

Identification de caféiers mâle-stériles de *Coffea arabica* au Catie, Costa Rica

Dufour M.¹, Anthony F.², Bertrand B.³, Eskes A.B.¹

¹ CIRAD-CP, B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

² ORSTOM/CATIE/IICA-PROMECAFE, CATIE Ap. 59, 7170 Turrialba, Costa Rica

³ CIRAD-CP/IICA-PROMECAFE, IICA Ap. 55, 2200 Coronado, San José, Costa Rica

Résumé

Cinq plantes de *C. arabica*, qui ne produisent pas du pollen, ont été découvertes dans la collection du Catie. Des études cytologiques, menées sur les anthères de ces arbres, ainsi que des autofécondations, ont confirmé la condition de stérilité mâle de ces arbres. Des pollinisations avec du pollen d'une lignée Catimor (T8667) ont montré que ces arbres sont fertiles en croisement. Trois de ces cinq individus, multipliés par greffage, ont confirmé leur stérilité mâle dans une autre condition édapho-climatique. La stérilité mâle observée est de nature sporogène, causée par une dégénérescence précoce du tapis des anthères et caractérisée par l'absence totale de microspores au moment de l'anthèse. Le déterminisme génétique de ce phénomène serait d'origine nucléaire et récessif. L'utilisation possible de ces plantes dans un schéma de sélection d'hybrides F1 est discutée.

Abstract

Five *C. arabica* plants, which did not produce pollen, were discovered in CATIE's field collection. Cytological studies, carried out on anthers from the trees confirmed their male-sterile condition, as did selfing. Pollinations carried out with pollen from a Catimor line (T8667) showed that the plants were cross-fertile. Three of the five plants were propagated by budding and showed male sterility under different soil and climatic conditions. The male sterility observed was sporogenous, due to early destruction of the tapetum, and characterized by a total lack of microspores at the flowering stage. The genetic determinism of this phenomenon appears to be nuclear and recessive. The possible use of these plants in a selection scheme aiming at F1 hybrid production is discussed.

Resumen

En la colección del CATIE, se descubrieron cinco árboles de *C. arabica* que no producen polen. Estudios citológicos realizados sobre las anteras de estos árboles, así como autofecundaciones, confirmaron la calidad de esterilidad masculina de estos árboles. Cruzamientos con polen de una línea Catimor (T8667) mostraron que estos árboles son fértiles al cruzarlos. Se multiplicaron tres de estos cinco individuos mediante injerto, que se estudiaron en otra condición de suelo y clima, lo que confirmó su esterilidad masculina. La esterilidad masculina observada es de naturaleza esporogénica, provocada por una degeneración precoz del tapete de las anteras y caracterizada por la ausencia total de microsporas en el tiempo de la antesis. El determinismo genético de este fenómeno sería de origen nuclear y recesivo. El artículo contiene una discusión sobre la posible utilización de estas plantas en un esquema de selección de híbridos F1.

L'incapacité du gaméophyte mâle à produire du pollen viable est connue sous le nom de stérilité mâle. Chez les plantes supérieures, cette situation peut, dans certains cas, être provoquée par une mauvaise nutrition, ou par des accidents pathologiques dus à des virus ou à des champignons. Le plus souvent, la stérilité mâle est d'origine génétique et peut être rencontrée spontanément, ou induite, par mutagenèse ou croisement. Le déterminisme de ce processus est double : soit d'origine nucléaire (stérilité génétique transmise sur le mode mendélien : MST), soit d'origine nucléo-cytoplasmique (CMS) et, dans ce cas, il y a interaction entre les génomes nucléaires et cytoplasmiques (Kaul, 1988).

De ces mécanismes résultent trois phénotypes :

- stérilité mâle constitutionnelle se manifestant par un avortement du gaméophyte pour laquelle la microsporogénèse est absente ou incomplète : il n'y a pas d'anthères ;
- stérilité mâle sporogène caractérisée par l'occurrence de mutations avant, pendant ou après la méiose : il n'y a pas ou peu de pollen ;
- stérilité mâle fonctionnelle produisant des grains de pollen viables mais incapables de féconder.

Le second phénotype est le plus répandu (Kaul, 1988). L'intérêt de la stérilité mâle réside dans son utilisation pour la production de variétés hybrides. Dans un champ semencier, si l'un des géniteurs est mâle-

stérile, il produira uniquement des semences hybrides, en absence d'autofécondation.

Dans le genre *Coffea*, Conagin (1961) rapporte pour la première fois un cas de stérilité mâle fonctionnelle sur un arbre de *C. congensis* conservé dans la collection de l'IAC (Instituto Agronómico de Campinas). Plus tard, d'autres plantes mâle-stériles ont été signalées en Inde (Vishveshwara, 1967 ; Ram et Ramachandran, 1981) chez *C. kapakata*, *C. liberica* et dans des populations hybrides entre *C. arabica* et *C. liberica*. Plus récemment, un clone de *C. canephora* cv. kouillou a été identifié comme étant mâle-stérile (Lanaud, comm. pers.). Chez le même cultivar, deux plantes présentant du pollen non-viable et en très faible quantité ont été décrites à l'IAC (Mazzafera *et al.*, 1990). Les mêmes auteurs ont identifié six plantes de *C. arabica* entièrement mâle-stériles parmi trois introductions de l'IAC (Blumor, Kaffa et hybride Bourbon x Kaffa). Dans ces cas, la stérilité mâle s'est révélée être de type génique et récessif.

Nous décrivons ici cinq plantes mâle-stériles de *C. arabica* découvertes dans la collection du Catie. Les anthères de ces arbres ont fait l'objet d'une étude cytologique approfondie. La stérilité mâle fut confirmée par les résultats d'autopollinisations contrôlées en champ. Ces résultats sont discutés en vue de leur utilisation dans le programme de sélection conduit en Amérique centrale par Promecafe avec la participation du Catie et de la Coopération française (Cirad, Orstom).

Matériel et méthodes

Analyse macroscopique

L'analyse macroscopique a concerné plus de 7 000 caféiers Arabica de la collection du Catie et 5 000 Catimor et Sarchimor en essai sur la station expérimentale de l'Icafe. Elle a consisté à frotter les anthères d'un bouton floral sur une surface noircie à l'encre, environ un jour après l'anthèse. Dix boutons par arbre ont ainsi été observés en avril 1993. En présence de fleurs fertiles, le pollen jaune était facilement discernable sur le fond noir. Lorsque la présence de pollen n'a pas été détectée, dix autres boutons du même arbre, encore fermés, ont été rapportés au laboratoire d'histologie du Catie pour une étude microscopique.

Analyse microscopique

Les anthères de chaque bouton provenant d'arbres suspectés de stérilité ont été écrasées et montées entre lame et lamelle dans une goutte de carmin acétique. Une rapide observation à l'objectif x10 a permis de confirmer l'absence ou la présence de pollen. Ces observations ont été répétées au cours de plusieurs floraisons, en avril 1993, mars 1994 et mars 1996.

Analyse cytologique

Afin de déterminer l'origine de l'absence de pollen chez les plantes mâle-stériles identifiées, des boutons floraux ont été prélevés chaque jour, entre 7 h et 8 h du matin, entre le septième jour après l'induction florale par la pluie et le premier jour avant l'anthèse. Les boutons d'un arbre fertile (T4602 A1) ont été traités de la même manière pour servir de témoin.

Les anthères de ces boutons ont été fixées sous vide pendant 48 heures, dans une solution de glutaraldéhyde (1 % dans 0,2 M de tampon phosphate à pH 7,0). Les échantillons ont été conservés dans de l'éthanol à 70 % puis déshydratés par des bains successifs dans une série ascendante d'éthanol, de 70 à 100 %. Après imprégnation et inclusion dans de la résine (Technovit® 7100-Kulzer), les anthères ont été sectionnées à l'ultramicrotome (Histo-range, LKB) équipé d'un couteau en acier. Les coupes avaient une épaisseur de 3 µm.

Une double coloration à l'acide périodique-Schiff (Feder et O'Brien, 1968) et au naphтол blue black (Fisher, 1968) a été appliquée sur les lames afin de mettre en évidence les polysaccharides, les protéines solubles et insolubles, et les noyaux.

Pollinisations contrôlées

Des autofécondations contrôlées ont été tentées sur les individus suspectés de stérilité mâle, en janvier et février 1995. Des croisements avec du pollen d'une lignée Catimor (T8667) ont également été entrepris sur ces arbres. Le nombre de fleurs pollinisées a été compté, ainsi que le nombre de fruits récoltés et le nombre de graines obtenues.

Influence du milieu sur la stérilité mâle

Trois individus identifiés mâle-stériles dans la collection du Catie ont été multipliés par greffage, sur porte-greffes *C. canephora*, puis plantés sur la station expérimentale de l'Icafe. Ce second site d'observation (1 100 m d'altitude) bénéficie de conditions édapho-climatiques représentatives de la zone caféière du Costa Rica alors que le Catie est situé dans une zone plus marginale, à 600 m d'altitude. Des observations microscopiques du pollen ont été effectuées pendant deux années consécutives, en 1996 et 1997.

Résultats

Observations macro et microscopique

L'observation macroscopique a permis d'identifier seulement cinq arbres qui ne produisaient pas de pollen (encadré). L'étude microscopique a montré que leurs anthères étaient vides. Ces cinq arbres proviennent de la prospection FAO en Ethiopie, en 1964-1965 (Meyer *et al.*, 1968), et furent introduits au Catie en 1965 (Morera *et al.*, 1993). Aucun arbre mâle-stérile n'a été détecté parmi les lignées

■ Introductions du Catie ne présentant pas de pollen à l'anthèse. Génotype (origine FAO).

T4601 A3 (E-343)
T4621 A1 (E-123-B)
T4759 A3 (E-238)
T4759 A6 (E-328)
T4905 A1 (E-536)

Catimor et Sarchimor, dans les essais de l'Icafe.

Analyse cytologique

La microsporogénèse du caféier est caractérisée par un temps de latence entre la formation des cellules-mères des microspores et la méiose. Celle-ci est déclenchée par une forte pluie consécutive à une période de sécheresse.

Dans le cas des cinq plantes supposées mâle-stériles étudiées, les premières étapes du développement des anthères sont similaires à celles du témoin. La méiose a lieu le septième jour avant l'anthèse, sauf pour l'individu T4621 A1 où elle se produit le sixième jour. Des tétrades normales sont obtenues pour tous les génotypes (photo 1) sauf pour le T4621 A1. Pour ce dernier, les cellules-mères subissent bien deux divisions, mais les cellules composant les tétrades présentent un contenu imparfait ; les protéines semblent coagulées et le noyau n'est pas visible, contrairement aux autres cas.

Après la méiose, on assiste à la formation de microspores uninuclées. On note toutefois une accumulation de polysaccharides inférieure au témoin. Les microspores dégénèrent très rapidement : leur contenu se plasmolyse (photo 2) et leur paroi s'épaissit. Deux jours avant l'anthèse, les loges pol-

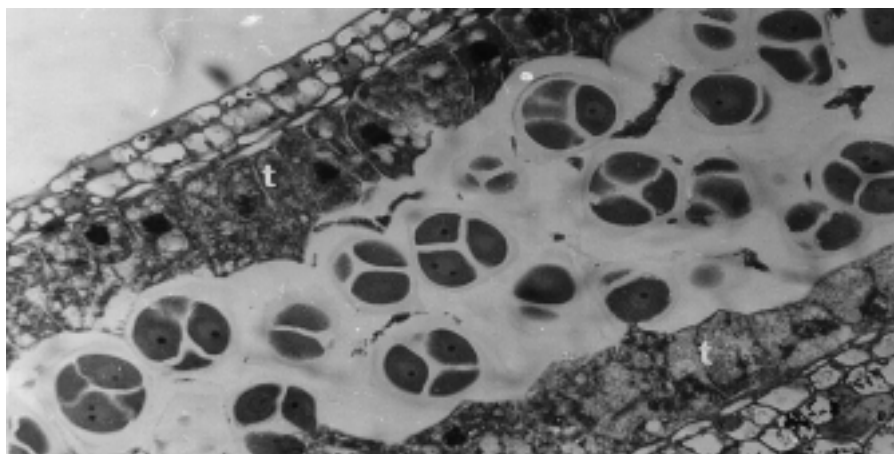


Photo 1. Tétrades normales (t = tapis). / Normal tetrads (t = tapetum).

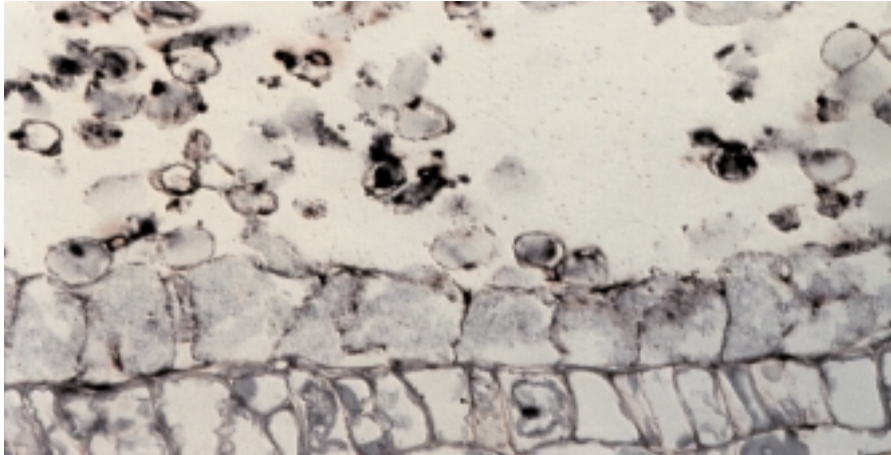


Photo 2. Dégénérescence des microspores. / *Microspore degeneration.*

M. Dufour

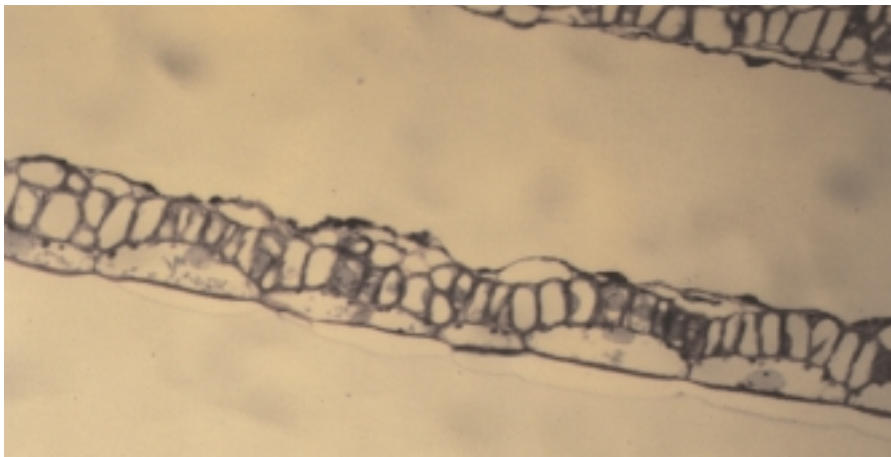


Photo 3. Loges polliniques vides au moment de l'anthèse. / *Empty pollen sacs at time of anthesis.*

M. Dufour

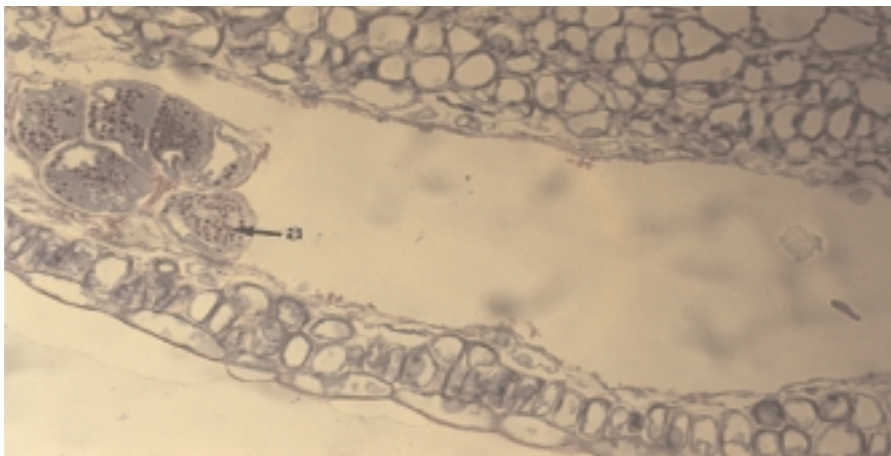


Photo 4. Cellules dégénérées à forte teneur en amidon (a = amidon). / *Degenerated cells with a high starch content (a = starch).*

M. Dufour

liniques sont vides (photo 3) ou présentent quelques amas de cellules dégénérées, à forte teneur en amidon (photo 4).

Parallèlement à cette évolution, on note pour tous les génotypes une dégénérescence du tapis. Les cellules qui le constituent semblent normales et possèdent des réserves protéiques et amyloacées similaires

à celles du témoin. Pourtant, dès le stade tétrade, les cellules tapétales se vacuolisent. Dans le cas du témoin, ceci n'est observé qu'au stade « microspore uninucléée ». Ce décalage se poursuit, et le flétrissement du tapis semble plus rapide dans les anthères stériles. Au moment de

l'anthèse, le tapis n'est plus discernable (photo 3).

Pollinisations contrôlées et observations sur les descendance

Les pollinisations contrôlées, effectuées en 1995, n'ont concerné que quatre des cinq arbres suspectés de stérilité mâle car l'un d'entre eux (T4759 A3) est mort en 1994.

La réussite des croisements avec le pollen Catimor est variable, entre 52 et 119 graines pour 100 fleurs pollinisées (tableau). Un nombre suffisant de graines par géniteur femelle a été obtenu pour pouvoir réaliser une première évaluation agronomique sur la descendance.

Les autofécondations ont été tentées en pollinisant entre 174 et 239 fleurs selon les génotypes (tableau). Deux individus (T4621 A1 et T4905 A1) n'ont fourni aucune graine. Deux autres individus (T4601 A3 et T4759 A6) ont produit respectivement six et une graines. Ce faible taux de grainage pourrait être lié à une contamination par des insectes.

Expression de la stérilité mâle dans différents milieux

Les observations macro et microscopiques entreprises sur les trois génotypes multipliés par greffage et plantés sur la station de l'Icafe (T4601 A3, T4621 A1, T4759 A3) ont donné les mêmes résultats que celles effectuées sur les arbres de la collection du Catie : les anthères sont vides, sans pollen.

Discussion et conclusion

Faisant suite aux observations macroscopiques, les observations microscopiques ont permis de confirmer que cinq caféiers de la collection du Catie sont mâle-stériles. L'analyse cytologique montre qu'il s'agit d'une stérilité mâle sporogène, caractérisée par l'absence de microspores. Dans tous les cas, une dégénérescence précoce du tapis a été observée, ce qui semble être un phénomène répandu chez les plantes mâle-stériles (Heslop-Harrison, 1972). Le même phénomène avait déjà été observé chez *C. arabica* (Mazzaferri *et al.*, 1990) et *C. congensis* (Ram *et al.*, 1986). En revanche, chez d'autres espèces, le déterminisme semble différent : chez *C. liberica*, c'est paradoxalement une hypertrophie du tapis qui est responsable de la dégénérescence des microspores et, en ce qui concerne certains *C. liberica* et *C. kapakata*, la formation d'un syncytium tapétal empêche le déroulement normal de la microsporogénèse (Ram *et al.*, 1986). Pour

Tableau. Résultat des autofécondations des mâle-stériles et de leur pollinisation contrôlée avec du pollen de T8667. / Data on self-pollinations of the male-sterile plants and on cross-pollination with T8667 pollen.

Génotype	Nombre de fleurs pollinisées Number of pollinated flowers		Nombre de fruits récoltés Number of fruits harvested		% de mise à fruit % fruit-set		Nombre de graines obtenues Number of seeds obtained		Nombre de graines pour 100 fleurs Number of seeds for 100 flowers	
	T8667	Autof. Self	T8667	Autof. Self	T8667	Autof. Self	T8667	Autof. Self	T8667	Autof. Self
T4601 A3	186	205	86	7*	46	3	118	6	63	3
T4621 A1	233	249	80	0	34	0	109	0	47	0
T4759 A6	239	180	164	1	69	0,6	285	1	119	0,6
T4905 A1	174	371	56	0	32	0	90	0	52	0

* dont trois fruits vides (sans graine). / * including three empty fruits (no seeds).

C. canephora, une très faible quantité de pollen viable a été notée (Mazzafera *et al.*, 1990). Vedel *et al.* (1994) rapportent que de nombreuses mutations conduisant à la stérilité mâle interfèrent avec la différenciation de la fonction des cellules tapétales.

La répétition des observations dans un autre milieu a montré que la stérilité mâle mise en évidence est stable. Il est actuellement trop tôt pour conclure sur la nature nucléo-cytoplasmique (CMS) ou génique (MST) des cas observés dans cette étude. Bien que la base moléculaire exacte de ces défauts soit actuellement inconnue, des études antérieures ont montré que la CMS est produite par des réarrangements de l'ADN mitochondrial, produisant des gènes chimériques qui interfèrent avec le développement normal du pollen (Vedel *et al.*, 1994). En revanche, chez le tabac, la MST peut être provoquée par l'expression exclusive, dans le tapis des anthères, de différents gènes codant pour une RNase (Mariani *et al.*, 1990) ou une glucanase (Worrall *et al.*, 1992).

Chez le caféier, Mazzafera *et al.* (1990) ont supposé être en présence d'une stérilité mâle génique de type récessif. Cette hypothèse semble être corroborée par les observations que nous avons faites sur les descendances de deux individus mâle-stériles (T4759 A3, T4905 A1), obtenues par fécondation libre dans la collection du Catie : aucune plante n'a été identifiée mâle-stérile parmi les 175 individus observés. Ce déterminisme devrait être vérifié à partir de l'étude des hybrides F1, obtenus par croisement entre individus mâle-stériles et le Catimor T8667, et de leurs populations ségrégeantes qui ont été créées en 1997.

La stérilité mâle semble plus fréquente chez les caféiers éthiopiens que chez les variétés qui dérivent du Typica et du Bourbon (Catuai, Mundo Novo, Caturra) ou que chez les lignées introgressées par l'Hybride de Timor (Catimor, Sarchimor). En effet, les

cinq génotypes mâle-stériles repérés dans la collection du Catie proviennent de la collecte FAO en Ethiopie (Meyer *et al.*, 1968) et aucune plante mâle-stérile n'a été identifiée parmi les 5 000 Catimor et Sarchimor en essai à l'Icafe. De leur côté, Mazzafera *et al.* (1990) ont trouvé trois de leurs six individus mâle-stériles parmi le matériel de la collecte FAO. Un autre individu mâle-stérile provient d'une descendance F2 ou F3 entre une variété éthiopienne (Kaffa S-12) et le Bourbon. Enfin, les deux autres mâle-stériles ont été rencontrés chez l'hybride Blumor (Blue Mountain x Hybride de Timor).

La stérilité mâle est utilisée chez de nombreuses plantes pour la production de semences hybrides (Thind et Malik, 1996). Dans notre étude, la fertilité femelle de ces plantes mâle-stériles a été démontrée par la réussite de croisements avec du pollen de Catimor. Pour le caféier Arabica, la stérilité mâle permettra de produire des semences d'hybrides F1 à coût réduit. De tels hybrides sont en cours de sélection en Amérique centrale, dans le cadre du programme d'amélioration génétique dirigé par Promecafe, avec l'objectif d'élargir la base génétique des variétés cultivées en collaboration avec le Catie, le Cirad et l'Orstom (Anon., 1994). L'observation des

hybrides, obtenus par croisement des individus mâle-stériles avec des variétés cultivées, renseignera sur l'intérêt de ces caféiers mâle-stériles en vue de leur utilisation comme géniteurs. A court terme, les études en cours au niveau moléculaire permettraient de développer une méthode de sélection assistée par marqueurs moléculaires. Ceux-ci seront utilisés pour contrôler le transfert du gène de stérilité mâle aux géniteurs du programme de création variétale. ■

Remerciements

Les auteurs remercient Nicole Michaux-Ferrière (Cirad/Biotrop) pour son accueil et ses conseils lors de l'étude cytologique, ainsi que Nelly Vásquez (Catie) pour son aide lors de l'observation de la viabilité du pollen. Ce travail a été réalisé en partie grâce au soutien financier du Cirad et de l'Orstom.

■ Sigles

Catie : Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza (Turrialba, Costa Rica).
 Cirad/Biotrop : Unité de biotechnologies appliquées à l'amélioration des plantes tropicales du Cirad.
 Cirad : Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement.
 FAO : Food and Agriculture Organisation.
 IAC : Instituto Agronómico de Campinas (Brésil).
 Icafe : Instituto del café de Costa Rica.
 IICA : Instituto interamericano de cooperación para la agricultura (Costa Rica).
 Orstom : Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération.
 Promecafe : Programa cooperativo regional para el desarrollo tecnológico y modernización de la caficultura (Guatemala).

Bibliographie / References

- ANON., 1994. Proyecto regional de mejoramiento genético de *Coffea arabica* del PROMECAFE con la participación del CATIE y de la Cooperación Francesa (CIRAD, ORSTOM). Guatemala, IICA-PROMECAFE, 27 p.
- CONAGIN M.W., 1961. Microsporogenese, incompatibilidad e esterilidad masculina en *Coffea congensis* Froehner. *Bragantia* 20 : 669-677.
- FEDER N., O'BRIEN T., 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. *Am. J. Bot.* 55 : 123-142.
- FISHER D.B., 1968. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie* 16 : 92-96.
- HESLOP-HARRISON J., 1972. Sexuality of angiosperms. *In*: Plant physiology, a treatise. VI, C. F.C. Steward éd., New York, Etats-Unis, Academic Press, p. 133-271.
- KAUL M.L.H., 1988. Male sterility in higher plants. *In* : Monographs on theoretical and applied genetics, 10, R. Frankel, M. Grossman, H.F. Linskens, P. Maliga et R. Riley éd., Heidelberg, Allemagne, Springer-Verlag, 1005 p.
- MARIANI C., De BEUCKELEER M., TRUETTNER J., Leemans J., Goldberg R.B., 1990. Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature* 347 : 737-741.
- MAZZAFERA P., ESKEA A.B., PARVAIS J.P., CARVALHO A., 1990. Stérilité mâle détectée chez *Coffea arabica* et *C. canephora* au Brésil. *In* : XIIIe colloque scientifique international sur le café, Paipa, Colombie, 21-25 août 1989. Paris, France, ASIC, p. 466-473.
- MEYER F.G., FERNIE L.M., NARASIMHASWAMY R.L., Monaco L.C., 1968. FAO coffee mission to Ethiopia 1964-1965. Rome, Italie, FAO, 200 p.
- MORERA J., UMAÑA C., MORA E., HIDALGO G., 1993. Banco de germoplasma de café del CATIE. Turrialba, Costa Rica, CATIE, Unidad de recursos fitogenéticos, 111 p.
- RAM A.S., RAMACHANDRAN M., 1981. Male sterility in *Coffea liberica*. *J. Coffee Res.* 11 : 142-145.
- RAM A.S., PADMA JYOTHI D., SREENIVASAN M.S., 1986. Mechanisms of male sterility in some species of *Coffea*. *J. Plant. Crops* 16 (suppl.) : 357-364.
- THIND S.R., MALIK C.P., 1996. Male sterility and its utilisation in hybrid seed production. *In* : Advances in pollen-spore research, 21 : Pollen-spore emerging strategies. C.P. Malik éd, New Delhi, Inde, Today and Tomorrow, p. 29-65.
- VEDEL F., PLA M., VITART V., GUTIERRES S., CHÉTRIT P., De PAEPE R., 1994. Molecular basis of nuclear and cytoplasmic male sterility in higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* 32 (5) : 601-618.
- VISHVESHVARA S., 1967. Male sterility in coffee. *Ind. Coffee* 31 (9) : 6-8.
- WORALL D., HIRD D.L., PAUL W., DRAPER J., SCOTT R., 1992. Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco. *Plant Cell* 4 : 759-771.

Identification of male-sterile *Coffea arabica* trees at CATIE, Costa Rica

Dufour M.¹, Anthony F.², Bertrand B.³, Eskes A.B.¹

¹ CIRAD-CP, B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

² ORSTOM/CATIE/IICA-PROMECAFE, CATIE Ap. 59, 7170 Turrialba, Costa Rica

³ CIRAD-CP/IICA-PROMECAFE, IICA Ap. 55, 2200 Coronado, San José, Costa Rica

The inability of the male gametophyte to produce viable pollen is known as male sterility. In higher plants, this situation can sometimes be caused by poor nutrition, or by pathological incidents due to viruses or fungi. Male sterility is usually genetic and may occur spontaneously or be induced, by mutagenesis or crossing. The determinism of the process is twofold: either of nuclear origin (Mendelian transmitted genetic sterility: MST), or of nucleo-cytoplasmic origin (CMS), in which case there is an interaction between nuclear and cytoplasmic genomes (Kaul, 1988).

Three phenotypes result from these mechanisms:

- constitutional male sterility, involving abortion of the gametophyte, for which microsporogenesis is absent or incomplete: there are no anthers;
- sporogenous male sterility characterized by the occurrence of mutations before, during, or after meiosis: there is little or no pollen;
- functional male sterility producing pollen grains that are viable but unable to fertilize.

The second phenotype is the most common (Kaul, 1988). Male sterility is valuable through its use in producing hybrid varieties. In a seed garden, if one of the parents is male-sterile, it will produce hybrid seeds only, with no selfing.

In the *Coffea* genus, Conagin (1961) reported a case of functional sterility for the first time on a *C. congensis* tree in the collection at IAC (*Instituto Agronômico de Campinas*). Other male-sterile plants were later reported in India (Vishveshwara, 1967; Ram and Ramachandran, 1981) in *C. kapakata*, *C. liberica* and in hybrid populations between *C. arabica* and *C. liberica*. More recently, a clone of *C. canephora* cv. kouillou was identified as being male-sterile (Lanaud, pers. comm.). In the same cultivar, two plants with non-viable pollen in very small quantities have been described at IAC (Mazzafera *et al.*, 1990). The same authors identified six entirely male-sterile *C. arabica* plants within accessions at IAC (Blumor, Kaffa, and Bourbon x Kaffa hybrid). In these cases, male sterility proved to be of the genic and recessive type.

We describe five male-sterile *C. arabica* plants discovered in the CATIE collection. An in-depth cytological study of the anthers from these trees was carried out. Male sterility was confirmed by the results of controlled selfing in the field. These results are discussed with a view to using them in the breeding programme being implemented in Central America by PROMECAFE, with the participation of CATIE and French Cooperation (CIRAD, ORSTOM).

Material and methods

Macroscopic analysis

The macroscopic analysis covered more than 7 000 Arabica coffee trees in the CATIE collection and 5 000 Catimor and Sarchimor trees in a trial at the ICAFE experimental station. It consisted in rubbing the anthers of a floral bud on a black inked surface, around a day after anthesis. Ten buds per tree were observed in this way in April 1993. In the presence of fertile flowers, yellow pollen could be clearly seen on the black background. When pollen was not detected, ten other buds yet to open were taken from the same trees to the CATIE histological laboratory for a microscopic study.

Microscopic analysis

The anthers of each flower bud from trees suspected of being male sterile were crushed, mounted between a slide and a cover in a drop of acetic carmine. A rapid examination with a x10 lens confirmed whether or not there was any pollen. These observations were repeated during several flowering periods in April 1993, March 1994 and March 1996.

Cytological analysis

In order to determine the reason for the lack of pollen in plants identified as being male-sterile, floral bud samples were taken every day between 7:00 am and 8:00 am, from the 7th day after floral induction by rainfall to the first day before anthesis. The buds of a fertile tree (T4602 A1) were treated in the same way and used as the control.

The anthers of the buds were fixed in a vacuum for 48 hours, in a glutaraldehyde solution

(1% in 0.2 M of phosphate buffer at pH 7.0). The samples were stored in 70% ethanol then dehydrated in successive baths with increasing concentrations of ethanol from 70 to 100%. After impregnation and embedding in resin (Technovit® 7100-Kulzer), the anthers were sectioned into 3 µm sections using an ultramicrotome (Historange, LKB) with a steel blade.

Double staining with Schiff periodic acid (Feder and O'Brien, 1968) and with naphthol blue black (Fisher, 1968) was carried out on slides to reveal polysaccharides, soluble and insoluble proteins, and the nuclei.

Controlled pollination

Controlled selfing was tested on individuals suspected of male sterility in January and February 1995. Cross-pollinations with pollen from a Catimor line (T8667) were also carried out on these trees. The number of pollinated flowers was counted, along with the number of fruits harvested and the number of beans obtained.

Effects of the environment on male sterility

Three individuals identified in the CATIE collection as being male-sterile were propagated by budding onto *C. canephora* rootstocks, then planted at the ICAFE experimental station. The latter observation site (1 100 m above sea level) benefits from soil and climatic conditions that are representative of the Costa Rican coffee growing zone, whilst CATIE is located in a more marginal zone 600 m above sea level. Pollen was examined under the microscope for two years running, in 1996 and 1997.

Results

Macroscopic and microscopic observations

Only five trees were found by macroscopic observation to produce no pollen (box). Examination under the microscope revealed that their anthers were empty. The five trees came from the FAO survey in Ethiopia in 1964-1965 (Meyer *et al.*, 1968), and were introduced at CATIE in 1965 (Morera *et al.*, 1993). No male-sterile trees were found in the Catimor and Sarchimor lines in the ICAFE trials.

■ Accessions from CATIE showing no pollen at anthesis. Genotype (FAO origin).

T4601 A3 (E-343)
T4621 A1 (E-123-B)
T4759 A3 (E-238)
T4759 A6 (E-328)
T4905 A1 (E-536)

Cytological analysis

Coffee tree microsporogenesis is characterized by a time lag between the formation of microspore mother-cells and meiosis, which is triggered by heavy rainfall after a dry period.

For the five suspected male-sterile plants studied, the first stages of anther development were similar to those of the control. Meiosis occurred on the seventh day before anthesis, except for individual T4621 A1, where it occurred on the sixth day. Normal tetrads were obtained for all the genotypes (photo 1) except T4621 A1, for which the mother-cells underwent two divisions, but the cells making up the tetrads had an imperfect content; the proteins seemed coagulated and the nucleus was not visible, unlike in the other cases.

After meiosis, single-cell microspores formed, though there was a less substantial accumulation of polysaccharides than in the control. The microspores degenerated very quickly: their content plasmolysed (photo 2) and their cell walls thickened. Two days before anthesis, the pollen sacs were empty (photo 3) or contained a few clusters of degenerated cells with a high starch content (photo 4).

At the same time, in all the genotypes, there was degeneration of the tapetum. The cells making it up seemed normal and had similar protein and starch reserves to those of the control, but right from the tetrad stage, the tapetum cells underwent vacuolation. In the control, this did not occur until the "single-cell microspore" stage. This staggering of events continued and the tapetum seemed to wither more quickly in sterile anthers. The tapetum was no longer visible at anthesis (photo 3).

Controlled pollination and progeny observations

Controlled pollinations in 1995 were only carried out on four of the five trees suspected of male sterility, as one of them (T4759 A3) died in 1994.

Crossing success with Catimor pollen varied, from 52 to 119 seeds for 100 pollinated flowers (table). A sufficient number of seeds was obtained per female parent to be able to proceed with an initial agronomic assessment on the progeny.

Selfing was attempted by pollinating between 174 and 239 flowers depending on the genotype (table). Two individuals (T4621 A1 and T4905 A1) did not produce any seed. Two others (T4601 A3 and T4759 A6) produced six seeds and one seed respectively. This low seed production rate might be linked to contamination by insects.

Expression of male sterility in different environments

The macro and microscopic observations undertaken on the three genotypes propagated by bud-

ding and planted at the ICAFE station (T4601 A3, T4621 A1, T4759 A3) gave the same results as those carried out on trees in the CATIE collection: empty anthers, no pollen.

Discussion and conclusion

After macroscopic observation, examination under the microscope confirmed that five coffee trees in the CATIE collection were male-sterile. A cytological analysis revealed sporogenous male sterility, with the typical absence of microspores. In all cases, there was early degeneration of the tapetum, which seems to be common in male-sterile plants (Heslop-Harrison, 1972). The same phenomenon had already been seen in *C. arabica* (Mazzafera *et al.*, 1990) and *C. congensis* (Ram *et al.*, 1986), but in other species the determinism seems to be different: paradoxically, in *C. liberica*, it is tapetum hypertrophy that is responsible for microspore degeneration, and in some *C. liberica* and *C. kapakata*, the formation of a tapetum syncytium prevents normal microsporogenesis (Ram *et al.*, 1986). A very small quantity of viable pollen was noted for *C. canephora* (Mazzafera *et al.*, 1990). Vedel *et al.* (1994) reported that numerous mutations leading to male sterility interfere with differentiation of the tapetum cell function.

The observations were replicated in another environment and showed that the male sterility found was stable. It is currently too early to tell whether the cases observed in this study were nucleocytoplasmic (CMS) or genic (MST). Although the precise molecular basis of these defects is still unknown, earlier studies showed that CMS is produced by rearrangement of mitochondrial DNA, producing chimeric genes that interfere with normal pollen development (Vedel *et al.*, 1994). On the other hand, in tobacco MST can be caused by exclusive expression in the anther tapetum of different genes coding for an RNase (Mariani *et al.*, 1990) or a glucanase (Worrall *et al.*, 1992).

In coffee, Mazzafera *et al.* (1990) presumed they had found recessive type genic male sterility, which seemed to be corroborated by the observations we carried out on the progenies of two male-sterile individuals (T4759 A3, T4905 A1) obtained by open pollination in the CATIE collection: none of the 175 individuals observed was found to be male-sterile. This determinism needs to be checked by studying F1 hybrids produced by male-sterile individuals and Catimor T8667, and their segregating populations created in 1997.

Male sterility seems to be more common in Ethiopian coffee trees than in varieties derived from the Typica and the Bourbon (Catuai, Mundo Novo, Caturra) or in lines introgressed by the Timor Hybrid (Catimor, Sarchimor). In fact, the five male-sterile genotypes identified in the

CATIE collection came from the FAO survey in Ethiopia (Meyer *et al.*, 1968) and no male-sterile plants were found among the 5 000 Catimor and Sarchimor trees in trials at ICAFE. For their part, Mazzafera *et al.* (1990) found three of their six male-sterile individuals in material from the FAO survey. Another male-sterile individual came from an F2 or F3 progeny between an Ethiopian variety (Kaffa S-12) and the Bourbon. Finally, two other male-sterile trees were found in the Blumor Hybrid (Blue Mountain x Timor Hybrid).

Male sterility is used in many plants for hybrid seed production (Thind and Malik, 1996). In our study, the female fertility of the male-sterile

plants was demonstrated by successful crossing with Catimor pollen. For Arabica coffee trees, male sterility will enable cheaper production of F1 hybrid seeds. Such hybrids are currently being bred in Central America in a genetic improvement programme managed by PROMECAFE, designed to broaden the genetic base of cultivated varieties in collaboration with CATIE, CIRAD and ORSTOM (Anon., 1994). Observation of hybrids obtained by crossing male-sterile individuals with cultivated varieties will show whether male-sterile coffee trees are worth using as parents. In the short term, molecular studies currently under way should make it possible to develop a method of selection assisted by mole-

cular markers. The markers would be used to control the transfer of the male sterility gene to parents in the variety creation programme. ■

Acknowledgements

The authors would like to thank Nicole Michaux-Ferrière (CIRAD/BIOTROP) for her hospitality and advice during the cytological study, along with Nelly Vásquez (CATIE) for her assistance during pollen viability observations. The work was undertaken partly with financial support from CIRAD and ORSTOM.