

**Biotechnology for coffee breeding and genetic resource enhancement**

S. HAMON, ET AL.

Arabica and robusta coffees are derived from recently domesticated species. The Coffea gene pool, of African origin, is characterized by high genetic diversity based on germplasm from different countries that is conserved in several field collections. This paper gives an overview of recent results obtained using biotechnological methods on genetic diversity within the Coffea gene pool, breeding potential and germplasm preservation.

**Genetic diversity.** Coffee phylogenetic relationships were estimated by different approaches. The gene pool was divided into four major groups on the basis of nuclear DNA polymorphism of sequences of the internal transcribed spacer ITS 2 region. Chloroplastic DNA (exclusively maternally inherited) was sequenced from 38 Coffea taxa for the trnL-trnF intergenic spacer. Phylogenetic relationships inferred from this analysis suggest a six-clade organization. The genome sizes (DNA content - 2C values), estimated by flow cytometry, ranged from 0.95 to 1.78 pg and species could be classified into three groups, suggesting that the coffee genome size increases from East to West Africa. The overall results indicate both a geographical organization of the diversity (Madagascar, East Africa, Central and West Africa) and a fast speciation process.

**Molecular breeding potential.** A first linkage map for coffee *C. canephora* (totalling 1,402 cM) was deve-

loped on the basis of a doubled-haploid population. Both RFLP and PCR-based markers were used to construct linkage groups and locate useful genes, for instance: the S-locus involved in the self-incompatibility of *C. canephora* is associated with an RFLP marker on linkage group 9; the resistance to coffee berry disease (CBD) in arabica coffee, is closely linked to the T gene. For CBD, resistance is controlled by at least three genes that are present in the varieties Hibrido de Timor (T gene), Catimor (T gene), Rume Sudan (R and k genes) and K7 (k gene).

Concerning cultivated arabica coffee, random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers have been successfully employed to analyse genetic diversity among cultivated and spontaneous accessions. The narrow genetic base of commercial cultivars was confirmed, but there was found to be relatively high genetic diversity within the germplasm collection, demonstrating the importance of collecting wild types. The marked heterotic effect reported in intergroup hybrids could be related to this genetic differentiation.

At the interspecific level, analyses of crossing behaviour indicated that between-species hybrids can be obtained in most cases. F1 and G2 hybrids obtained between two species with different nuclear DNA content, i.e. *C. pseudozanguebariae* (1.13 pg) and *C. deveyrei* (1.42 pg) were selected as a model. Genomic in situ hybridization (GISH) and flow cytometry were used with six F2 and seven G2. In G2, there was a linear relationship between the number of chromosomes and the nuclear DNA content, which means that flow cytometry could be useful for assessing parental chromosomal contribution. In

addition, caffeine and heteroside contents were analysed in these hybrids. They appeared to be under polygenic control with a strong genetic effect. Nevertheless, one major gene with two alleles seemed to be involved in the control of both compounds. This highlights the obvious interest of inserting wild-type characters into the genome of commercially viable coffee species.

**Conservation of genetic resources.** Most coffee accessions are currently conserved in field collections. An in vitro core collection of African coffee germplasm, structured in 32 diploid diversity groups, was established and conserved in vitro for 3 years. Survival analysis indicated broad variability in the responses of the accessions to the storage conditions and confirmed the importance of structuring the coffee complex to the intraspecific level.

Different techniques and media have been tested for long-term preservation of coffee resources, and cryopreservation seems to be the most interesting. The effects of the precooling temperature on the survival rate of cryopreserved *C. arabica* seeds and excised zygotic embryos, were investigated. The optimal germination rate (70%) of cryopreserved seeds was achieved after precooling to -50°C. For embryos extracted after thawing from cryopreserved seeds, the maximal survival rate (97%) was obtained when seeds were immersed directly into liquid nitrogen immediately after dehydration without precooling.

Cahiers Agricultures 1998 ; 7 : 480-7.

## Les biotechnologies appliquées à l'amélioration génétique et la propagation du cacaoyer au Mexique

Orlando Lopez-Baez, Guillermo Fraire-Vasquez,  
Blanca Hernandez-Velasco, Francisco Holguin-Melendez,  
Jaime Cueto-Moreno, Dominique Cruzillat

O. Lopez-Baez, G. Fraire-Vasquez, B. Hernandez-Velasco, F. Holguin-Melendez, J. Cueto-Moreno : INIFAP CE Rosario Izapa, km 18 carretera Cacahotan, Tapachula, 30700 Chiapas, BP 96, Mexique.  
D. Cruzillat : Centre de recherche Nestlé-Tours, 101, avenue Gustave-Eiffel, Notre-Dame-d'Oe, BP 9716, 37097 Tours cedex, France.

Tirés à part : O. Lopez-Baez

Originaire de l'Amérique tropicale, le cacaoyer *Theobroma cacao* L. est un arbre dont les graines fournissent le produit alimentaire consommé sous le nom de chocolat. De plus, le beurre contenu dans les fèves a des applications dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique. Le cacaoyer est un produit important du commerce mondial, avec un rôle très important dans l'économie de près de 45 pays.

Au Mexique, la superficie plantée est de 90 000 hectares avec une production annuelle de 41 000 tonnes de fèves. Les rendements moyens de cacao marchand par hectare restent très faibles : 300-400 kg car la production cacaoyère est affectée par trois grandes contraintes : la maladie de la « pourriture brune » causée par *Phytophthora palmivora*, la culture de variétés de bas potentiel productif et l'âge des plantations, dont environ 80 % ont plus de 40 ans.



L'Institut national des recherches agronomiques et forestières (INIFAP) du Mexique développe un programme de recherche à la station de Rosario Izapa, en Tapachula, Chiapas, avec pour objectifs l'augmentation du rendement, l'amélioration de la résistance aux maladies et la qualité des fèves.

## Stratégie d'amélioration génétique

La stratégie d'amélioration et de sélection appliquée chez le cacaoier est schématisée dans la figure. Elle est fondée sur la création de descendances F1 ou « hybrides de clones », suivie de la sélection individuelle des meilleurs arbres pour la formation de clones qui sont évalués dans des essais clonaux. Ce schéma comporte l'établissement d'une collection et son étude, l'hybridation et l'évaluation des descendances interclonales, la sélection clonale et la propagation végétative des meilleurs clones.

## État actuel des travaux et résultats

### Le germoplasme et son étude

La collection de germoplasmes du cacaoier de l'INIFAP comporte 175 clones venant de neuf pays d'Amérique. Elle est conservée sous forme de collection vivante dont les individus sont multipliés par bouturage.

L'étude de cette collection comprend :  
 – la description des caractères de la cabosse et de la fève [1, 2] ;  
 – l'analyse RFLP de l'ADN nucléaire [3, 4] ;  
 – la réaction de sensibilité à *Phytophthora palmivora* [5]. La caractérisation botanique a débuté en 1994 [6]. Les caractères de la cabosse et de la fève, obtenus sur 105 clones et présentés dans le tableau 1, sont indicatifs d'une forte variabilité.

Une comparaison des clones fondée sur leur origine indique que les clones mexicains présentent, en général, des cabosses et des fèves de valeur supérieure à celle de la plupart des clones importés.

L'analyse RFLP du germoplasme a commencé en 1996 avec l'ADN génomique de feuilles fraîches. Pour l'hybridation, 5 pico-

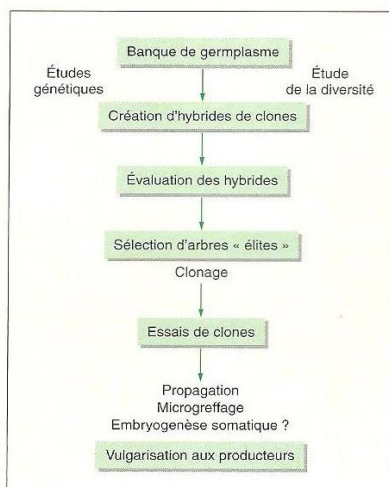


Figure. Stratégie d'amélioration génétique et sélection du cacaoier au Mexique.

Figure. Genetic improvement and breeding strategy for cocoa in Mexico.

grammes de chaque échantillon ont été digérés par l'enzyme de restriction Hind III. Sur 30 sondes RFLP, appliquées sur 124 clones, 29 d'entre elles (97 %) permettent de distinguer le polymorphisme présent dans ce groupe, en générant 56 bandes polymorphes permettant de différencier 77 des 124 génotypes étudiés.

Les génotypes restants (47) sont séparés en 6 groupes dont chacun comporte un certain nombre de clones où il n'a pas été possible

d'établir de différences au niveau des génotypes.

L'intégration des données botaniques et moléculaires dans une analyse, encore incomplète, de l'ensemble des génotypes montre que les génotypes mexicains constituent (excepté certains clones prospectés dans la forêt Lacandona) une population à base génétique réduite et s'apparentant aux génotypes du Guatemala. Par ailleurs, des génotypes provenant du Brésil, d'Équateur, du Costa Rica et du Pérou apparaissent très divergents. Ces données suggèrent l'opportunité d'augmenter la diversité de la collection de germoplasmes de l'INIFAP par l'importation ainsi que par de nouvelles prospections en forêt et dans des anciennes plantations.

L'évaluation de la réaction du germoplasme à *Phytophthora palmivora* est réalisée par l'inoculation de fruits âgés de 3 mois, qui restent attachés à la plante. Le fruit est inoculé au centre, en deux points opposés, chaque point avec une goutte contenant environ 24 000 zoospores. Pour chaque clone un échantillon minimum de 15 fruits est utilisé. Les observations du taux de fruits infectés et du diamètre moyen de la tache de tissu nécrosé sont faites six jours après inoculation. En prenant le diamètre de la tache comme critère de sélection, un clone est considéré résistant lorsque cette valeur est inférieure à 2 cm.

Les résultats obtenus sur 60 clones indiquent que 38 présentent une réaction de résistance, car leur diamètre ne dépasse pas la valeur limite (tableau 2). Parmi les clones les plus résistants on peut signaler : SCA-6, EET-

Tableau 1

### Caractères de la cabosse et de la fève de 105 clones de la collection de l'INIFAP (Mexique, 1997)

Caractère	CV	Val. max.	Génotype	Val. min.	Génotype
<b>Cabosse</b>					
Poids	19,3	778,7	ICS-1	287,8	SCA-6
Longueur	14,3	24,7	RIM-13	12,3	SIAL-93
Diamètre	7,3	9,6	RIM-68 EET-94	6,5	SCA-6
<b>Fèves</b>					
Nombre par cabosse	13,4	44,8	IMC-67	22,1	Esm. Amar.
Poids frais	19,1	205,7	UF-11	74,9	SCA-6
Poids sec	21,3	1,76	UF-12	0,57	SCA-6
Teneur en coque	22,2	11,8	RIM-223	4,0	9-TAB-986

Val. max. : valeur maximale ; Val. min. : valeur minimale ; CV : coefficient de variation.

### Cocoa pod and bean descriptors for 105 clones of the INIFAP collection (Mexico, 1997)



Tableau 2

Clones de cacaoyer de la collection de l'INIFAP (Mexique) résistants à *P. palmivora*

Génotype	Diam. de lésion	Infection %	Génotype	Diam. de lésion	Infection %
SCA-6	0	0	ICS-1	0,91	100
9-TAB-986	0	0	RIM-24	1,01	61
CHUAO-120	0	0	PA-121	1,01	100
8-CHI-986	0	0	RIM-88	1,07	49
12-TAB-986	0	0	EET-59	1,64	100
SGU-85	0	0	STA CLARA-3	1,13	100
UF-705	0	0	RIM-228	0,81	100
CC-225	0	0	ESM.AMAR	1,02	100
EET-400	0,01	5	IQ-1	1,04	100
EET-95	0,02	10	SIAL-407	1,11	100
EET-48	0,03	9	EET-164	1,13	86
SPA-9	0,04	17	EET-399	1,60	25
SCA-12	0,08	5	NA-34	1,16	93
POUND-7	0,09	25	RIM-105	1,16	67
EET-376	0,03	51	CATIE-1000	1,80	95
RB-46	0,11	100	EET-94	1,79	100
RB-41	0,2	62	UF-296	1,22	100
PORCEL-3	0,42	100	UF-667	1,35	64
PA-13	1,67	67	PI-1963	1,76	100
PA-169	0,56	100	ICS-6	1,53	100
EET-164	0,71	86	PI2-1962	1,54	100
OC-77	1,92	100	SIAL-56	1,76	100
CC-210	1,74	100			

Cocoa clones of the INIFAP (Mexico) collection which are resistant to *P. palmivora*

400, 9-TAB-986, 12-TAB-986, CHUAO-120, 8-CHI-986, SPA-9, SCA-12, POUND-7, UF-705, EET-48 et CC-225.

## Évaluation et sélection d'hybrides interclonaux

La sélection générative (création et évaluation d'hybrides interclonaux) a débuté en 1984. Soixante-six croisements ont été testés à partir d'essais comparatifs installés entre 1984 et 1988.

Les essais d'hybrides sont implantés suivant un dispositif en randomisation totale mono-arbre. Contrairement aux essais d'hybrides, les essais de clones sont plantés suivant un dispositif en blocs au hasard dont

chaque unité est composée de 8 plantes. Les principaux résultats de cette étape apportent les informations sur la vigueur, la précocité en production, le rendement et la sensibilité au *Phytophthora*. On observe une forte vigueur hybride pour la croissance, la précocité et le rendement, plus de 48 % des hybrides testés étant supérieurs à l'*amelonado* régional cultivé par les paysans. Les hybrides les plus productifs sont généralement aussi les plus précoces, avec un début de production à partir de la deuxième année et une entrée en pleine production 5 ans après plantation, soit environ 3 ans avant les *amelonados* locaux. La production des meilleures familles se situe autour de 1,5 à 2 tonnes de cacao marchand. Les meilleures descendance ont été obtenues lorsque les clones importés POUND-7, SCA-6, EET-48, EET-59, CC-266 sont croisés aux clones mexicains RIM-2, RIM-23, RIM-48 et RIM-75.

Les meilleurs arbres sélectionnés à partir des premiers essais d'hybrides ont été clonés et mis en essai comparatif au champ depuis 1995 (tableau 3). Les 15 meilleures sélections parmi les plus productives sont : 8, 9, 12, 20, 21 et 24. Certaines ont des rendements qui sont supérieurs à 2 kg par arbre par an. Ce matériel végétal constitue la prochaine sortie variétale et pourra être mis à la disposition des planteurs d'ici à 3 ans.

Des études pour évaluer le comportement vis-à-vis du *Phytophthora* des clones sélectionnés sont en cours et des résultats préliminaires indiquent la présence de hauts niveaux de résistance au pathogène dans ces descendance. Par ailleurs, des parcs à bois des meilleures sélections sont mis au champ afin d'appuyer la multiplication végétative en masse.

## Cartographie des gènes d'intérêt agronomique

La mise en évidence d'une liaison entre un caractère et un marqueur ainsi que sa cartographie constituent l'étape préliminaire pour la mise en place d'une sélection assistée par marqueurs moléculaires. Cette stratégie d'association des marqueurs QTL à des caractères agronomiques a été déjà mise en place pour d'autres populations de cacaoyer. Sur cette base, une population ségrégeante de 500 plantes obtenues à partir du croisement entre le clone POUND-7 (péruvien, Forastero, auto-incompatible, fortement résistant au *Phytophthora*) et le clone RIM-76A (Criollo, mexicain, sensible au *Phytophthora*, autocompatible) a été établie au champ en 1996, en deux localités. Deux caractères agronomiques (diamètre du tronc et hauteur de la couronne) ont déjà été évalués 7 mois après la plantation ; l'analyse des QTL pour ces caractères commencera bientôt. Dans l'avenir, on envisage l'étude d'autres caractères d'intérêt agronomique tels que le rendement, le nombre d'ovules par ovaire, la réaction à *Phytophthora*, le poids des feves, le contenu de matière grasse, entre autres.

## Propagation des variétés améliorées

Pour la multiplication des meilleurs clones, une technique de propagation par microgreffage de plantule a été mise au point ; ce procédé est caractérisé comme suit :



Tableau 3

**Caractéristiques des arbres élités sélectionnés dans des familles d'hybrides de cacaoyer**

Génotype	N° de sélection	Rend. annuel (g)	Poids de fèves sèches (g)
CC-210 X RIM-23	1	1 256	0,86
CC-210 X RIM-75	4	612	0,96
CC-210 X RIM-75	5	1 228	1,12
SCA-6 X RIM-2	8	2 460	0,64
SCA-6 X RIM-2	9	2 504	1,04
POUND-7 X EET-48	12	3 744	0,97
POUND-7 X RIM-2	13	672	1,3
EET-59 X CC-266	16	1 980	1,12
POUND-7 X RIM-23	20	2 728	1,01
IMC-67 X RIM-23	21	2 652	1,00
SCA-6 X RIM-75	24	3 240	0,98
SCA-6 X RIM-75	25	1 088	0,88
SCA-6 X RIM-23	27	1 984	0,88
POUND-7 X RIM-75	30	1 032	1,22
POUND-7 X RIM-75	31	1 244	1,12

**Characteristics of elite cocoa trees selected from hybrid families**

– utilisation d'une plantule âgée de 10-15 jours comme porte-greffe ;  
 – utilisation de porte-greffes à génotypes compatibles avec les greffons ; après évaluation, les clones POUND-7, EET-48 ; SPA-9, EET-59, et CC-210 ont été retenus ;  
 – utilisation de la greffe en écusson dont le bourgeon déjà « démarré » a entre 1 et 2 mm de longueur.

Le succès de cette voie de propagation oscille entre 60 et 80 % et la reprise de la croissance du bourgeon est très rapide : 4 mois après le greffage, des plantes prêtes à être plantées au champ sont obtenues.

Un essai préliminaire d'adaptation pour la production en masse de plantes par cette méthode montre qu'un rendement mensuel moyen de 10 000 plantes est possible. À partir de résultats antérieurs portant sur l'induction d'embryogenèse somatique [7] à partir des explants de tissu maternel, des expériences en cours sont orientées vers l'adaptation de ce protocole aux génotypes sélectionnés par l'INIFAP. Des pièces florales de quatre génotypes ont été mises en culture en suivant un protocole d'induction-expression dans un milieu « MS » complété avec 2,4-D et kinétine à diverses concentrations. Les premiers résultats montrent

la formation de tissu à aptitude embryogène à partir de pétales et de staminodes dans un génotype. Les premiers embryons obtenus ont été transférés dans d'autres milieux afin de poursuivre leur germination et leur conversion en plantules *in vitro* ; jusqu'à présent leur développement semble être normal.

## Conclusion et perspectives

Les résultats obtenus apportent des progrès remarquables qui pourraient être utiles pour la revalorisation de la culture du cacaoyer dans les régions tropicales du Mexique.

La description morphologique complétée par les marqueurs moléculaires a révélé un polymorphisme très important et permet une bonne caractérisation de la majorité des clones étudiés.

La diversité observée dans la collection s'avère relativement élevée. Cette base génétique actuellement disponible, apparaît suffisante pour le développement d'un programme d'amélioration génétique fondé

sur l'obtention d'un effet hétérosis entre des génotypes éloignés génétiquement. L'estimation des distances génétiques entre les clones pourrait permettre d'obtenir des effets d'hétérosis en évitant de croiser des individus génétiquement trop proches.

En ce qui concerne l'hybridation, les descendances testées ont une vigueur et une précocité tout à fait remarquables ; leur première récolte intervient 2 ans après leurs plantations. Ils montrent un potentiel de rendement de 1,5 à 2 tonnes de cacao marchand à l'hectare, en conservant un haut niveau de résistance au *Phytophthora*, ce qui dépasse largement la production des cacaoyers cultivés traditionnellement dont les rendements oscillent entre 300 et 400 kg à l'hectare en plantation adulte. Ces clones améliorés pourraient bientôt être mis à la disposition des planteurs.

En outre, dans le cas du cacaoyer, plante pérenne, allogame, à long cycle, la sélection assistée par marqueurs moléculaires permet d'envisager un certain nombre d'applications. Une nouvelle voie de recherche en cours, intégrant l'utilisation des marqueurs QTL pour la résistance à *Phytophthora* et d'autres caractères agronomiques, devrait permettre d'associer des caractères intéressants avec des marqueurs et initier ainsi une sélection plus efficace.

Par ailleurs, les résultats obtenus sur la propagation par microgreffage et l'extrapolation du protocole d'induction d'embryogenèse somatique à partir de pièces florales sont très encourageants, car une application très importante du clonage soit par microgreffage, soit par embryogenèse somatique, serait la multiplication végétative d'arbres élités « F1 » sélectionnés parmi les produits de croisements contrôlés entre clones.

Une amélioration de la production peut être directement acquise par le clonage des meilleurs individus sélectionnés dans des familles d'hybrides ; cela conduirait à des variétés cultivées sous forme de populations où les combinaisons favorables manifestant le plus d'hétérosis seraient directement multipliées et exploitées.

Ainsi, le microgreffage et l'embryogenèse somatique peuvent engendrer des modifications fondamentales dans les stratégies de sélection et de multiplication du cacaoyer par une meilleure exploitation des possibilités offertes par le clonage, surtout pour les caractères de résistance aux maladies et de qualité des fèves.

De plus, la maîtrise de la régénération par embryogenèse somatique ouvre les voies à de nombreuses applications comme la transformation génétique, la création de variation somaclonale, l'hybridation somatique et la



mutagenèse induite, lesquelles constituent des opportunités importantes pour l'amélioration génétique du cacaoyer.

Les résultats obtenus établissent les bases de nombreuses études d'intérêt fondamental ou appliqué chez le cacaoyer à partir de l'amélioration, du déterminisme du contrôle génétique des caractères et de la régénération par embryogenèse somatique *in vitro* ■

## Références

1. López BO, Méndez WD. Características de la flor y la semilla del germoplasma de cacao *Theobroma*

*cacao* L. seleccionado en Rosario Izapa, Chiapas. *Agricultura Técnica en México* 1992 ; 18 : 39-48.

2. López BO, Mulato BJ, López AI. Recursos fitogenéticos del cacao *Theobroma cacao* L. disponibles en México. *Agricultura Técnica en México* 1992 ; 18 : 25-38.

3. Crouzillat D, Lerceteau E, Petiard V, et al. *Theobroma cacao* L. : a genetic linkage map and quantitative trait loci analysis. *Theor Appl Genet* 1996 ; 93 : 205-14.

4. Lerceteau E. *Diversité génétique, recherche de QTL et analyse des profils protéiques de fèves de Theobroma cacao L. pendant la fermentation. Conséquences sur la qualité.* Thèse de Docteur en Sciences de l'Université Paris-XI, Orsay, 1996 ; 257 p.

5. López BO, Fraire VG, Cueto MJ. Breeding for genetic resistance to *Phytophthora* disease in Mexico. In : *International workshop on the contribution of disease resistance to cocoa variety improvement*. INGENIC, 25-26 november, Salvador, Bahía, Brasil, 1996 (abstracts).

6. López BO. Características del fruto del germoplasma de cacao *Theobroma cacao* L. seleccionado en Rosario Izapa, Chiapas, México. *Agricultura Técnica en México* 1995 ; 21 : 127-37.

7. López BO. *Embryogenèse somatique et régénération de plantes de cacaoyer Theobroma cacao L. à partir de pièces florales.* Tesis de Docteur en Sciences de l'École Nationale Supérieure Agronomique de Rennes. Rennes, France, 1994 ; 137 p.

## Résumé

### Les biotechnologies appliquées à l'amélioration génétique et la propagation du cacaoyer au Mexique

O. LOPEZ-BAEZ, ET AL.

Le cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) est une espèce tropicale, pérenne, allogame, diploïde ( $2n = 20$ ). Au Mexique, la superficie plantée est de 90 000 hectares avec une production annuelle de 41 000 tonnes de fèves. Les principales contraintes de la production sont la « pourriture brune » causée par *Phytophthora palmivora*, la culture de variétés à faible rendement et l'âge des plantations. L'INIFAP du Mexique développe un programme d'amélioration et de propagation avec l'appui des biotechnologies végétales sur la base de la création d'hybrides F1 à partir de clones, suivie d'une sélection des meilleurs individus. La propagation par microgreffage sur plantules, l'embryogenèse somatique *in vitro* à partir d'explants de tissus maternels et l'étude de marqueurs moléculaires QTL (pour la résistance génétique à *Phytophthora* et pour ces caractères agronomiques) est également étudiée. L'évaluation de la diversité génétique de la collection de l'INIFAP est fondée sur la description botanique, l'analyse RFLP de l'ADN nucléaire et la sensibilité à *Phytophthora*. L'analyse RFLP sur 124 clones a montré qu'il est possible de différencier 77 d'entre eux sur les clones se séparant en 6 groupes. Sur 60 clones évalués, 38 ont montré une forte résistance génétique à *P. palmivora*, notamment : SCA6, EET95, SPA9, EET400, EET48, POUND7, SCA12, EET162, IMC67 et EET164. La sélection de génotypes supérieurs appliquée à des populations hybrides a permis d'obtenir 10 clones de haute valeur agronomique dont les rendements en cacao sec sont supérieurs à 2,5 kg/plante/an et présentant une forte résistance à *P. palmivora*. La technique d'induction d'embryogenèse somatique à partir d'explants de pièces florales doit fournir une large population pour permettre la détermination du contrôle génétique de la résistance à *P. palmivora* et l'analyse de marqueurs QTL pour les gènes de cette résistance et pour divers caractères agronomiques. Une plantation de 500 plantes de l'hybride POUND7x RIM76A a été établie en 1996 dans le cadre du programme gouvernemental de récupération de la « cacaoculture » Mexicaine.

## Summary

### Biotechnologies and cocoa genetic improvement in Mexico

O. LOPEZ-BAEZ, ET AL.

*Cocoa* (*Theobroma cacao* L.) is a tropical, diploid ( $2n = 20$ ) outbreeding plant. In Mexico, 90,000 ha are cropped with cocoa, yielding 41,000 t/year of dried beans. Cocoa trees on most Mexican plantations are over 40 years old, and yields are thus declining to uneconomic levels. Apart from the age factor, the drop in yield could also be attributed to low genetic potential planting material, problems of black pod disease caused by *Phytophthora* sp., and prolonged inadequate cultural practices. The Mexican Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP) has developed a breeding and plant propagation research programme using new biotechnology tools. The breeding plan (Figure 1) is based on creation of hybrid segregation populations followed by single selection of elite trees that are propagated vegetatively and evaluated in field conditions. The basic cocoa breeding plan involves the following steps:

- studies on the germplasm collection,
- crossing of parents (clones) by artificial pollination,
- progeny trials for evaluation of hybrid families and selection of the best trees within families,
- clone trials,
- dissemination of selected clones to farmers.

In addition, trials involving *in vitro* propagation by somatic embryogenesis from maternal tissue and genetic studies based on QTL markers for genetic resistance to *Phytophthora* and agronomic characters are under way.

The INIFAP germplasm collection includes 175 clones, i.e. the population from which parent stock is selected. This population includes Mexican "local farmers" cocoa selections and imported genotypes from eight Latin American countries. The cocoa genebank is maintained within the clonal field collection.

Genetic diversity is currently being investigated (Table 1) on the basis of agronomic value, morphological descriptors and RFLP analysis. The results of morphological and molecular analysis of 124 clones differentiated 62% of the INIFAP collection (77 different genotypes). The remaining clones were classified in six groups. There is very little variability in Mexican cocoa germplasm.

Concerning genetic resistance to *Phytophthora*, screening tests involve artificial inoculation of pods attached to trees under field conditions. An assessment of 60 clones (Table 2) indicated that clones SCA-6, EET-95, SPA-9, EET-400, EET-48, POUND-7, SCA-12, EET-162, IMC-67 and EET-164 are the most resistant. Within the framework of a programme for the evaluation and selection of hybrid materials initiated in 1984, the results of an assessment of 66 hybrid families suggest strong hybrid vigor for initial growth, development, earliness and yield. The best hybrid combinations have been obtained by crossing Forastero clones POUND-7, SCA-6, EET-48, EET-59 and CC-266 with Mexican clones RIM-2, RIM-23, RIM-48 and RIM-75. Fifteen promising clones have been selected (Table 3) and evaluated in field conditions, and the results revealed superior yield and high commercial quality. Two techniques have been investigated for the vegetative multiplication of selected genotypes. In the first, we attempted to micrograft a patch budding to young seedling rootstocks at the nursery stage. The best results were obtained using 2 week-old rootstocks. A 40-60% success rate has been obtained with micrografting, i.e. better than with conventional grafting on mature rootstock. Further research is under way to improve this technique for its potential transfer to cocoa producers. The second technique involves the induction of somatic embryogenesis from somatic tissue. A successful procedure has been developed for cocoa regeneration by somatic embryogenesis induced from flower parts. Excised petals, staminodes and anther threads are cultivated *in vitro*, and an embryogenic calluses appears after 6-8 weeks of culture. Somatic embryos at the end of the globular stage are transferred for potential maturation and germination. Plants capable of adapting to *ex vitro* conditions can be obtained by this technique. Research is presently focused on improving the embryo-to-plant conversion rate, embryo production in liquid media and evaluation of regenerated plants in field conditions. The results of this programme, which represents one of the first successful attempts to integrate new biotechnological tools with conventional cocoa breeding, are promising for future applications for genetic improvement and vegetative multiplication of *Theobroma cacao*.

Cahiers Agricultures 1998 ; 7 : 487-91.

## Biotechnologies and cocoa genetic improvement in Mexico

**Author(s):** Orlando Lopez-Baez, Guillermo Fraire-Vazquez, Blanca Hernandez-Velasco, Francisco Holguin-Melendez, Jaime Cueto-Moreno, Dominique Crouzillat

**Page(s) :** 487

**Published in:** 1999

Cocoa (*Theobroma cacao* L.) is a tropical, diploid ( $2n = 20$ ) outbreeding plant. In Mexico, 90,000 ha are cropped with cocoa, yielding 41,000 t/year of dried beans. Cocoa trees on most Mexican plantations are over 40 years old, and yields are thus declining to uneconomic levels. Apart from the age factor, the drop in yield could also be attributed to low genetic potential planting material, problems of black pod disease caused by *Phytophthora* sp., and prolonged inadequate cultural practices. The Mexican Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP) has developed a breeding and plant propagation research programme using new biotechnology tools. The breeding plan is based on creation of hybrid segregation populations followed by single selection of elite trees that are propagated vegetatively and evaluated in field conditions. The basic cocoa breeding plan involves the following steps: studies on the germplasm collection, crossing of parents (clones) by artificial pollination, progeny trials for evaluation of hybrid families and selection of the best trees within families, clone trials, dissemination of selected clones to farmers. In addition, trials involving *in vitro* propagation by somatic embryogenesis from maternal tissue and genetic studies based on QTL markers for genetic resistance to *Phytophthora* and agronomic characters are under way. The INIFAP germplasm collection includes 175 clones, i.e. the population from which parent stock is selected. This population includes Mexican "local farmers' cocoa selections" and imported genotypes from eight Latin American countries. The cocoa genebank is maintained within the clonal field collection. Genetic diversity is currently being investigated on the basis of agronomic value, morphological descriptors and RFLP analysis. The results of morphological and molecular analysis of 124 clones differentiated 62% of the INIFAP collection (77 different genotypes). The remaining clones were classified in six groups. There is very little variability in Mexican cocoa germplasm. Concerning genetic resistance to *Phytophthora*, screening tests involve artificial inoculation of pods attached to trees under field conditions. An assessment of 60 clones indicated that clones SCA-6, EET-95, SPA-9, EET-400, EET-48, POUND-7, SCA-12, EET-162, IMC-67 and EET-164 are the most resistant. Within the framework of a programme for the evaluation and selection of hybrid materials initiated in 1984, the results of an assessment of 66 hybrid families suggest strong hybrid vigor for initial growth, development, earliness and yield. The best hybrid combinations have been obtained by crossing Forastero clones POUND-7, SCA-6, EET-48, EET-59 and CC-266 with Mexican clones RIM-2, RIM-23, RIM-48 and RIM-75. Fifteen promising clones have been selected and evaluated in field conditions, and the results revealed superior yield and high commercial quality. Two techniques have been investigated for the vegetative multiplication of selected genotypes. In the first, we attempted to micrograft a patch budding to young seedling rootstocks at the nursery stage. The best results were obtained using 2 week-old rootstocks. A 40-60% success rate has been obtained with micrografting, i.e. better than with conventional grafting on mature rootstock. Further research is under way to improve this technique for its potential transfer to cocoa producers. The second technique involves the induction of somatic embryogenesis from somatic tissue. A successful procedure has been developed for cocoa regeneration by somatic embryogenesis induced from flower parts. Excised petals, staminodes and anther threads are cultivated *in vitro*, and an embryogenic callus appears after 6-8 weeks of culture. Somatic embryos at the end of the globular stage are transferred for potential maturation and germination. Plants capable of adapting to *ex vitro* conditions can be obtained by this technique. Research is presently focused on improving the embryo-to-plant conversion rate, embryo production in liquid media and evaluation of regenerated plants in field conditions. The results of this programme, which represents one of the first successful attempts to integrate new

biotechnological tools with conventional cocoa breeding, are promising for future applications for genetic improvement and vegetative multiplication of *Theobroma cacao*.