

# Quelles applications pour la micro-propagation du cocotier (*Cocos nucifera* L.) ?

Verdeil J.L.<sup>1</sup>, Baudouin L.<sup>2</sup>, Hocher V.<sup>1</sup>, Bourdeix R.<sup>3</sup>, N'Cho Y.P.<sup>3</sup>, Sangaré A.<sup>3</sup>, Rillo E.<sup>4</sup>, Oropeza C.<sup>5</sup>, Hamon S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ORSTOM-CIRAD-CP, Laboratoire Genetrop, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1, France

<sup>2</sup> CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

<sup>3</sup> CNRA, Station Marc Delorme, Port Bouët, 07 BP 13, Abidjan 07, Côte d'Ivoire  
<sup>4</sup> PCA, Albay Research Center, Banao, 4503 Guinobatan, Albay, Philippines

Les travaux sur la culture *in vitro* du cocotier ont débuté il y a une quinzaine d'années, soit dix ans environ après le démarrage de la culture *in vitro* du palmier à huile. Vers 1983, la multiplication végétative du palmier à huile apparaissait comme une technique maîtrisée et des unités de production à grande échelle ont été installées dans plusieurs pays, notamment par le Cirad et l'Orstom. C'est dans ce climat relativement euphorique, que les recherches sur la multiplication du cocotier ont été lancées. Pour des raisons historiques facilement compréhensibles, les perspectives d'application du clonage du cocotier ont été orientées d'emblée vers la multiplication végétative d'individus d'élite qui suppose la production en masse, à un coût modéré, de vitroplants conformes. S'il a été relativement facile avec le palmier à huile de maîtriser les différentes étapes du protocole d'embryogenèse somatique permettant de répondre à cette demande, il n'en a pas été de même pour le cocotier. Les milieux de culture mis au point pour le clonage du palmier à huile se sont révélés inadaptés au cocotier dont la physiologie

des tissus *in vitro* diffère sensiblement de celle du palmier à huile. Le cocotier est hautement récalcitrant à la culture *in vitro* et chaque étape du processus a posé problème. Tandis que les recherches progressaient, on a pris conscience que la multiplication végétative du cocotier constituait un sujet de recherche à part entière et que sa mise au point serait longue et difficile. De plus les éléments économiques exprimés en terme de marché potentiel pour le vitroplant de cocotier (culture essentiellement villageoise) divergent nettement de celle du palmier à huile (plante de grande culture à vocation industrielle, supportée par d'importants capitaux publics ou privés).

La prise en considération de ces éléments a récemment conduit à reconsidérer les applications possibles de la culture *in vitro* du cocotier en liaison étroite avec la situation spécifique de la filière cocotier. Les réflexions engagées ont permis de hiérarchiser les applications et d'établir une chronologie basée sur l'évaluation de la durée des recherches complémentaires qui conditionnent leur succès.

## L'huile de coprah : une demande croissante, une production à relancer

De 1914 à la fin des années 50, le cocotier occupait à l'échelle mondiale le premier rang parmi les plantes productrices d'huile. Aujourd'hui, l'huile de coprah, avec 4 % de la production mondiale, arrive à la 7<sup>e</sup> position parmi les plantes oléagineuses. Cependant, la demande industrielle en huile laurique (savon et détergent) reste particulièrement importante et représente environ la moitié de la consommation d'huile de coprah dans les pays de l'OCDE. Malgré des qualités supérieures et des coûts d'obtention inférieurs, l'huile de coprah subit la concurrence de l'huile de palmiste extraite de la graine du palmier à huile (sous-produit de l'extraction de l'huile de palme) dont la production mondiale a été multipliée par trois au cours des quinze dernières années. Les importations d'huile de palmiste par l'Union européenne représentent aujourd'hui un volume encore inférieur mais proche de celui des importations d'huile de coprah (400 000 tonnes environ). Bien que l'huile extraite du coprah joue toujours un rôle primordial sur le marché des huiles lauriques, la compétition ne sera désormais plus limitée à l'huile de palmiste. En effet, en 1995, les Etats-Unis ont autorisé la mise sur le marché de colza transgénique capable de produire une huile laurique (Laurical ®) contenant 37 % d'acide laurique contre 49 % pour l'huile de coprah. Si son coût est encore supérieur à celui de l'huile de coprah, elle offre l'avantage d'être produite dans les pays du Nord, avec une qualité constante. Par ailleurs, la possibilité de produire, pour la première fois, une huile laurique à partir d'une plante annuelle permettra d'ajuster la production aux besoins de l'industrie chimique.

Malgré de bonnes perspectives de croissance sur le marché des huiles lauriques, l'avenir du cocotier est menacé par le risque d'un déplacement de cette demande industrielle au profit de l'huile de palmiste.

De plus, depuis les années 80, la production des cocoteraies n'a cessé de baisser. La chute est d'environ 3 % par an pour les Philippines, le premier producteur mondial. De nombreux facteurs sont responsables de ce déclin au niveau mondial :

- la faible productivité liée aux pratiques culturales traditionnelles ;
- l'extension de maladies comme le Cadang-Cadang, d'origine virale, que l'on trouve en Asie, ou encore le jaunissement mortel (provoqué par un phytoplasme)

dans la zone Caraïbe. Au Mexique cette maladie dévastatrice progresse de plus de 100 km par an et menace à terme la totalité des plantations du pays ;

- les nombreuses calamités naturelles : sécheresse, typhons et éruptions volcaniques ;
- le vieillissement des plantations : les deux tiers des individus plantés dans le monde ont plus de 60 ans et le taux de renouvellement des cocoteraies reste insuffisant.

Bien que cette production stagne depuis une vingtaine d'années, elle joue un rôle économique primordial pour un bon nombre de pays comme les Philippines (où elle représente 11 % des exportations du pays), le Vanuatu ou les îles Samoa (50 % des exportations). De plus, dans bon nombre de pays, le cocotier joue un rôle socio-économique essentiel en tant que culture vivrière. En effet, la quasi-totalité de la production mondiale (95 %) est réalisée dans de petites plantations (0,2 à 4 hectares). En Asie 70 % de la production de noix de coco est consommée sur place contre 30 % dans le Pacifique.

Face à la stagnation et au recul de la production, de nombreux pays comme le Mexique et les Philippines développent des programmes de réhabilitation des cocoteraies. Le gouvernement philippin a mis en place, avec le support de la Banque mondiale (122 millions de dollars US), un programme de replantation des vieilles cocoteraies avec du matériel hybride plus performant. Au Mexique la lutte contre le jaunissement mortel a été déclarée priorité nationale. L'ensemble des programmes mondiaux de réhabilitation des cocoteraies ne pourra aboutir que si du matériel végétal très productif est disponible et peut être facilement diffusé.

## Une diffusion des progrès génétiques lourde et difficile

Des progrès génétiques majeurs ont été réalisés à partir des années 60 avec l'obtention des premiers hybrides plus performants que les écotypes traditionnels et l'adoption d'un schéma d'amélioration fondé sur la sélection récurrente réciproque. La méthode repose sur la recherche de l'aptitude à la combinaison entre écotypes et sur les choix phénotypiques pour les caractères héréditaires (Gascon et Nucé de Lamothe, 1978). De nombreux cultivars, variétés, populations et

hybrides, ont été testés à travers le monde. En Côte d'Ivoire, 35 hybrides ont été comparés au témoin Grand Ouest Africain et permettent, en moyenne, un progrès de 66 % par rapport à celui-ci. Les meilleurs d'entre eux ont une production double de celle du témoin. Certains de ces hybrides sont encore améliorés par une sélection individuelle des géniteurs sur descendance. Un nouveau gain de 15 à 30 % peut ainsi être obtenu.

Parallèlement aux travaux de sélection et en l'absence de multiplication végétative naturelle, la diffusion des progrès de l'amélioration génétique n'a été possible que grâce à la mise au point de techniques fiables de production de semences hybrides par pollinisation assistée. Ces techniques qui consistent à établir, pour les structures parentales mâles et femelles, des champs semenciers séparés, ont été décrites en détail par Wuidart et Rognon (1981). La majorité des hybrides aujourd'hui diffusés étant de type Grand x Nain, les cultivars Nains sont plantés sur des surfaces importantes et sont utilisés comme parents femelles, ce qui implique l'élimination systématique de toutes les fleurs mâles et l'apport de pollen de la structure utilisée comme parent mâle de l'hybride. Le pollen est récolté sur le parent Grand et l'on estime qu'il faut dix parents mâles par hectare de champs semenciers en service.

Un hectare de champs semenciers Nain produit environ 15 000 à 17 000 noix par an qui permettront de planter 50 à 60 ha d'hybrides (Nucé de Lamothe et Wuidart, 1992).

Si la méthode de multiplication par graine donne des semences d'excellente qualité, elle n'en demeure pas moins très lourde et coûteuse. Elle demande de vastes étendues et la réalisation de nombreux contrôles et manipulations — émasculature des individus choisis comme parents femelles, récolte, conditionnement et conservation du pollen collecté sur les parents mâles, pollinisation assistée (Wuidart et Rognon, 1981).

Il faut également prévoir du personnel pour le conditionnement du pollen, la récolte des semences et pour vérifier l'ensemble du procédé de production des semences.

Un rythme de plantation de 1 000 hectares par an, demande au minimum 17 hectares de parents femelles, 1,2 hectare d'arbres pollinisateurs, une unité de conditionnement et de conservation du pollen et l'emploi à temps complet d'au minimum 18 personnes, sans compter le personnel d'encadrement.

Dans ces conditions le coût d'une semence sélectionnée de bonne qualité est élevé, de l'ordre de 12 à 20 francs, ce qui reste inaccessible aux petits planteurs.

## Applications potentielles de la micropropagation du cocotier

### Le clonage du cocotier : un outil pour l'amélioration génétique vis-à-vis des contraintes phytopathologiques

L'extension de maladies comme le Cadang-Cadang ou le jaunissement mortel menace de nombreuses plantations dans différentes régions du globe. Il est donc urgent de trouver des variétés résistantes ou tolérantes. En l'absence de tests fiables d'inoculation, ce qui est souvent le cas, il est pratiquement impossible d'estimer la tolérance d'un individu à une maladie. On doit donc se reposer sur les caractéristiques moyennes des populations. Le moyen le plus efficace d'évaluer ces performances individuelles, donc de procéder à une amélioration réelle, est la réalisation de tests de tolérance sur une descendance clonale.

On estime entre 10 et 100 le nombre d'individus qu'il faudrait produire par clone pour permettre l'évaluation du comportement d'individus isolés ayant survécu dans des zones infestées par des maladies telles que le jaunissement mortel.

### Le clonage du cocotier : un outil au service de la diffusion du progrès génétique

Bien qu'il soit rentable sur le long terme, l'achat de semences améliorées représente un investissement initial lourd pour le petit planteur, souvent inaccessible du fait du coût de production élevé de ces graines.

Face à ces contraintes techniques et économiques, les méthodes de culture *in vitro* constituent un outil attractif qui devrait faciliter considérablement la production et la diffusion de semences sélectionnées.

Deux voies sont envisagées :

- le clonage de géniteurs : il serait d'un concours précieux pour la constitution de champs semenciers en permettant la propagation conforme des meilleurs géniteurs actuellement reproduits par autofécondation (faible rendement). La diffusion de variétés commerciales se ferait par voie sexuée sous forme de semences « monoclonales » ou « biclonales » après vérification de la conformité. Des variétés composées de familles de pleins-

frères pourront alors se généraliser et remplacer les hybrides de populations (Verdeil *et al.*, 1995). Il deviendrait plus facile de produire des variétés hybrides améliorées. Cette voie serait possible si l'on était capable de multiplier chaque parent à une centaine d'exemplaires environ ;

- la création de lignées parentales mâles stériles par transformation génétique (introduction d'un gène de stérilité mâle nucléaire).

Les petits planteurs, majoritaires dans la profession, ne peuvent pas accéder au progrès génétique car les semences sont trop chères (coût lié aux contraintes biologiques pour la production de semences sélectionnées). Dans ce contexte, l'obtention de parents mâles stériles par transformation génétique permettrait la production de semences en fécondation libre dans des parcelles isolées. Ceci devrait faire chuter très sensiblement le coût de la semence, donc permettre la pleine valorisation des travaux de sélection classique avec replantation de matériel très performant. A terme, cela devrait conduire à un gain considérable dans la productivité des cocoteraies et permettre de reclasser le cocotier parmi les plantes oléagineuses à haut rendement. Les travaux proposés pourraient s'inspirer de ceux déjà réalisés sur le colza pour lequel une stérilité mâle d'origine nucléaire a été introduite par transformation génétique (Renard *et al.*, 1994). Cette stérilité est obtenue à partir d'une construction incluant une séquence de ribonucléase, sous le contrôle d'un promoteur spécifique du tapis de l'anthere, et un gène de résistance à un herbicide, permettant de sélectionner les plants mâles stériles par simple traitement avec l'herbicide des parcelles de production des semences hybrides. Si du point de vue de la réalisation des constructions ce programme ne devrait pas poser de difficulté majeure, il exige en revanche d'être capable de maîtriser la régénération d'une centaine d'individus à partir d'un arbre choisi comme parent femelle.

### Le clonage d'individus d'élite

Aujourd'hui les variétés diffusées sont constituées de croisements entre individus hétérozygotes (allogamie fréquente). Cette descendance présente une forte variabilité et certains individus produisent jusqu'à 60 % de plus que la moyenne du croisement (Bourdeix, 1989). Si elle était possible, la multiplication végétative d'individus choisis devrait permettre d'augmenter significati-

vement la productivité et l'homogénéité des plantations. Meunier *et al.* (1986) estiment qu'au sein d'une descendance hybride (Nain Jaune Malais x Grand Ouest Africain) appelée PB 121, le clonage de 13 % des meilleurs individus devrait théoriquement permettre une augmentation de la production de coprah de 24 %.

Par ailleurs des croisements 4 voies (hybrides x hybrides) ont été mis en place en Côte d'Ivoire à la station Marc Delorme de Port Bouët dans le cadre d'une collaboration entre le CNRA ivoirien et le Cirad. Ces croisements ont pour objectif principal d'augmenter la variabilité des descendances afin d'obtenir des individus d'élite. Ces croisements permettraient d'obtenir la réassociation de certains caractères intéressants tels qu'une production de type hybride et une croissance en hauteur de type Nain qui facilite la récolte.

L'exploitation de la variabilité intra-hybride par le clonage des individus d'élite nécessiterait la production de plus de 1 000 individus par clone pour la réalisation de plantations associant plusieurs clones.

## Acquis et limites actuelles du procédé d'embryogenèse chez le cocotier

Les applications de la micropropagation dépendent étroitement du degré de maîtrise de la régénération du cocotier, plante réputée extrêmement récalcitrante à la culture *in vitro*. L'élaboration d'un schéma prospectif sur l'utilisation de la culture *in vitro* du cocotier nécessite la prise en considération de l'état d'avancement des travaux de mise au point du protocole et des recherches complémentaires qu'il demande pour rendre possible une application donnée.

Les performances et les limites du protocole Orstom-Cirad sont présentés ci-dessous. Cette description se limite au protocole mis au point à Montpellier, mais il est indispensable de souligner les progrès sensibles réalisés au cours des trois dernières années dans le cadre d'une collaboration internationale entre les laboratoires du Wye College au Royaume-Uni, de l'université de Hanovre en Allemagne, de l'Orstom-Cirad en France, de la Philippine Coconut Authority (PCA) aux Philippines, du Centro de Investigación Científica de Yucatán (Cicy) au Mexique et du Centre national de la recherche agronomique (CNRA) en Côte d'Ivoire, sous l'égide de la Communauté européenne (contrat

n° ERBTS3\*CT940298). Les recherches menées en commun par les différentes équipes ont permis d'approfondir les connaissances sur la récalcitrance du cocotier. La fin de ce projet coïncide avec l'obtention simultanée de vitroplants issus d'embryogenèse somatique dans plusieurs laboratoires : au Cicy à partir de tissus plumulaires prélevés sur des embryons zygotiques (Chan *et al.*, 1998), au PCA à partir de plumules et d'inflorescences immatures prélevées sur des individus adultes, à l'Orstom-Cirad à partir d'inflorescences immatures.

L'état des connaissances actuel sur le clonage du cocotier à partir du procédé expérimental mis au point par l'Orstom et le Cirad en collaboration avec le CNRA de Côte d'Ivoire est décrit. Les différentes étapes de ce procédé sont présentées sur la figure. Il fait appel à une embryogenèse indirecte avec formation d'un cal (prolifération de cellules indifférenciées). Au cours du processus d'embryogenèse induit à partir de cals, une cellule ou un groupe de cellules somatiques donnent naissance à un embryon suivant une séquence d'événements qui présente de nombreuses similitudes avec l'embryogenèse zygotique.

### Callogenèse

Cette étape est aujourd'hui bien maîtrisée et l'ensemble des génotypes testés a donné naissance à des cals (photo 1). L'utilisation d'explants immatures (boutons floraux des inflorescences de rang F2 et F3), constitués en partie de cellules méristématiques indifférenciées, est essentielle pour l'obtention de cals. Le second facteur qui conditionne le succès de la callogenèse est la présence d'un régulateur de croissance à forte activité auxinique : l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D). Cette hormone est nécessaire à l'activation et à la division des cellules indifférenciées de l'explant à l'origine des cals (Verdeil et Buffard-Morel, 1995). Trois concentrations sont généralement utilisées (44, 55 et 66 mg.l<sup>-1</sup> ; Verdeil *et al.*, 1994), en présence de 2 g.l<sup>-1</sup> de charbon de façon à limiter l'effet du 2,4-D sur le brunissement des tissus inflorescenciels prélevés sur des individus adultes (20-25 ans). L'utilisation de ces trois doses de 2,4-D permet une bonne reproductibilité de la callogenèse en atténuant des différences de réactivité au 2,4-D observées d'un individu à l'autre, au sein d'une même origine génétique.

Dans nos conditions, 20 à 40 % des explants sont porteurs de cals après 6 mois de culture sans repiquage.

### Induction et initiation de l'embryogenèse

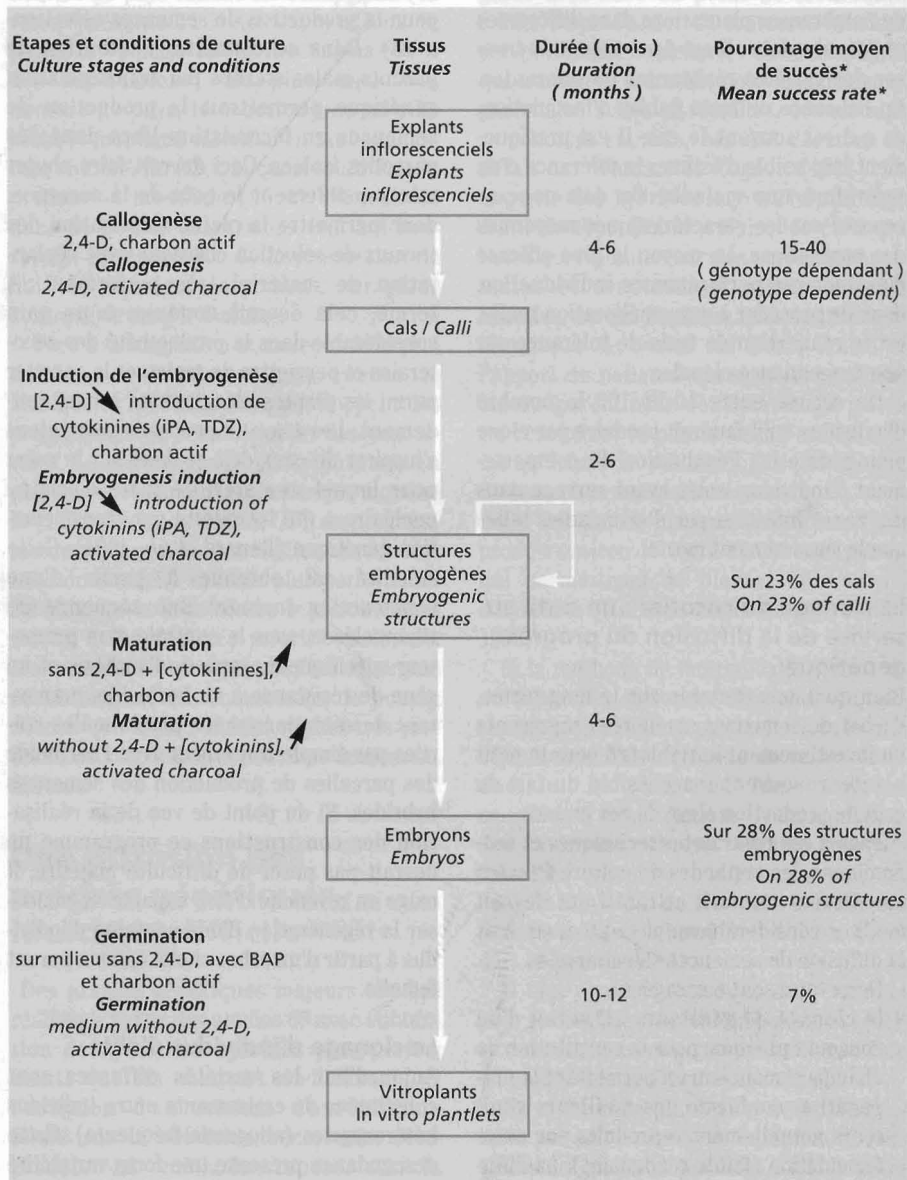
Le taux d'auxine de synthèse (2,4-D) en présence de charbon actif est le facteur essentiel de l'acquisition par les cals de la compétence à l'embryogenèse (Verdeil *et al.*, 1996). Les cals sont isolés 4 à 6 mois après la mise en culture des explants inflorescenciels. Ils sont maintenus à l'obscurité et sont repiqués tous les 2 mois sur un milieu appauvri en 2,4-D, en présence de thidiazuron (TDZ) de façon à provoquer l'individualisation des structures embryogènes sous forme de globules méristématiques épidermisés (photo 2). Après deux sous-cultures, le

thidiazuron est remplacé par de la iPA (isopentényladénine, cytokinine). Les études histologiques ont révélé une dégénérescence du potentiel méristématique des embryons lorsque le TDZ est maintenu pendant plus de deux sous-cultures.

L'induction de l'embryogenèse peut être considérée comme bien maîtrisée puisque, dans nos conditions de culture, 23 % des cals isolés génèrent des structures embryogènes.

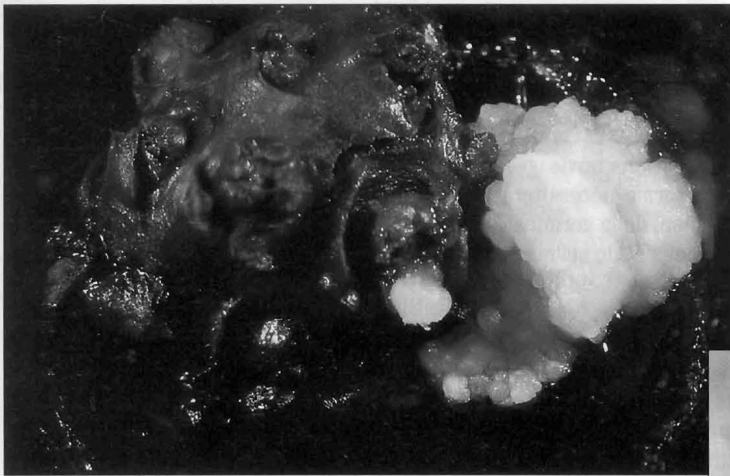
### Maturation des embryons

La maturation des embryons somatiques est obtenue après suppression du 2,4-D, sur un milieu contenant une cytokinine (iPA ou 6

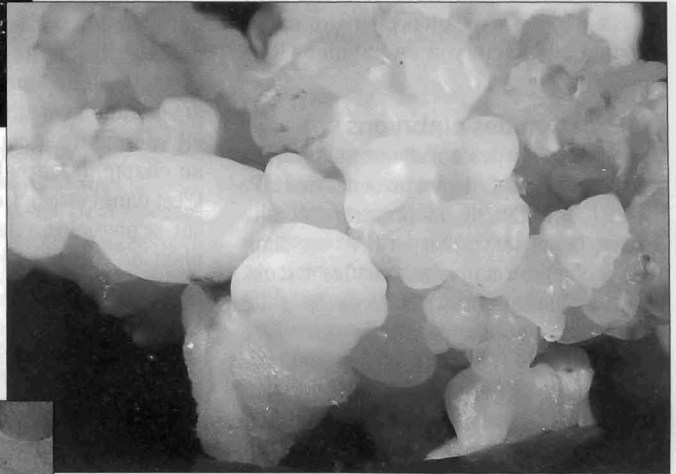


\*Pourcentages évalués à partir des 8 derniers arbres mis en culture (mai 1994 - juin 1995) / Percentages based on the last 8 palms cultured (May 1994 - June 1995)

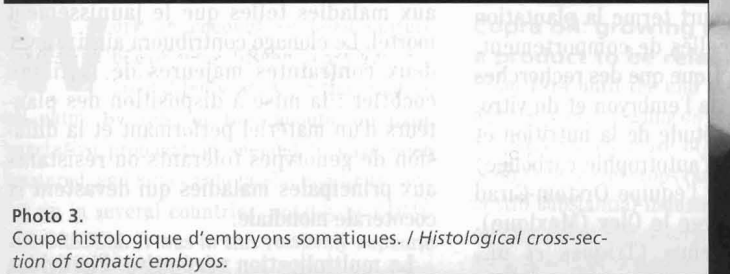
Schéma du protocole de régénération du cocotier mis au point par l'équipe mixte Orstom-Cirad, à partir de tissus inflorescenciels (décembre 1997). / The coconut regeneration procedure developed by the Orstom-Cirad mixed team, using inflorescence tissues (December 1997).



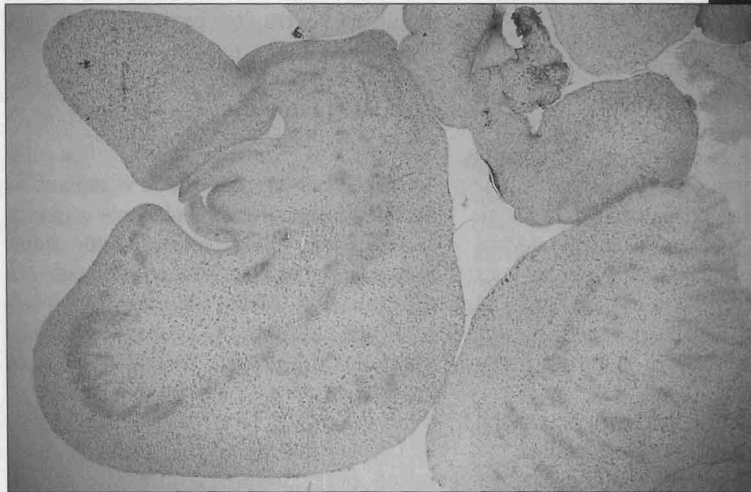
**Photo 1.**  
Cal sur explant inflorescentiel (4 mois après la mise en culture). / Callus on inflorescence explant (four months after the start of culturing).



**Photo 2.**  
Cal embryogène de cocotier. / Coconut embryogenic callus.



**Photo 3.**  
Coupe histologique d'embryons somatiques. / Histological cross-section of somatic embryos.



**Photo 5.**  
Vitroplants issus d'embryogenèse somatique. / In vitro plantlets produced by somatic embryogenesis.



**Photo 4.**  
Germination d'un embryon somatique. / Somatic embryo germination.

benzyl-aminopurine, BAP) dont la concentration est augmentée à chaque sous-culture (tous les 2 mois). La présence d'une cytokinine est indispensable à la poursuite de la différenciation du méristème caulinaire au sein de l'embryon (photo 3) ainsi qu'au maintien de son potentiel méristématique. Dans ces conditions de culture 28 % des structures embryogènes évoluent en embryons complets. Comme dans l'embryon zygotique mature, on observe la présence d'un méristème caulinaire et d'une zone méristématique à vocation racinaire caractéristique de l'embryon de palmier (Haccius, 1978).

### Germination des embryons

La germination des embryons somatiques est initiée à l'obscurité, en présence de BAP.

Dès l'émission de la première écaille foliaire, la concentration en BAP est diminuée à chaque repiquage, tous les 2 mois. Les vitroplants sont transférés en salle lumineuse lorsqu'apparaît la première feuille véritable (photo 4). Le système racinaire issu de la germination de l'embryon est souvent de mauvaise qualité. Un système racinaire secondaire est néoformé après traitement par 20 mg/l d'acide  $\alpha$ -naphthalène acétique (ANA, régulateur de croissance à activité auxinique) en présence de 2 g/l de charbon actif (photo 5).

Le protocole Orstom-Cirad a été appliqué aux principaux écotypes cultivés (Nain Jaune Malais, Nain Vert de Guinée, Grand Ouest Africain, Grand Laguna) et hybrides (PB 121 Nain jaune malais x Grand Ouest africain) et PB 111 (Grand Ouest Africain x Nain Rouge du Cameroun) créés par le Cirad et le CNRA (Côte d'Ivoire) et hybride Maypan (Nain Jaune Malais x Grand du Panama) du Mexique qui serait résistant au jaunissement mortel. Il a déjà permis d'obtenir des vitroplants sur l'ensemble des géotypes étudiés. Cependant un certain nombre de problèmes subsistent et limitent actuellement les applications du clonage du cocotier.

Limites actuelles du protocole :

- Le pourcentage de germination des embryons reste faible (seulement 7 % des embryons somatiques sont capables de germer).
- Le développement des vitroplants obtenus est lent et s'accompagne souvent d'un jaunissement des feuilles et d'une faible vigueur des pousses feuillées qui rendent difficile leur acclimatation.
- Le nombre de vitroplants régénérés à partir d'un individu reste faible (20 plants au plus à partir d'un individu de départ).

## De la maîtrise des phases tardives de l'embryogenèse aux premières applications

L'ensemble des applications envisagées à court, moyen et long terme nécessitera la maîtrise, en premier lieu, de la germination des embryons somatiques et du sevrage des vitroplants, et en second lieu, de la multiplication à grande échelle.

Les phases tardives du procédé de régénération du cocotier (germination et sevrage des vitroplants) représentent un obstacle majeur aux applications. Leur amélioration constitue donc notre priorité ; elle permettra à court terme la plantation au champ de parcelles de comportement. C'est dans cette optique que des recherches sur la physiologie de l'embryon et du vitroplant de cocotier (étude de la nutrition et de l'acquisition de l'autotrophie carbonée) ont été lancées par l'équipe Orstom-Cirad en collaboration avec le Cicy (Mexique). Les résultats obtenus (Triques *et al.*, 1997a,b) laissent entrevoir la possibilité d'obtenir des vitroplants fonctionnels, pouvant être sevrés dans un délai de 3 à 4 ans.

Le taux de multiplication actuellement atteint est suffisant pour permettre d'obtenir, dès lors que la qualité des vitroplants sera maîtrisée, une centaine de plants par individu de départ. La maîtrise de la germination et du sevrage des vitroplants devrait donc permettre de couvrir les besoins pour la réalisation de tests d'évaluation de la tolérance aux principales maladies, et pour la création de semences mono ou biclonales.

Le clonage d'individus d'élite nécessitera, quant à lui, des délais supplémentaires, car le taux de multiplication actuel ne permet pas encore de répondre à cette demande (plus de 1 000 individus régénérés par ortet). Une phase de multiplication à grande échelle des tissus embryogènes est à rechercher pour être en mesure d'assurer la production en masse de vitroplants. Des études sont en cours en vue de maîtriser l'induction du phénomène d'embryogenèse adventive qui permet la production en masse chez le palmier à huile (Pannetier *et al.*, 1981) et l'obtention de suspensions embryogènes.

## Conclusion

Les progrès accomplis récemment dans le domaine de la maîtrise de la régénération du cocotier par embryogenèse somatique devraient permettre à court terme (d'ici 5 ans environ) la plantation des premiers

champs comportementaux. Les résultats concernant les performances et la conformité des clones seront alors disponibles dans une dizaine d'années.

L'analyse des besoins respectifs in vitro pour chacune des applications potentielles, confrontée à l'examen du degré d'avancement des travaux sur la mise au point du clonage, laisse penser qu'il sera utilisé dans un premier temps comme outil au service du sélectionneur. Il facilitera alors la diffusion des progrès génétiques sous forme de semences mono ou biclonales et permettra également un *screening* efficace des individus résistants ou tolérants aux maladies telles que le jaunissement mortel. Le clonage contribuera ainsi à lever deux contraintes majeures de la filière cocotier : la mise à disposition des planteurs d'un matériel performant et la diffusion de géotypes tolérants ou résistants aux principales maladies qui dévastent la cocoteraie mondiale.

La multiplication végétative d'individus d'élite ne pourra être envisagée qu'à plus long terme parce qu'elle sous-entend la maîtrise non seulement de la phase de multiplication intense mais également de la conformité du matériel régénéré.

Chez le cocotier, le coût du vitroplant ne devrait pas constituer un obstacle majeur à sa diffusion, contrairement à de nombreuses espèces pour lesquelles ce coût est généralement élevé comparativement à celui des méthodes de propagation traditionnelles. Le prix de revient d'un vitroplant de palmier à huile produit outre-mer est de 2-3 dollars US environ contre 0,5 dollar US pour une semence (Duval, communication personnelle). D'après George et Sherrington (1984), les situations pour lesquelles les coûts de production peuvent être considérés comme acceptables sont les suivantes :

- une plante qui ne peut pas être propagée facilement ou rapidement par les techniques traditionnelles ;
- une plante pour laquelle le coût des méthodes traditionnelles est élevé ;
- une plante pour laquelle il est souhaitable de produire des plants indemnes de maladies.

Le cocotier figure probablement parmi les plantes qui satisfont le mieux à ces conditions, compte tenu des difficultés de production et du coût élevé de la semence sélectionnée. ■

## What are the possible applications for coconut (*Cocos nucifera* L.) micropropagation?

Verdeil J.L.<sup>1</sup>, Baudouin L.<sup>2</sup>, Hocher V.<sup>1</sup>, Bourdeix R.<sup>3</sup>, N'Cho Y.P.<sup>3</sup>, Sangare A.<sup>3</sup>, Rillo E.<sup>4</sup>, Oropeza C.<sup>5</sup>, Hamon S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ORSTOM-CIRAD-CP, Laboratoire Genetrop, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex 1, France

<sup>2</sup> CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 01, France

<sup>3</sup> CNRA, Station Marc Delorme, Port Bouët, 07 BP 13, Abidjan 07, Côte d'Ivoire

<sup>4</sup> PCA, Albay Research Center, Banao, 4503 Guinobatan, Albay, Philippines

<sup>5</sup> CICY, 7 Antigua Carretera A Progreso, Ex-Hacienda Xcumpich, 97310 Cordemex, Merida, Mexico

The coconut palm is highly recalcitrant to *in vitro* culture. Moreover, it is primarily a smallholder crop. In this context, what are the main potential applications for coconut cloning?

**W**ork on coconut *in vitro* culture began some fifteen years ago, i.e. around ten years later than that on oil palm. By 1983 or thereabouts, oil palm vegetative propagation seemed to have been mastered, and large-scale production units were set up in several countries, notably by CIRAD and ORSTOM. It was in this relatively euphoric context that research was launched into coconut micropropagation. For easily understandable historical reasons, the prospects for applying coconut cloning were immediately geared towards vegetative propagation of elite individuals, which implies low-cost mass production of true-to-type *in vitro* plantlets. Although it proved relatively easy to master the various stages of the somatic embryogenesis procedure required for such mass production with regard to oil palm, the same cannot be said for coconut. The culture media developed for oil palm cloning proved unsuitable for coconut, as the *in vitro* physiology of its tissues differs considerably from that of oil palm. The coconut palm is highly recalcitrant to *in vitro* culture, and every stage of the procedure brought its share of problems. Although research was progressing, it became obvious that coconut vegetative propagation was a research topic in its own right, and that its development would be long and arduous. Moreover, the economic stakes in terms of the potential market for coconut *in vitro* plantlets (it is primarily a smallholder crop) were very different from those for oil palm (a widely grown commercial crop backed by substantial public or private capital).

These various factors prompted a recent rethink of the possible applications for coconut *in vitro* culture, closely linked to the specific situation of the coconut sector. The debate led to the various applications being classed in order of priority and to a timetable based on the expected duration of the additional research required to ensure their success.

### Copra oil: growing demand, a product to be relaunched

From 1914 until the end of the 1950s, coconut was the world's leading oil crop. Nowadays, copra oil, with its 4% share of the world market, is seventh in the oil crops rankings. However, there is still substantial industrial demand for lauric oil (for soaps and detergents), which accounts for around half of total copra oil consumption in the OECD countries. Despite better quality and lower production costs, copra oil is suffering in the face of competition from palm kernel oil (PKO, a palm oil by-product), whose output worldwide

has trebled in the last 15 years. PKO imports into the European Union are now only slightly below those of copra oil (around 400 000 tonnes). Although copra oil still plays a crucial role on the lauric oils market, PKO is no longer its only rival: in 1995, the USA authorized the launch of transgenic rapeseed capable of producing a lauric oil (Laurical®) that contains 37% lauric acid, compared to 49% for copra oil. Although it costs more than copra oil, it has the advantage of being produced in the North, and quality is consistent. Moreover, the possibility of producing a lauric oil from an annual crop for the first time means that production can be adjusted in line with chemical industry requirements.

Despite the good growth prospects for the lauric oils market, the future of the coconut palm is threatened by a shift in industrial demand towards PKO.

Moreover, since the 1980s, coconut production has fallen steadily, notably in the Philippines, the world's leading producer, where the decrease can be put at around 3% per year. There are many reasons for this worldwide decline:

- low productivity due to traditional crop practices;
- the spread of diseases such as Cadang-Cadang, a viroid disease found in Asia, or lethal yellowing (caused by a phytoplasma) in the Caribbean. This devastating disease is

currently spreading by up to 100 km per year in Mexico, and could eventually wipe out all the country's estates;

- numerous natural disasters: drought, typhoons and volcanic eruptions;
- ageing plantations: two thirds of the coconut palms worldwide are over 60 years old, and plantation renewal rates are insufficient.

Although production has been marking time for some 20 years or so, copra oil plays a crucial economic role in many countries such as the Philippines (where it is the number one agricultural export), Vanuatu or Samoa (50% of exports). Moreover, in a large number of countries, coconut plays an essential socio-cultural role as a food crop. In effect, almost all the coconuts produced worldwide (95%) are grown on smallholdings (0.2 to 4 hectares). In Asia, 70% of coconuts are eaten locally, compared to 30% in the Pacific.

In the face of stagnating and even falling production, many countries such as Mexico and the Philippines have introduced coconut plantation rehabilitation programmes. With World Bank support (US\$ 122 million), the Philippine government has launched a programme to replant old coconut plantations using locally developed hybrid material. In Mexico, lethal yellowing control has been declared a national priority. The various coconut plantation rehabilitation programmes worldwide cannot succeed unless they have access to high-yielding, easily available and distributable planting material.

### Disseminating genetic progress is a complex, arduous business

Major genetic progress has been made since the 1960s, with the obtention of the first hybrids, which are more productive than traditional ecotypes, and the introduction of an improvement scheme based on reciprocal recurrent selection. The method involves exploiting between-ecotype combining ability and basing phenotypic choices on heritable characters

(Gascon and Nucé de Lamothe, 1978). Many cultivars, varieties, populations and hybrids have been tested worldwide. In Côte d'Ivoire, 35 hybrids were compared to the West African Tall control, and proved on average to represent a 66% improvement on it. The best hybrids produced twice as much as the control. Some have since been improved further by individual parent selection at progeny level, leading to a further 15 to 30% improvement.

Alongside breeding work and without natural vegetative propagation, the only way of disseminating genetic progress has been to develop reliable hybrid seed production techniques using assisted pollination. This consists in setting up separate seed gardens for male and female parents, and the method was described in detail by Wuidart and Rognon (1981). As most of the hybrids currently distributed are Dwarf x Tall types, the Dwarf cultivars are planted in large numbers and used as female parents, which involves systematically removing all male flowers and bringing pollen from the palms chosen as male parents. The pollen is collected from the Tall parent, and it is estimated that ten male parents are required per hectare of operational seed gardens.

One hectare of Dwarf seed gardens produces around 15 000 to 17 000 nuts per year, which is sufficient to plant 50 to 60 ha of hybrids (Nucé de Lamothe and Wuidart, 1992).

Although propagation via seeds produces top quality seednuts, it is a very complex, costly business. It calls for vast areas and numerous checks and operations – emasculating of the individuals chosen as female parents, seednut harvesting, packaging and storage of the pollen gathered from the male parents, assisted pollination (Wuidart and Rognon, 1981).

Specific staff members also have to be assigned to pollen packaging, seednut collection and monitoring the seednut production procedure as a whole.

At least 17 hectares of female parents, 1.2 hectares of pollinators, a pollen packaging and storage unit and at least 18 full-time employees, not counting supervisory staff, are required to plant 1 000 hectares per year.

As a result, top quality selected seednuts are expensive – around 12 to 20 francs each – which puts them beyond the reach of smallholders.

### Potential applications for coconut micropropagation

#### Coconut cloning: a tool for genetic improvement with respect to phytopathological constraints

The spread of diseases such as Cadang-Cadang or lethal yellowing is a threat to numerous plantations all over the world. It is thus urgent

that resistant or tolerant varieties be found. In the absence of reliable inoculation tests, as is usually the case, it is virtually impossible to estimate the tolerance of an individual of a given disease. Work therefore has to be based on the mean characteristics of populations. The most effective way of evaluating individual performance, hence of making real improvements, is to carry out tolerance tests on clonal progenies.

The number of individuals that would have to be produced per clone to enable an assessment of the performance of isolated individuals that survive in zones affected by lethal diseases such as lethal yellowing is estimated at between 10 and 100.

#### Coconut cloning: a tool for disseminating genetic progress

Although buying improved seednuts is cost-effective in the long term, it represents a substantial and often inaccessible initial investment for smallholders, given the high cost of producing such seednuts.

In the face of these technical and economic constraints, *in vitro* culture looks like an attractive tool that should greatly facilitate the production and dissemination of improved seednuts.

There are two possible approaches:

- parent cloning: this would be a valuable help in setting up seed gardens, by enabling true-to-type propagation of the best parents currently reproduced by selfing (which is low-yielding). Commercial varieties would be disseminated in "monoclonal" or "biclinal" seednut form, after ensuring that they are true-to-type. Varieties comprising half-sib families could then become widespread and replace between-population hybrids (Verdeil *et al.*, 1995). It would become easier to produce improved hybrid varieties. This approach would be possible provided around a hundred individuals of each parent could be produced;
- creating sterile male parent lines by genetic transformation (introducing a nuclear male sterility gene).

Smallholders, who are in the majority in the profession, do not have access to genetic progress as the seednuts are too expensive (due to the biological constraints involved in producing selected seednuts). In this context, producing sterile male parents by genetic transformation would make it possible to produce open pollinated seednuts in isolated plots. This should substantially reduce seednut prices, hence optimizing conventional breeding work by making it possible to replant with high-yielding material. In the long term, this should lead to a substantial gain in coconut productivity

and put the coconut palm right back at the top of the high-yielding oil crops rankings. The proposed work could be based on that already done on rapeseed, in which male sterility of nuclear origin was introduced by genetic transformation (Renard *et al.*, 1994). This sterility was obtained using a structure including a ribonuclease sequence, under the control of a specific anther tapetum promoter and a herbicide resistance gene, making it possible to select sterile male plants simply by treating hybrid seednut production plots with the herbicide. Although this programme should not pose any major problems as regards producing these structures, it is essential to be able to master the regeneration of around a hundred individuals from a given palm chosen as a female parent.

#### Cloning elite individuals

The varieties currently distributed are crosses between heterozygous individuals (frequently allogamous). These progenies are highly variable, and some individuals produce up to 60% more than the mean for the cross (Bourdeix, 1989). If it were possible, vegetative propagation of chosen individuals should significantly improve plantation productivity and uniformity. Meunier *et al.* (1986) estimated that within a hybrid progeny (Malayan Yellow Dwarf x West African Tall), known as PB 121, cloning 13% of the best individuals should theoretically enable a 24% increase in copra production.

Moreover, four-way (hybrid x hybrid) crossing has been undertaken at the Marc Delorme station at Port Bouët, Côte d'Ivoire, under a collaboration agreement between the Ivorian CNRA and CIRAD. The main aim of these crosses is to increase progeny variability so as to obtain elite individuals. They should enable the recombination of certain worthwhile characters such as hybrid type production levels and Dwarf type vertical growth, which would facilitate harvesting.

Exploiting within-hybrid variability by cloning elite individuals would call for over 1 000 individuals per clone in order to set up plantations associating several clones.

#### Achievements and current limitations of coconut embryogenesis

The applications for micropropagation are largely dependent on the degree of mastery of coconut regeneration, since the plant is reputed to be extremely recalcitrant to *in vitro* culture. In planning the applications for coconut *in vitro* culture, it is important to take account of the progress made in the work to develop the corresponding procedure and of the additional

research required to make a given application possible.

The performances and limitations of the ORSTOM-CIRAD procedure are described below. The description is limited to the procedure developed in Montpellier, but it is important to stress the considerable progress made over the last three years under an international collaboration agreement between the laboratories at Wye College in the UK, the University of Hanover in Germany, ORSTOM-CIRAD in France, the Philippine Coconut Authority (PCA) in the Philippines, the Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) in Mexico and the Centre National de la Recherche Agronomique (CNRA) in Côte d'Ivoire, under the aegis of the European Community (contract ERBTS3\* CT940298). The joint research conducted by the different teams has increased our understanding of why the coconut palm is so recalcitrant. The completion of the project coincided with the simultaneous obtention of *in vitro* plantlets produced by somatic embryogenesis at several laboratories: at the CICY using plumule tissues taken from zygotic embryos (Chan *et al.*, 1998), at the PCA from plumules and immature inflorescences taken from adult palms, and at ORSTOM-CIRAD from immature inflorescences.

The state of progress on coconut cloning using the experimental procedure developed by ORSTOM and CIRAD in conjunction with the CNRA in Côte d'Ivoire is described. The different stages of the procedure are shown in figure. It uses indirect embryogenesis with callus formation (proliferation of undifferentiated cells). During embryogenesis from calli, a somatic cell or group of cells produces an embryo, according to a sequence of events very similar to zygotic embryogenesis.

### Callogenesis

This stage has now been effectively mastered, and all the genotypes tested have produced calli (photo 1). It is essential to use immature explants (floral buds from rank L2 and L3 inflorescences) partly comprising undifferentiated meristematic cells in order to obtain calli. The second factor governing the success of callogenesis is the use of a growth regulator with a high auxin activity: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). This hormone is essential for the activation and division of the undifferentiated cells in the explant used to produce calli (Verdeil and Buffard-Morel, 1995). Three concentrations are generally used (44, 55 and 66 mg.l<sup>-1</sup>; Verdeil *et al.*, 1994), using 2 g.l<sup>-1</sup> of activated charcoal to limit the browning of inflorescence tissues taken from adult individuals (20-25 years old) under the effect of 2,4-D. Using three 2,4-D doses ensures reproducible callogenesis by alleviating the

differences in reactivity to 2,4-D from one individual to another of the same genetic origin. Under our conditions, 20 to 40% of the explants produced calli after six months' culture without transfer.

### Embryogenesis induction and initiation

Synthetic auxin (2,4-D) concentration in the presence of activated charcoal is the prime factor governing the embryogenesis ability of calli (Verdeil *et al.*, 1996). The calli are isolated four to six months after the inflorescence explants were first cultured. They are kept in the dark and transferred every two months to a medium containing only a small amount of 2,4-D, in the presence of thidiazuron (TDZ), to trigger the individualization of embryogenic structures in the form of epidermized meristematic globules (photo 2). After two sub-cultures, the TDZ is replaced by iPA (isopentenyladenine, cytokinin). Histological studies have shown that the embryo meristematic potential decreases if TDZ is maintained for more than two sub-cultures.

Embryogenesis induction can be considered to have been mastered, as under our culture conditions, 23% of isolated calli gave rise to embryogenic structures.

### Embryo maturation

Somatic embryo maturation is achieved after eliminating 2,4-D, on a medium containing a cytokinin (iPA or 6 benzyl-aminopurine, BAP) whose concentration is increased with each sub-culture (every two months). A cytokinin is essential for the continued differentiation of the cauline meristem within the embryo (photo 3) and for maintenance of its meristematic potential. Under these culture conditions, 28% of our embryogenic structures developed into whole embryos. As in mature zygotic embryos, a cauline meristem and a meristematic zone destined for root development, characteristic of palm embryos, are observed (Haccius, 1978).

### Embryo germination

Somatic embryo germination is initiated in the dark, with BAP.

Once the first leaf scale has been emitted, the BAP concentration is reduced with every transfer, every two months. The *in vitro* plantlets are transferred to a lighted room once the first real leaf appears (photo 4). The root system produced after embryo germination is often poor quality. The neoformation of a secondary root system can be triggered using 20 mg/l of  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA, an auxinic growth regulator) with 2 g/l of activated charcoal (photo 5).

The ORSTOM-CIRAD procedure has been applied to the main cultivated ecotypes

(Malayan Yellow Dwarf, Guinea Green Dwarf, West African Tall, Laguna Tall), two hybrids: PB 121 (Malayan Yellow Dwarf x West African Tall) and PB 111 (West African Tall x Cameroon Red Dwarf) created by CIRAD and the CNRA (Côte d'Ivoire) and the Maypan hybrid (Malayan Yellow Dwarf x Panama Tall) from Mexico, which seems to be resistant to lethal yellowing. *In vitro* plantlets have already been obtained for all the genotypes studied, but there are still certain problems, which currently limit the applications for coconut cloning.

Current limitations of the protocol:

- The embryo germination rate is still poor (only 7% of somatic embryos are capable of germinating).
- The *in vitro* plantlets obtained develop slowly, and their development is often accompanied by leaf yellowing and poor shoot vigour, which makes acclimation difficult.
- The number of *in vitro* plantlets regenerated from a given individual remains low (20 at most from each initial individual).

### From mastering the later stages of embryogenesis to the first applications

All the short-, medium- and long-term applications envisaged will mean first mastering somatic embryo germination and *in vitro* plantlet weaning and then large-scale multiplication.

The later stages of the coconut regeneration procedure (germination and *in vitro* plantlet weaning) are a major obstacle to possible applications. Our priority is thus to improve these stages, since this should enable the setting up of field performance trials in the near future. It was with this in mind that the ORSTOM-CIRAD team, in conjunction with the CICY (Mexico), launched research on coconut embryo and *in vitro* plantlet physiology (a study of nutrition and of carbon autotrophy acquisition). The results obtained (Triques *et al.*, 1997a,b) suggest that it may be possible to obtain functional *in vitro* plantlets ready for weaning within three or four years.

The multiplication rates currently achieved will be sufficient to produce around a hundred *in vitro* plantlets per initial individual, once *in vitro* plantlet quality has been mastered. Mastering germination and *in vitro* plantlet weaning should thus make it possible to satisfy the requirements for evaluating tolerance of the main diseases and creating mono- or biclonal seednuts.

Cloning elite individuals, for its part, will take even longer, since the current multiplication rates are not sufficient to meet demand (over 1 000 regenerated individuals per ortet). A large-scale embryogenic tissue multiplication phase is

required if *in vitro* plantlets are to be mass-produced. Studies are under way with a view to mastering adventive embryogenesis induction, since this enables mass production of oil palm ramets (Pannetier *et al.*, 1981) and the obtention of embryogenic suspensions.

**Conclusion**

The progress made recently in mastering coconut regeneration by somatic embryogenesis should enable the setting up of the first performance trials in the near future (within around five years). Clone performance and conformity results should thus be available within ten years or so.

An analysis of *in vitro* plantlet requirements for each of the potential applications in the light of the state of progress in the work on cloning suggests that cloning will first be used as a tool for breeders, in which case it will facilitate the dissemination of genetic progress, in the form of

mono- or biconal seednuts, and also enable effective screening of varieties resistant to or tolerant of diseases such as lethal yellowing. Cloning will thus help to overcome two main constraints faced by the coconut sector: making high-yielding material available to growers and disseminating genotypes tolerant of or resistant to the main diseases currently devastating coconut plantations worldwide.

Vegetative propagation of elite individuals is a longer-term undertaking, in that it means mastering not only the mass multiplication phase but also the conformity of the regenerated material.

The cost of coconut *in vitro* plantlets must not be allowed to become a major obstacle to their dissemination, unlike many other species, for which the cost is usually high compared to traditional propagation methods. The cost price of an oil palm ramet produced overseas is around US\$ 2-3, compared to US\$ 0.50 for a seed (Duval,

personal communication). According to George and Sherrington (1984), the situations in which production costs can be considered acceptable are as follows:

- a plant that cannot easily or rapidly be propagated by traditional techniques;
- a plant for which the cost of traditional methods is high;
- a plant for which disease-free plantlets are required.

The coconut palm is probably one of the plants that best satisfies these conditions, given the difficulties of producing selected seednuts and their high price. ■

**Résumé**

Le cocotier (*Cocos nucifera* L.), généralement allogame, n'est actuellement multiplié que par voie sexuée, avec un coefficient de multiplication faible. La noix de coco est également connue pour être la graine la plus volumineuse parmi les espèces cultivées, ce qui pose au sélectionneur chargé de la diffusion des progrès génétiques un certain nombre de problèmes. Face à ces contraintes la multiplication végétative *in vitro* constitue un outil attractif pour le sélectionneur. Cet article fait le point des principales applications potentielles du clonage du cocotier en liaison étroite avec sa situation socio-économique (culture essentiellement villageoise). Il décrit l'état d'avancement des travaux sur la maîtrise de la régénération du cocotier, plante extrêmement récalcitrante à la culture *in vitro*. Une chronologie des applications est proposée à partir de l'évaluation de l'importance et de la durée des recherches complémentaires qui conditionnent leur succès.

**Abstract**

The coconut palm (*Cocos nucifera* L.), which is generally allogamous, can currently only be propagated using seednuts, with a low multiplication coefficient. Coconut palms also produce larger seeds than any other cultivated species, which poses a certain number of problems for breeders in charge of disseminating genetic progress. In view of these constraints, *in vitro* vegetative propagation looks like an attractive solution for breeders. This article sums up the main potential applications for coconut cloning, bearing in mind its socio-economic situation (it is primarily a smallholder crop). It describes the state of progress in mastering coconut regeneration, as the plant is extremely recalcitrant to *in vitro* culture. A timetable is proposed for the various applications, based on an evaluation of the importance and duration of the additional research required to ensure their success.

**Resumen**

El cocotero (*Cocos nucifera* L.), por lo general allogamo, no se multiplica actualmente más que por vía sexuada, con un bajo coeficiente de multiplicación. La nuez de coco también se conoce por ser la semilla más voluminosa entre las especies cultivadas, lo que plantea al genetista encargado de la difusión de los avances genéticos cierto número de problemas. Frente a estas limitaciones la multiplicación vegetativa *in vitro* constituye una herramienta atractiva para el genetista. Este artículo actualiza las principales aplicaciones potenciales del clonaje del cocotero relacionado estrechamente con su situación socioeconómica (cultivo esencialmente aldeano). Describe el estado de avance de los trabajos sobre el dominio de la regeneración del cocotero, planta extremadamente recalcitrante al cultivo *in vitro*. Se propone una cronología de las aplicaciones a partir de la evaluación de la importancia y del tiempo de las investigaciones complementares que condicionan su éxito.