possible pour chaque étape du procédé rendant possible un flux de production continu du laboratoire vers la pépinière et par conséquent une identification précise des forces et faiblesses sur l'itinéraire technique choisi. L'activité commerciale a débuté à partir de 2008 et le cap du million de plantes vendues aux producteurs centraméricains au cours d'une même année a été atteint en 2010. Par ailleurs, les hybrides F1 (*figure 5C*) ont confirmé leur supériorité sur les lignées traditionnelles et génèrent un tel engouement que la demande est maintenant supérieure à la capacité de production (2 millions de plantes pour le seul Nicaragua). L'objectif du partenaire est donc de répondre au plus vite à la demande par un nouveau changement d'échelle important de l'unité de production du Nicaragua (5 à 6 millions de plantes d'ici 4 ans) et aussi par le montage d'autres unités dans la région. En effet, un prototype est à présent disponible pour la partie laboratoire comme pour la partie pépinière qu'il est possible de transposer sur d'autres sites. Une autre unité de production est déjà opérationnelle dans l'État de Veracruz au Mexique pour propager d'autres hybrides (*figures 1E, 1F*) ; par ailleurs plusieurs pépinières industrielles ont été mises en place au Mexique, au Guatemala et au Salvador. ECOM envisage à moyen terme la construction de nouvelles unités de production dans des pays comme le Brésil, l'Indonésie et la Tanzanie où il existe

une forte demande de matériel hybride.

Enfin, la démonstration de la faisabilité d'une propagation à grande échelle par embryogenèse somatique chez *C. arabica* renouvelle le champ des possibles dans le domaine de la sélection génétique chez cette espèce. En effet, la réussite de ce transfert technologique permet dorénavant d'envisager l'introduction sur le marché de nouvelles variétés à partir de matériels hybrides ou mutants. ■

Références

- Albarrañ J, Bertrand B, Lartaud M, Etienne H, 2005. Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica* L.) somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 81 : 27-36.
- Barry-Etienne D, Bertrand B, Vásquez N, Etienne H, 1999. Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. *Plant Cell Reports* 19 : 111-7.
- Barry-Etienne D, Bertrand B, Schlongvoigt A, Etienne H, 2002a. The morphological variability within a population of coffee somatic embryos produced in a bioreactor affects the regeneration and the development of plants in the nursery. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68 : 153-62.
- Barry-Etienne D, Bertrand B, Vásquez N, Etienne H, 2002b. Comparison of somatic embryogenesis-derived coffee (*Coffea arabica* L.) plantlets regenerated *in vitro* or *ex vitro* conditions : morphological, mineral and water characteristics. *Annals of Botany* 90 : 77-85.
- Bertrand B, Etienne H, Cilas C, Charrier A, Baradat P, 2005. *Coffea arabica* hybrid performance for yield, fertility and bean weight. *Euphytica*. 141 : 255-62.
- Bertrand B, Alpizar E, Llora L *et al.*, 2011. Performance of Arabica F1 hybrids in agroforestry and full-sun cropping systems in comparison with pure lines varieties. *Euphytica* 181 : 147-158. doi : 10.1007/s10681-011-r-0372-7
- Bertrand B, Montagnon C, Georget F, Charmetant P, Etienne H. Création et diffusion de variétés de caféiers Arabica : quelles innovations variétales ? *Cahiers Agricultures* 21 : 77-88. doi : 10.1684/agr.2012.0547
- Ducos JP, Gibault E, Lambot C, 2011. *Coffee propagation by somatic embryogenesis at Nestle R&D Center-Tours*. In : Proceedings of the IUFRO working party 2.09.02 "somatic embryogenesis of trees" conference on "advances in somatic embryogenesis of Trees and its application for the future forests and plantations" August 19-21, 2010, Suwon, Republic of Korea.
- Etienne H, Bertrand B, 2001. The effect of the embryogenic cell suspension micropropagation technique on the trueness to type, field performance, bean biochemical content and cup quality of *Coffea arabica* trees. *Tree Physiology* 21 : 1031-8.
- Etienne H, Bertrand B, 2003. Somaclonal variation in *Coffea arabica* : effects of genotype and embryogenic cell suspension age on frequency

and phenotype of variants. *Tree Physiology* 23 : 419-26.

Gupta PK, Hartle JE, 2010. Scale-up somatic embryogenesis of conifers for reforestation. In : Proceedings of the IUFRO working party 2.09.02 "somatic embryogenesis of trees" conference on "advances in somatic embryogenesis of Trees and its application for the future forests and plantations" August 19-21, 2010, Suwon, Republic of Korea.

Karp A, 1994. Origin, causes and uses of variation in plant tissue culture. In : Vasil I, Thorpe T, eds. *Plant Cell and Tissue Culture*. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers.

Khaw CH, Ng SK, Thong KC, 1999. *Commercial production of clonal palms by tissue culture – prerequisites, constraints and issues*. In : Proceedings of the 1999 PORIM International Palm Oil Congress – Agriculture. Emerging Technologies and Opportunities in the Next Millenium. Palm Oil Research Institute of Malaysia (PORIM), Kuala Lumpur, Malaysia.

Menéndez-Yuffá A, Barry-Etienne D, Bertrand B, Georget F, Etienne H, 2010. A comparative analysis of the development and quality of nursery plants derived from somatic embryogenesis and from seedlings for large-scale propagation of coffee

(*Coffea arabica* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 102 : 297-307.

Sampote S, Ducos JP, Lambot C, Kunasol T, Kasinkasaempong Y, Chantanumat P, *et al.*, 2006. *First industrial massive propagation of Coffea canephora through somatic embryogenesis organized in Thailand*. In : Proceedings of the 21st International Conference on Coffee Science, Montpellier, France.

Teisson C, Alvard D, 1995. A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium : temporary immersion. In : Terzi M, *et al.*, eds. *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*. Dordrecht : Kluwer Academic Publishers.