

La fécondation artificielle du cocotier

M. de NUCÉ de LAMOTHE (1), W. WUIDART (2), F. ROGNON (2) et A. SANGARÉ (2)

Résumé. — Les auteurs décrivent la méthode de fécondation artificielle du cocotier utilisée par les chercheurs de l'I. R. H. O. : récolte, conditionnement et stockage du pollen, isolement des inflorescences, pollinisation, récolte des noix. Cette méthode, qui ne cesse de se perfectionner, est basée sur les résultats de nombreux essais et sur la réalisation de plus de 100 000 fécondations artificielles. Le but de l'article n'est pas seulement de présenter un manuel pratique d'instructions à suivre, mais d'expliquer et de justifier les choix qui ont été faits (matériel et techniques). Les précautions prises et les contrôles de qualité peuvent paraître excessifs mais, comme le soulignent les auteurs dans leur conclusion, l'expérience a amplement prouvé, à l'I. R. H. O. comme sur d'autres centres de recherche, que les pourcentages d'illégitimes s'élèvent rapidement dès que les techniques deviennent moins strictes. La présence dans une population d'un nombre, même très faible, d'illégitimes non identifiés peut avoir de fâcheuses conséquences pour la poursuite des travaux de recherche si les caractères de production de ces illégitimes amènent à les sélectionner comme géniteurs.

Note préliminaire

Depuis l'article de C. E. Briolle paru en 1964 [1] dans *Oléagineux*, il n'a rien été publié sur la technique de fécondation artificielle du cocotier utilisée à l'I. R. H. O., bien que celle-ci ait beaucoup évolué. Un document interne, intitulé « Instructions générales Fécondation Artificielle », périodiquement revu pour tenir compte de l'évolution des méthodes, a cependant eu une certaine diffusion auprès des stagiaires et des visiteurs des Stations de Côte-d'Ivoire et des Nouvelles-Hébrides. Il a d'ailleurs servi de base à plusieurs publications, qui ont ainsi contribué à l'application des résultats de nos travaux [2, 3].

Des discussions récentes sur la valeur des différentes méthodes d'isolement de l'inflorescence ou de la fleur du cocotier nous ont convaincus de la nécessité de faire mieux connaître les techniques mises au point et conseillées par l'I. R. H. O.

Le but du présent article n'est pas seulement de présenter un manuel pratique d'instructions à suivre mais d'expliquer et de justifier les choix qui ont été faits.

I. — INTRODUCTION

L'amélioration du cocotier comporte la mise en place de tests d'aptitude à la combinaison entre souches ou individus choisis sur la valeur phénotypique des caractères héréditaires [4]. Plus généralement, il faut réaliser des croisements entre deux parents dont il est indispensable de connaître l'identité exacte. Celle du parent mâle ne peut être garantie que par la fécondation artificielle. La méthode consiste à apporter, sur les fleurs femelles de l'arbre-mère, au moment de leur réceptivité, le pollen récolté à cet effet sur le géniteur mâle. Les diverses opérations se déroulent en milieu isolé pour éviter une fécondation accidentelle par un autre pollen.

La réalisation pratique est difficile, elle nécessite un matériel et des méthodes qui assurent un isolement parfait et qui évitent les erreurs d'identité, sans trop nuire au rendement en semences ; elle exige aussi un personnel spécialisé de valeur et une organisation qui, en multipliant les contrôles de qualité, garantisse la permanence des efforts. L'utilisation d'un mauvais matériel, de méthodes inadaptées ou tout simplement un relâchement dans les contrôles sont les causes les plus fréquentes de mauvais résultats. Lorsqu'on ne veut pas admettre que ce genre d'erreur a pu se pro-

duire, les conséquences d'une mauvaise technique de fécondation artificielle peuvent être graves ; on a vu un pays renoncer à la production de semences hybrides parce qu'on y attribuait l'obtention d'illégitimes à un caractère hybride du Grand utilisé, au lieu de reconnaître une erreur de technique.

Avant de décrire les diverses opérations il paraît utile de faire un bref rappel de la biologie florale.

II. — BIOLOGIE FLORALE

Le cocotier est une plante monoïque. La durée et le recouvrement des phases mâle et femelle de l'inflorescence ont été décrits par Sangaré *et al.* dans un récent article [5]. On ne rappellera ici que les aspects qui influent le plus sur le déroulement des opérations de fécondation.

Deux caractéristiques déterminent la date à laquelle il faut isoler l'inflorescence :

— la durée de survie, à l'intérieur du sac d'isolement, d'un grain de pollen mûr (cas d'un pollen étranger présent sur l'inflorescence au moment de l'ensachage). Elle peut être estimée à 8 jours d'après les résultats d'un essai réalisé en Côte-d'Ivoire sur des mélanges de grains de pollens à des stades divers de maturité. La pose de sac doit donc avoir lieu 8 jours au minimum avant le début de la phase femelle (fécondation) ou de la récolte des épillets (obtention du pollen).

(1) Directeur du Département Sélection Cocotier de l'I. R. H. O., Station Marc-Delorme, 07, B. P. 13, Abidjan 07 (Côte-d'Ivoire).

(2) Service Sélection de l'I. R. H. O., Station Marc-Delorme, Abidjan (Côte-d'Ivoire).

— *l'intervalle : ouverture de la spathe — début de réceptivité des fleurs femelles.* Il est de 22 à 24 jours pour les cocotiers Grands (types I et II de Sangaré), de 16 à 21 jours pour les hybrides Nains × Grands et certains Nains Verts (type IV) ; et de 2 à 7 jours pour les autres Nains (type III). Il peut être nul à certaines saisons et sur certains arbres.

Sur Nains, la pose du sac devra donc se faire avant la date présumée d'ouverture naturelle de l'inflorescence.

Le moment et la fréquence des apports de pollen dépendent :

— *de la durée de réceptivité d'une fleur femelle.*

Les observations réalisées en Côte-d'Ivoire montrent qu'elle est de 2,5 à 3 jours pour les cocotiers Grands et de 1,5 à 2 jours pour les Nains.

Un seul apport de pollen permet d'assurer la pollinisation de toutes les fleurs pendant 5 à 6 jours de phase femelle sur Grands et pendant 3 à 4 jours sur Nains ;

— *de la longueur de la phase femelle.* — On distingue : les cocotiers à phase femelle longue (supérieure à 13 jours), ce sont tous des Nains, type III de Sangaré, et les cocotiers à phase femelle courte (inférieure à 7 jours), c'est le cas des Grands et de certains Nains Verts, types I, II et IV. Les croisements entre ces 2 catégories se comportent généralement comme des Grands.

L'inflorescence de Nain devra donc être pollinisée plusieurs fois.

III. — LE MATÉRIEL

Le choix du matériel conditionne la valeur de la technique. Il doit permettre d'assurer la récolte, le conditionnement et le stockage d'un pollen pur de bonne viabilité, d'éviter, à tous les stades, une contamination par des pollens indésirables, et de récolter un bon nombre de semences légitimes. Les travaux de Whitehead à la Jamaïque [6], sur la préparation et le conditionnement du pollen, ont aidé au choix du matériel mais ce sont les recherches réalisées sur les Stations palmier à huile et cocotier de l'I. R. H. O. qui y ont le plus contribué.

1. — Sac d'isolement.

Le matériau.

Plusieurs années ont été nécessaires pour trouver un sac assurant un parfait isolement de l'inflorescence tout en maintenant un rendement en fruit acceptable. De nombreux matériaux (papier, terylène, toiles de différentes qualités) ont été testés sur inflorescences de palmiers à huile à La Mé en Côte-d'Ivoire.

Ces essais ont abouti au choix d'une toile verte « Dickson CD 72 » à mailles fines, perméable à l'air, imperméable au pollen et à l'eau. Ce même type de matériau a été adopté pour le cocotier après une série de tests prouvant qu'il n'empêchait pas d'obtenir un bon nombre de noix par régime : 6,1 noix/régime en moyenne sur 681 régimes de Nain Rouge Malaisie récoltés en 1978 et pas d'illégitimes.

Le fait que ce matériau ait été testé sur palmier à

huile est une garantie de qualité. En effet un grain de pollen étranger introduit accidentellement à l'intérieur d'un sac d'isolement (mauvaise qualité du matériau par exemple) aura beaucoup plus de chance de féconder une des 1 000 à 3 000 fleurs femelles du régime de palmier à huile qu'une des 20 à 30 fleurs femelles de l'inflorescence de cocotier. Il donnera un illégitime que l'on repérera facilement si aucun autre pollen n'a été volontairement introduit dans le sac (fécondation à blanc).

D'autres matériaux ont été recommandés dans certains pays, ainsi le polythène à Sri Lanka vers 1960 [7] ; mais les trous d'épingle que l'on devait faire pour faciliter la circulation d'air étaient probablement d'un diamètre suffisant pour laisser entrer des grains de pollen indésirables. A la Jamaïque, Harries [8] a utilisé de la mousse de polyuréthane pour isoler individuellement chaque fleur mais ce produit ne peut convenir pour isoler une inflorescence entière.

Le sac.

Le sac mesure 60 cm de large sur 90 cm de long ; il comprend deux fenêtres transparentes en rexon soudées au tissu, une sur chaque face, pour suivre l'évolution des fleurs. Les coutures sont doublées.

Le sac pour la récolte du pollen se différencie du sac utilisé pour la fécondation par la présence sur le côté droit d'une manche permettant le passage du bras et, sous l'une des fenêtres, d'un manchon auquel on fixe un sac en plastique de 20/100 destiné à recevoir les épillets (Fig. 1 A, B).

2. — Casier d'isolement.

Les manipulations de pollen s'opèrent à l'abri de toute contamination par des pollens étrangers dans des casiers d'isolement.

Ces casiers, fabriqués en tôle d'aluminium, mesurent 60 cm de long × 60 cm de large et 30 cm de haut. Ils sont équipés sur le plateau supérieur d'une fenêtre en verre trempé de 20 × 40 cm, et sur un côté d'une porte à fermeture étanche comprenant deux manches (∅ intérieur : 17 cm) permettant le passage des mains pour effectuer les différentes manipulations (Fig. 2, 3).

Avant d'être utilisé le casier est désinfecté par chauffage : deux lampes à infrarouges de 1 000 W chacune portent rapidement la température du casier à 150 °C ; cette température est maintenue pendant 15 mn, on attend ensuite qu'il refroidisse (environ 30 mn) pour l'utiliser.

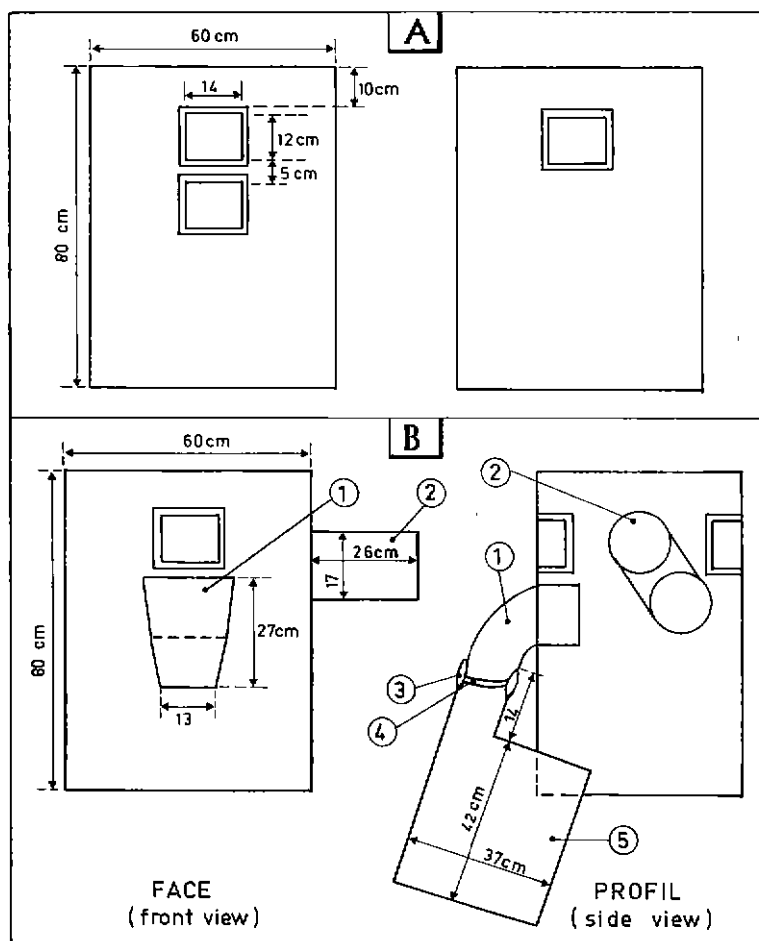
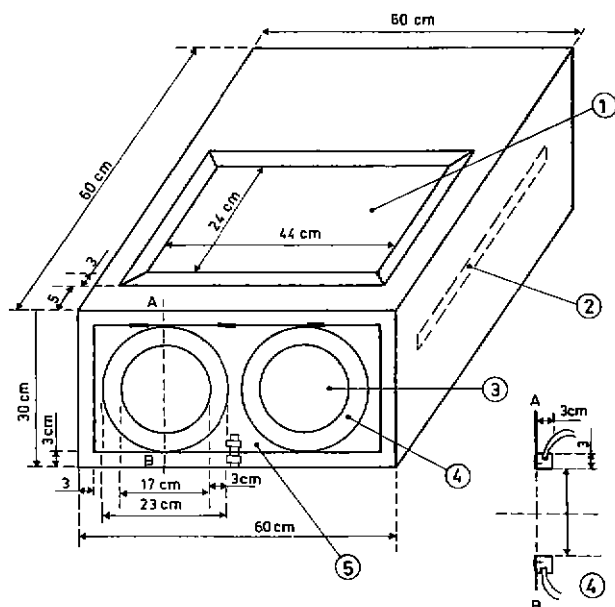
3. — Etuve.

Le passage des fleurs mâles à l'étuve a pour but de les sécher de façon à faciliter l'obtention du pollen par tamisage et à réduire l'humidité de ce pollen à un taux assurant une bonne conservation.

A la suite des travaux de Whitehead [6] on sait que pour ne pas léser les grains de pollen, le séchage doit être pratiqué à une température ne dépassant pas 40 °C.

Le choix de l'étuve se fera donc sur les critères suivants :

— volume suffisant pour sécher tous les pollens d'une journée de récolte,

FIG. 1. — Sacs d'isolement (*Isolation bags*) :A : sac d'isolement des fleurs femelles (*Isolation bag for female flowers*),B : sac d'isolement pour la récolte du pollen (*Isolation bag for pollen collection*),(1) manchon (*sleeve*),(2) manche (*armhole*),(3) (4) tube rigide et bague de serrage (*rigid tube and clamp*),(5) sac de plastique (*plastic bag*).FIG. 2, 3. — Casiers d'isolement (*Isolation boxes*) :
Matériaux : tôle d'aluminium 2 mm, fenêtre en verre trempé (*Materials : aluminium sheet 2 mm, tempered glass window*),(1) fenêtre (*window*),(2) lampe à infrarouges (*infra-red lamp*),(3) ouverture (*opening*),(4) cadre en bois pour recevoir les manches (*wood frame for sleeves*),(5) porte (*door*).

— température très proche de 40 °C, mais ne dépassant pas cette valeur,

— ventilation forcée pour accélérer le séchage.

Sur la Station cocotier Marc-Delorme à Port-Bouët, où l'on prépare 12 000 unités de pollen (0,25 g) par an, l'étuve utilisée a un volume de 200 l.

4. — Appareil de mise sous vide.

Après séchage, le pollen est placé en ampoules sous



vide poussé. Comme Whitehead, on utilise un appareil « Speedivac » type 5PS fabriqué par Edwards High Vacuum.

Cet appareil est constitué d'une pompe à vide type EC 2406, d'un piège à eau et d'une rampe permettant de traiter 48 ampoules à la fois. Les ampoules sont pré-étirées à l'aide d'un chalumeau avant d'être placées sur la rampe puis, lorsque le vide est établi, scellées au niveau de l'étreitement. Le vide est contrôlé dans les ampoules à l'aide d'un contrôleur à haute fréquence Edwards, modèle T2.

Cet appareillage donne toute satisfaction et le traitement n'affecte nullement la viabilité du pollen. Pour des raisons de contrôle d'identité on envisage cependant d'utiliser des flacons au lieu d'ampoules et une simple pompe à vide au lieu du Speedivac, comme décrit dans *Oléagineux* par Rognon [9] et Bénard [10]. Un essai comparant les 2 méthodes est actuellement en cours.

5. — Congélateur.

La conservation au froid permet de maintenir la viabilité du pollen à son niveau initial pendant au moins 6 mois [Rognon, 11].

Les ampoules contenant le pollen sont placées dans un congélateur à -20°C . Le volume de celui-ci dépend des quantités de pollens stockées.

6. — Autres matériels.

La pratique de la fécondation artificielle nécessite d'autres matériels, en particulier :

- des échelles en alliage léger. Elles facilitent le travail du fécondateur et permettent des contrôles réguliers par les surveillants et les cadres. Sans ces contrôles la qualité du travail décroît très vite. L'utilisation d'un arbre est donc liée à la possibilité de se procurer une échelle d'un poids raisonnable qui permette, sans risque exagéré, d'atteindre la couronne. A partir d'une certaine taille (15 m) les arbres ne sont plus utilisés comme géniteur à l'I. R. H. O. ;

- une petite étuve à 105°C pour déterminer la teneur en eau du pollen ;

- une balance de précision, un microscope et du petit matériel de laboratoire pour les tests de viabilité du pollen ;

- un appareil dymo pour imprimer sur ruban d'aluminium ;

- des pissettes en polyéthylène pour la pollinisation ;

- des sécateurs.

IV. — LA RÉCOLTE DU POLLEN

La récolte du pollen comprend quatre opérations successives : isolement de l'inflorescence, récolte des épillets mâles et identification, préparation et conditionnement du pollen, et contrôle de qualité : humidité et viabilité.

1. — Isolement de l'inflorescence.

L'isolement de l'inflorescence pour la récolte du pollen n'est pas souvent pratiqué ailleurs. Beaucoup considèrent en effet que les contaminations par des pollens étrangers sont négligeables en regard de la quantité de pollen obtenue. Nous ne partageons pas cet avis et considérons que l'isolement de l'inflorescence est utile car des phénomènes de compétition pollinique peuvent intervenir pour favoriser tel ou tel pollen contaminant.

L'ensachage réduit considérablement la durée de la phase mâle. Sur cocotiers Grands, 10 jours après l'ouverture de la spathe, et sur Nains, 8 jours après cette ouverture la plupart des fleurs mâles d'une inflorescence ensachée sont tombées. Selon le type de cocotier et les quantités de pollen nécessaires on récolte les épillets de 5 à 8 jours après l'ouverture de la spathe et, si l'on veut respecter la période de 8 jours d'isolement on doit poser le sac de 0 à 3 jours avant la date présumée d'ouverture naturelle de la spathe. Dans la pratique il arrive que la durée d'ensachage soit seulement de 6 à 7 jours mais comme il s'écoule encore 24 h avant que le pollen ne soit conditionné on peut

considérer les risques de contaminations comme réellement négligeables.

Après avoir coupé les 2 spathe de l'inflorescence on met le sac en place. Sa partie inférieure est fermée autour de la base du pédoncule qui a été préalablement entouré d'un tampon de kapok imprégné d'insecticide afin d'éviter la pénétration des insectes.

2. — Récolte des épillets et identification.

La récolte des épillets s'effectue donc de 6 à 8 jours après l'ensachage. Le récolteur suit à travers les fenêtres l'évolution de la maturité et détermine la date exacte de récolte. Pour prélever les épillets, il introduit le bras armé d'un sécateur dans la manche du sac. Main, bras et sécateur sont préalablement désinfectés à l'alcool. Les épillets ayant au moins 20 p. 100 de fleurs mâles ouvertes sont sectionnés et placés dans le sachet en plastique fixé au sac. Le sachet est fermé et amené au laboratoire, le sac est enlevé. Le numéro de géniteur et le matricule de l'arbre sont inscrits au moment de la pose du sac sur le plastique du sachet et sur des étiquettes placées à l'intérieur de celui-ci. Immédiatement après la récolte on inscrit également la date de récolte sur le plastique du sachet (Fig. 4).



FIG. 4. — Récolte des épillets mâles (*Harvest of male spikelets*).

3. — Préparation du pollen.

On ne récolte que de très petites quantités de pollen en secouant une inflorescence de cocotier ou en tamisant des fleurs écrasées, celles-ci sont trop humides. Il est indispensable de procéder à un séchage préalable des fleurs mâles écrasées. On peut obtenir alors 8 à 10 g, voire 15 g, de pollen par inflorescence.

Mais quel que soit le jour de la récolte une proportion importante de fleurs mâles est immature et donne du pollen non viable. Cela explique les pourcentages de viabilité relativement faibles dont il sera question plus loin.

Dans les conditions naturelles la durée de vie du pollen frais est réduite à quelques jours. Il est donc indispensable de lui faire subir un certain nombre de traitements si l'on veut augmenter cette période de conservation pour réaliser des programmes de fécondation artificielle. Actuellement la technique donnant les meilleurs résultats consiste à conserver au congélateur à -20°C le pollen déshydraté (5 p. 100 d'eau) et conditionné sous vide poussé.

Les différentes opérations de préparation sont les suivantes : égrappage des fleurs mâles, écrasage, séchage à l'étuve, tamisage et mise en ampoule, mise sous vide et scellement, et stockage.

Toutes les manipulations ont lieu en laboratoire dans un casier d'isolement préalablement désinfecté et contenant le matériel nécessaire (tamis, ampoule, sac en papier, etc...). Les matériels ne supportant pas la stérilisation à température élevée sont placés propres dans des sachets en plastique étanches et utilisés 10 jours plus tard. Ces sachets sont nettoyés à l'alcool avant d'être introduits dans le casier. Le manipulateur se lave les mains à l'alcool avant toute intervention.

Egrappage. — Après avoir été désinfecté à l'alcool, le sachet contenant les épillets est introduit par une des manches et les épillets transvasés dans le casier d'isolement où les fleurs mâles sont détachées. Ces fleurs sont ensuite placées dans des sacs en papier avec les étiquettes d'identification. Ces sacs sont fermés puis sortis du casier. On y a inscrit l'identité du pollen et la date de récolte.

Ecrasement. — Le sac en papier contenant les fleurs mâles est placé dans un sac en toile qui le protégera lors de l'opération d'écrasement. Un simple écrasement au rouleau est alors pratiqué pour ouvrir les fleurs mâles et favoriser le séchage.

Séchage. — Les sacs en toile sont mis dans l'étuve, réglée à 40 °C pendant 20 h. Ce séchage amène le pollen à une humidité d'environ 5 p. 100.

Tamisage et mise en ampoule. — Après séchage, le sac en papier est introduit dans un casier d'isolement. Les fleurs mâles sont alors passées au tamis pour en extraire le pollen. Celui-ci est réparti dans des ampoules, par unité d'environ 0,25 g, correspondant à la dose nécessaire pour une pollinisation. Dans chaque ampoule on place le pollen, un coton stérilisé, une étiquette en papier avec l'identification du pollen et la date de récolte, et à nouveau un coton stérile.

Mise sous vide. — Les ampoules remplies sont pré-étirées au chalumeau puis mises sur les têtes de la rampe du « Speedivac ». 5 mn après l'installation du vide, à 0,06 mm de mercure, les ampoules sont scellées au niveau de l'étranglement.

Stockage du pollen. — Le pollen conditionné dans son ampoule est conservé au congélateur à — 20 °C pendant une durée qui peut atteindre 6 mois [Rognon, 11]. Au-delà de ce temps, il est recommandé de tester sa viabilité avant utilisation. A l'I. R. H. O. les pollens sont généralement utilisés avant 3 mois de stockage.

4. — Contrôle de qualité, viabilité et humidité.

Sur chaque lot du pollen préparé on prélève une ampoule pour les contrôles de viabilité et d'humidité. Si les résultats ne sont pas bons, une 2^e ampoule est testée et, en cas de confirmation, l'ensemble du lot est éliminé.

Le pouvoir germinatif du pollen est observé sur un milieu d'agar-agar (1,2 p. 100) et de sucre (11 p. 100) après avoir activé sa germination en l'exposant pendant 2 heures à 35 °C.

Le comptage des grains germés et non germés se fait

avec un microscope en observant plusieurs champs pris au hasard et en comptant au moins une centaine de grains.

Le pourcentage d'humidité est calculé par pesée du poids frais et du poids sec après un passage de 24 h à l'étuve à 105 °C.

Le vide est testé avec un appareil à haute fréquence. Les normes de qualité sont :

- pourcentage de germination \geq 35,
- pourcentage d'humidité : entre 4 et 8.

On peut observer des variations de la viabilité avec la méthode de test et les produits utilisés. Mais elles sont limitées et des viabilités supérieures à 50 sont extrêmement rares (moyenne à Port-Bouët : 42). Elles ne peuvent être obtenues que sur de très petites quantités de pollen frais.

V. — FÉCONDATION

On distingue diverses opérations : émasculature et pose du sac d'isolement, pollinisation, enlèvement du sac, et contrôle de nouaison.

1. — Émasculature et pose du sac d'isolement.

Pour être certain qu'il n'y a pas fécondation par du pollen étranger déposé sur l'inflorescence avant l'ensachage, il faut que celui-ci ait lieu au moins 8 jours avant le début de réceptivité de la 1^{re} fleur femelle ; dans la pratique on retient 14 jours avant la fécondation. Les dates d'émasculature et de pose de sac dépendent donc de l'intervalle ouverture de la spathe-réceptivité de la 1^{re} fleur femelle. Chez les cocotiers des types I et II où cet intervalle est de 22 à 24 jours, l'émasculature a lieu 5 jours après l'ouverture de la spathe, et la pose de sac 3 jours plus tard.

Chez les Nains du type III qui peuvent avoir des fleurs femelles réceptives dès l'ouverture de la spathe, la pose du sac et l'émasculature sont faites 48 h avant la date présumée d'ouverture naturelle (une émasculature plus précoce ne pourrait se faire sans dommage). L'estimation de cette date est aisée pour un personnel entraîné. L'inflorescence de Nain a, ainsi, peu de possibilités de contamination. Mais celles-ci existent cependant et il faut reconnaître qu'avec certains Nains, surtout les Nains Rouges Cameroun, on ne peut pas toujours les éviter. Le NRC est d'ailleurs la variété qui, à Port-Bouët, donne parfois des illégitimes même lorsque le travail est correctement fait (1 noix illégitime pour 300 ou 400 légitimes). Pour réduire ces risques de contamination sur Nain on recommande maintenant d'éliminer, au moment de l'émasculature, les fleurs femelles les plus proches de la réceptivité.

Les arbres du groupe IV sont émasculés le jour de l'ouverture de la spathe et le sac y est posé 3 jours plus tard.

On notera que chez le cocotier Grand, après avoir récolté le pollen sur une inflorescence, on peut encore poser un sac d'isolement pour pratiquer une fécondation artificielle sur les fleurs femelles de la même inflorescence alors que cela est impossible chez les Nains. Sur Nains (type III) l'inflorescence sur laquelle on récolte le pollen est perdue pour la fécondation. Il faut en tenir compte dans les programmes.

Emasculat. — Les épillets portant les fleurs mâles ne sont pas sectionnés, ils assurent un bon maintien du sac et évitent aux fleurs femelles de toucher les parois. On procède donc à un égrappage de **toutes** les fleurs mâles y compris celles qui flanquent chaque fleur femelle à sa base. Lorsque la spathe a été ouverte artificiellement on veille à ne pas abîmer les fleurs femelles et à ne pas casser les épillets dont les tissus sont tendres.

Pose du sac. — Elle ne diffère pas de celle décrite pour la récolte du pollen : le bas du sac est attaché sur le pédoncule de l'inflorescence, entouré d'un tampon de kapok contenant de l'insecticide.

2. — Pollinisation.

Les fécondations sont réalisées selon des programmes précis (plan de croisement) qui indiquent le pollen à utiliser sur l'arbre-mère considéré.

Des visites sont effectuées pour déterminer la date de réceptivité des fleurs. Dans son article sur la technique des polycaps [8] Harries dit que si l'on utilise des sacs d'isolement on ne peut observer le stade de réceptivité des fleurs femelles sans ouvrir ces sacs, d'où risques de contamination. Ceci n'est pas exact ; à l'I. R. H. O., et dans beaucoup d'autres centres de recherches, les sacs utilisés pour la fécondation artificielle du cocotier sont munis de fenêtres à travers lesquelles il est aisé d'observer les fleurs femelles. Au contraire, la technique des polycaps, qui utilise des manchons totalement opaques, en mousse de polyuréthane, au lieu de sacs d'isolement, est la seule pour laquelle l'observation de la réceptivité nécessite de rompre l'isolement. En effet, elle prévoit l'ouverture de la partie supérieure du polycap pour juger du stade de développement de la fleur, si celle-ci n'est pas réceptive on referme le polycap jusqu'à une prochaine observation ; le nombre d'observations, et donc d'ouvertures d'un même polycap, peut être élevé ; en effet, le fait de laisser une fleur femelle non isolée, comme témoin pour estimer la date approximative de réceptivité des autres fleurs, n'est pas d'un grand secours dans le cas de fécondations sur cocotiers Nains (éche-lonnement sur une quinzaine de jours des périodes de réceptivité des diverses fleurs femelles).

Préparation du mélange talc + pollen.

A la date fixée, l'ampoule de pollen est sortie du congélateur. Le pollen est alors dilué avec environ 4 g de talc dans une pissette en polyéthylène, stérilisée au formol. Cette manipulation a lieu dans un casier d'isolement contenant la réserve de talc préalablement stérilisé par la chaleur.

La pissette est refermée et sortie du casier. Entre 2 utilisations les pissettes désinfectées sont fermées et conservées dans un casier étanche.

Identification.

Une étiquette en papier est collée sur la pissette ; le matricule et le numéro du géniteur femelle ainsi que ceux du géniteur mâle y sont inscrits.

La pissette est également accompagnée d'une étiquette métallique qui sera fixée sur l'inflorescence, et sur laquelle figurent le numéro de lignée, le numéro de fécondation, la date, le matricule et numéro de géni-

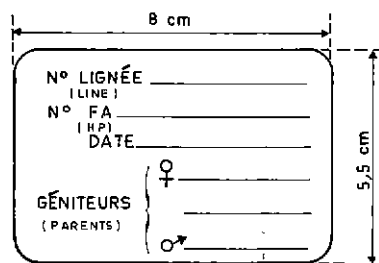


FIG. 5. — Etiquette métallique FA (HP metal tag).

teur femelle, le numéro du géniteur mâle et le programme (Fig. 5).

Apport du pollen.

Après avoir contrôlé sur le terrain la concordance des matricules et numéros de géniteurs inscrits sur l'arbre, sur la pissette et sur l'étiquette métallique, on fixe celle-ci à la base du sac au niveau de la ligature. Le pollinisateur se lave les mains et désinfecte l'extrémité de la pissette à l'alcool. Il introduit le tube de la pissette dans l'orifice, d'environ 6 mm de diamètre prévu à cet effet, au centre de la fenêtre en rexon après avoir enlevé le sparadrap qui l'obturait. Il pulvérise à l'intérieur du sac le mélange pollen + talc. Lorsque tout le mélange est apporté, l'orifice permettant l'introduction du tube de la pissette est à nouveau fermé avec du sparadrap. Le sac est ensuite secoué avec précaution pour assurer une bonne répartition du pollen (Fig. 6).



FIG. 6. — Fécondation d'une inflorescence isolée dans un sac (Pollination of a bagged inflorescence).

Date et fréquence des apports.

Sur cocotier Grand, la phase femelle durant moins de 7 jours et la durée de réceptivité d'une fleur étant de 2,5 à 3 jours, on est assuré de féconder la plupart des fleurs femelles en apportant du pollen le 3^e jour après le début de la phase femelle, soit 14 jours après la pose du sac.

Sur cocotier Nains de type III, la phase femelle dure environ 14 jours et la durée de réceptivité d'une fleur 1,5 à 2 jours. On pollinise alors 3 fois, à 3 jours d'intervalle, soit en général 4, 7 et 10 jours après le début de la phase femelle. Mais le pollen apporté peut vivre plusieurs jours et il est possible que le nombre de pollinisations sur une inflorescence de Nain puisse être réduit (essai en cours).

3. — Enlèvement du sac.

Le sac est enlevé 10 jours après la dernière pollinisation. S'il y a des fleurs femelles non nécrosées à ce stade, les épillets qui les portent sont coupés. L'étiquette métallique est alors fixée sur l'inflorescence.

Avant une nouvelle utilisation les sacs sont lavés dans une solution formolée à 20 p. 100 puis séchés à l'ombre. Après contrôle de leur parfait état ils peuvent à nouveau servir. Dans la pratique on les utilise en moyenne 10 fois.

4. — Contrôle de nouaison.

Trois mois après la fécondation, un contrôle de nouaison est effectué pour déterminer le nombre de noix nouées par fécondation et, ainsi, suivre le déroulement du programme. Le nombre de noix effectivement récoltées est en moyenne de 80 p. 100 du nombre de noix nouées à 3 mois. Le rendement en semences des fécondations artificielles est faible. On obtient en moyenne 3 à 4 noix par régime ; ainsi sur 8 841 régimes de Grands Ouest Africains fécondés de 1975 à 1977, on a obtenu 3,1 noix par régime ; mais sur 861 régimes de Nains Rouges Malaisie fécondés en 1977 on a eu 6,1 noix/régime.

Les principales causes de mauvais rendements sont :

Pensachage : il est certain que l'ensachage réduit la nouaison. Dans un essai réalisé à Port-Bouët (PB-ES/SEL N° 7) on a observé :

	P. 100 fleurs nouées/ fleurs totales
Fécondation artificielle normale.	18
Fécondation normale mais sac enlevé pendant une période de 8 h après pollinisation	25
Fécondation naturelle	52

les variations saisonnières de nouaison sont identiques en fécondation artificielle et en fécondation naturelle ;

la durée de la période de fécondation : si un arbre est utilisé pendant de nombreux mois, les visites répétées de fécondateurs et les manipulations d'échelles entraînent des chutes de fruits déjà bien développés ;

les attaques de rats expliquent une partie de la différence entre nombre de fleurs nouées à 3 mois et nombre de noix récoltées. En principe elles peuvent être contrôlées facilement par des appâts aux anti-coagulants.

Les progrès réalisés dans le domaine de la viabilité du pollen font que ce facteur ne semble plus limitant.

Le rendement des fécondations varie beaucoup avec le type d'arbre-mère. Ainsi, quel que soit le pollen apporté, les Nains Rouges Malaisie donnent plus de noix que tous les autres cocotiers et les Nains Verts moins, alors que dans les conditions naturelles ils ont tous des taux de nouaison voisins.

Pour augmenter le nombre de noix produites par fécondation artificielle, l'I. R. H. O. s'est aperçu que la meilleure technique consistait à couper sur les arbres-mères, 3 mois avant la date de début des fécon-

dations, les 5 ou 6 régimes les plus jeunes. De cette façon on a pu obtenir, par exemple en moyenne sur 549 régimes de Nain Jaune, 10 noix/régime en 1978-79 au lieu des 3 ou 4 habituelles.

VI. — RÉCOLTE DES NOIX

La récolte des noix a lieu 12 à 13 mois après la fécondation mais la date exacte dépend de la vitesse de maturation de chaque variété.

Pour éviter toute perte de noix en cas de chute avant le jour de récolte, celles-ci sont marquées au stade de 9 mois. Le numéro de fécondation est inscrit sur l'épiderme au crayon marqueur noir.

Les récoltes sont faites par programmes et par croisements ; les noix sont séparées du régime et liées par une ficelle piquée dans la bourre, l'étiquette métallique de fécondation est attachée à la ficelle.

Les noix sont alors transportées à la pépinière. Une étiquette en aluminium où est gravé le numéro de fécondation est alors fixée dans la bourre de chaque noix. L'inscription portée sur cette nouvelle étiquette se fait à l'aide d'une pince « Dymo ». Lorsque toutes les noix d'un régime ont leur étiquette, la ficelle les reliant, les étiquettes de fécondation sont éliminées après un dernier contrôle. Au germe comme en pépinière les noix sont séparées par croisement. Un numéro d'ordre est affecté à chaque croisement, il figure sur les pancartes germe et pépinière et sur les sacs. Lorsque le plant se développe, l'étiquette métallique est déplacée de la bourre à la base d'une feuille.

Le numéro d'ordre sur le sac et le numéro de fécondation permettent le contrôle de la mise en place au champ.

VII. — ORGANISATION ET CONTRÔLES

Les travaux de fécondation réclament beaucoup d'attention. Ils doivent être organisés de façon à faciliter la tâche du personnel, à lui éviter les erreurs et à l'inciter à ne pas commettre de négligences. Des contrôles à tous les niveaux permettent de s'assurer de l'efficacité de cette organisation et de la qualité des travaux.

1. — Organisation.

Le personnel comprend 4 types d'employés :

— les récolteurs de pollen : récoltent les épillets, préparent et conditionnent le pollen. On compte 1 employé pour 6 à 8 000 ampoules de 0,25 g préparées chaque année ;

— les ensacheurs : émasculent les inflorescences des arbres-mères, posent les sacs et les enlèvent après la fécondation. Un ensacheur est responsable de 50 à 100 arbres, suivant la taille de ces arbres ;

— les pollinisateurs : apportent sur les fleurs femelles le pollen choisi ; ils sont responsables de 70 à 150 arbres, suivant la taille et le nombre de pollinisations à effectuer sur chacun d'eux.

— les surveillants : contrôlent les travaux à tous les stades. On compte 1 surveillant pour environ 10 ensacheurs + pollinisateurs.

Il faudrait ajouter aussi à cette liste le pépiniériste.

Les travaux.

Chaque récolteur de pollen et chaque ensacheur disposent d'un tableau permettant de repérer jour par jour le stade d'évolution de l'inflorescence sur chacun des géniteurs dont il est responsable. Ce tableau est mis à jour quotidiennement après visite sur les champs. Il permet au récolteur ou à l'ensacheur d'établir son programme du lendemain (visites, émascultation, pose et enlèvement de sac), au pollinisateur de prévoir ses besoins en pollen pour le jour suivant, au surveillant de vérifier qu'il n'y a pas eu de négligence et de choisir les arbres sur lesquels il effectuera des contrôles le lendemain ; il permet enfin au responsable des programmes de contrôler l'ensemble du personnel et le bon déroulement des programmes.

On utilise des personnes différentes pour les travaux d'isolement des inflorescences et pour ceux de pollinisation, afin d'éviter qu'un employé ne féconde des inflorescences qu'il aurait mal isolées, pour cacher son erreur.

Pour s'assurer de la qualité des travaux d'isolement on procède à des fécondations à blanc ; 1 fécondation à blanc toutes les 20 fécondations (5 p. 100). Celle-ci consiste à n'apporter que du talc sur l'inflorescence le jour prévu pour la pollinisation. La décision de faire une fécondation à blanc est prise par le responsable du programme la veille du jour où elle a lieu.

2. — Contrôles.

Les contrôles se font à tous les niveaux et comprennent :

— **le contrôle du travail.** — Il consiste à vérifier les points suivants :

- la régularité des visites d'arbres,
- la qualité du matériel, en particulier des sacs,
- l'absence de toutes fleurs mâles sur les inflorescences après émascultation,
- la pose des sacs et en particulier l'attache au pédoncule et le stade de développement des fleurs femelles,
- la pollinisation,
- l'enlèvement des sacs = fleurs encore réceptives,
- les durées entre pose du sac, pollinisation et enlèvement du sac,

— les fécondations à blanc : l'absence de noix nouées 3 mois après la fécondation montre la qualité du travail de l'ouvrier responsable ; il faut cependant vérifier avant 3 mois que les fleurs femelles ou les épillets n'ont pas été volontairement endommagés pour provoquer un avortement total ;

— **le contrôle d'identification.** — le système d'étiquetage précédemment décrit permet de contrôler à tout moment l'exactitude du croisement réalisé. Toutes erreurs, à quelques niveaux que ce soit dans le travail ou dans l'identification, entraînent l'annulation de la, ou des, fécondation artificielle concernée.

VIII. — ENREGISTREMENT

Les enregistrements ont un double but : identifier les géniteurs intervenant dans chaque fécondation et permettre un contrôle aisé et précis du déroulement

des diverses opérations. Le rapport journalier fourni par chaque employé, et dans lequel sont consignés toutes les observations et les travaux réalisés, sert de base à tous les enregistrements.

1. — Cahier de récolte des pollens.

On y inscrit les dates de pose de sac, de récolte des épillets et de conditionnement du pollen, le nombre d'unités ou d'ampoules préparées ainsi que les pourcentages de germination et d'humidité déterminés sur un échantillon. Ces données sont regroupées par géniteurs, désignés par leurs numéros et leurs matricule, variétés et programmes.

2. — Registre des fécondations artificielles.

Un numéro est attribué à chaque fécondation dans l'ordre des réalisations. A ce numéro correspondent, sur le registre, les données identifiant l'arbre-mère et le pollinisateur (N° de géniteur, matricule, variété), le numéro du programme de référence et celui de la lignée créée. On y inscrit également les dates d'émascultation, de pose du sac de fécondation, d'enlèvement du sac et les écarts (en jours) entre ces opérations, ainsi que l'âge du pollen utilisé, le nombre de noix nouées à 3 mois, la date de récolte et le nombre de noix obtenues.

3. — Plan de croisement.

Le plan de croisement permet au responsable de faire réaliser dans un ordre déterminé les croisements prévus, et de suivre l'avancement du programme. Il prévoit, pour chaque inflorescence d'un arbre-mère, le pollen à utiliser. On inscrit sur ce plan le numéro et la date de fécondation ainsi que le nombre de noix nouées 3 mois après fécondation.

4. — Rapport mensuel.

Le rapport mensuel récapitule par mois et par programme, les quantités de pollen obtenues et utilisées, les fécondations réalisées, les nouaisons obtenues à 3 mois, les nombres de noix récoltées et le résultat des contrôles de fécondation à blanc.

IX. — CONCLUSION

La méthode décrite ici est fiable. Elle est utilisée par les chercheurs de l'I. R. H. O. en Côte-d'Ivoire et aux Nouvelles-Hébrides où plus de 10 000 fécondations artificielles sont réalisées chaque année. De nombreux essais et études ont permis d'en tester tous les stades et contribuent encore à la perfectionner. Certains trouveront cependant que les précautions recommandées sont excessives ; ils mettront en avant la disproportion entre les quantités de pollen apportées artificiellement et de pollen contaminant pour justifier l'emploi de méthodes nécessitant moins d'effort. Ils ont tort pour plusieurs raisons :

— L'expérience de l'I. R. H. O. est basée sur la réalisation de plus de 100 000 fécondations artificielles ; or, elle a montré que la proportion d'illégitimes s'élevait rapidement dès qu'apparaissait un manque de rigueur dans l'application des recomman-

dations d'isolement ou d'identification. Les résultats de certains autres organismes de recherches le confirment d'ailleurs.

— La présence d'un nombre, même très réduit, d'illégitimes peut avoir de graves conséquences sur le déroulement des programmes de recherche. En effet, à l'intérieur d'une population on choisit généralement

comme géniteurs les individus les plus remarquables pour les caractères héréditaires mais, ce faisant, on sélectionne peut-être les rares illégitimes de cette population.

Toute technique qui entraîne un risque d'illégitime doit donc être bannie.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BRIOLLE C. E. (1964). — Pratique de la fécondation dirigée du cocotier. *Oléagineux*, 19, N° 3, p. 149-158.
- [2] U. P. E. Research Dpt. Malaysia. — *F. A. O. Yearly progress report on coconut breeding*, 1972, p. 12-20.
- [3] BALINGASA E. N., SANTOS G. A. (1978). — *Manual for coconut hand pollination technique*. Breeding and genetic division, Philippines Coconut Authority.
- [4] GASCON J. P., NUCÉ de LAMOTHE M. de (1978). — Genetic improvement of the coconut. Results and prospects. *International Conference on cocoa and coconut*, Kuala Lumpur (Malaysia).
- [5] SANGARÉ A., ROGNON F., NUCÉ de LAMOTHE M. de (1978). — Les phases mâles et femelles de l'inflorescence de cocotier. Influence sur le mode de reproduction. *Oléagineux*, 33, N° 12, p. 609-617.
- [6] WHITEHEAD R. A. (1963). — The processing of coconut pollen. *Euphytica*, 12, N° 2, p. 167-177 et *Oléagineux* (1964), 19, N° 7, p. 477-483.
- [7] Coconut Research Institute Ceylon (1966). — Controlled pollination of coconut palms, leaflet N° 47.
- [8] HARRIES H. C. (1976). — Coconut hybridization by the polieaps and Mascopol systems. *Principes*, 20, N° 4, p. 136-147.
- [9] ROGNON F., NUCÉ de LAMOTHE M. de (1978). — Récolte et conditionnement du pollen pour la pollinisation des champs semenciers de cocotiers. *Oléagineux*, 33, N° 1, p. 17-23.
- [10] BENARD G., NOIRET J.-M. (1970). — Le pollen de palmier à huile. Récolte, préparation, conditionnement et utilisation pour la fécondation artificielle. *Oléagineux*, 25, N° 2, p. 67-73.
- [11] ROGNON F., NUCÉ de LAMOTHE M. de (1973). — Action du froid sur la conservation du pollen de cocotier. *Oléagineux*, 28, N° 9, p. 565-566.

SUMMARY

Hand pollination of the coconut.

M. de NUCÉ de LAMOTHE, W. WUIDART, F. ROGNON, and A. SANGARÉ, *Oléagineux*, 1980, 35, N° 4, p. 193-206.

The authors describe the method of hand pollination of the coconut used by the research workers at I. R. H. O. : collection, conditioning and pollen storage, isolation of inflorescences, pollination, nut collection. This method, which is constantly being perfected, is based on the results of many trials and on more than 100 000 hand pollinations. The aim of the article is not only to present a practical instruction manual, but also to explain and justify the choices made (material and techniques). The precautions taken and the quality control may seem excessive, but, as the authors stress in their conclusion, experience has sufficiently shown at I. R. H. O. as in other Research Stations that the percentage of illegitimates in a population can have harmful results for future research work if the production characters of these illegitimates lead to their being chosen as parents.

RESUMEN

Fecundación artificial del cocotero.

M. de NUCÉ de LAMOTHE, W. WUIDART, F. ROGNON y A. SANGARÉ, *Oléagineux*, 1980, 35, N° 4, p. 193-206.

Los autores describen el método de fecundación artificial del cocotero utilizado por los investigadores del I. R. H. O. : cosecha, acondicionamiento y almacenamiento del polen, aislamiento de inflorescencias, polinización, cosecha de las nueces. Este método, que siempre se está perfeccionando, se funda en los resultados de numerosos ensayos y en la realización de más de 100 000 fecundaciones artificiales. El propósito de este artículo no sólo es el de presentar un manual práctico de instrucciones a seguir, sino también el de explicar y justificar las alternativas elegidas (equipo y técnicas). Las precauciones tomadas y los controles de calidad parecerán excesivos a lo mejor, pero según recalcan los autores en su conclusión, la experiencia demostró abundantemente, tanto en el I. R. H. O. como en otros centros de investigaciones, que los porcentajes de ilegítimos suben rápidamente en cuanto las técnicas se hacen menos estrictas. La presencia en una población de ilegítimos no identificados, aunque sean muy poco numerosos, puede influir de un modo molesto en la prosecución de las labores de investigación, si los caracteres de producción de tales ilegítimos inducen a seleccionarlos como genitores.

Hand pollination of the coconut

M. de NUCÉ de LAMOTHE (1), W. WUIDART (2), F. ROGNON (2), and A. SANGARÉ (2)

Foreword

Since the appearance of Mr. C. E. Briolle's article in 1964 [1] in « *Oléagineux* » nothing has been published on artificial pollination techniques used for the coconut at I. R. H. O., although these have greatly evolved. An internal document, called « *General Instructions for artificial pollination* », periodically updated with the latest methods, has nonetheless become known among trainees and visitors to the Ivory Coast and New Hebrides Stations. Several publications have been based on it, thus contributing to application of the results of our work [2, 3].

Recent discussions on the value of various methods of isolation of the coconut inflorescence or flower, convinced us of the need to make the techniques I. R. H. O. developed and recommends better known.

The aim of this article is not only to give a practical instruction manual but also to explain and justify the choices made.

(1) Director of the Coconut Breeding Department of I. R. H. O., Marc-Delorme Station, 07, B. P. 13, Abidjan, 07 (Ivory Coast).
 (2) I. R. H. O. Plant Breeding Service, Marc-Delorme Station (Ivory Coast).

I. — INTRODUCTION

The improvement of the coconut includes setting up combining ability tests between origins or individuals chosen on the phenotypical value of inheritable characters [4]. More generally, crosses must be made between 2 parents whose exact identity must be known. Only artificial pollination guarantees the identity of the male parent. The method consists of bringing pollen harvested on the male parent to the female flowers of the mother tree at their receptive moment. The operations must be carried out in an isolated milieu to avoid accidental pollination by another pollen.

Carrying this out in practice is difficult, as material and methods which ensure perfect isolation and prevent identity errors, without affecting seed yield too much, are needed. It demands specialised, good quality personnel, as well as an organisation which ensures through numerous quality controls, that the effort will be kept up. The use of poor material, badly adapted methods or simply sloppy controls, are the most frequent causes of poor results. When there is an unwillingness to admit that such errors have occurred, the consequences of bad artificial pollination technique can be serious; one country stopped producing hybrid seeds, because, instead of recognising that there had been a technical error, the appearance of illegitimates was attributed to a hybrid character of the Tall being used.

Before describing the various operations, a brief reminder of floral biology is in order.

II. — FLORAL BIOLOGY

The coconut is a monoic plant. The length and overlapping of male and female phases of the inflorescence have been described by Sangare *et al.* in a recent article [5]. Only the aspects which most affect the carrying out of pollination operations will be referred to here.

Two characteristics determine the date at which the inflorescence must be isolated :

— *the length of survival*, inside an isolation bag, of a ripe pollen grain (case a foreign pollen present on the inflorescence at the time of bagging). This can be estimated at 8 days following results of a trial done in the Ivory Coast on mixtures of pollen grains at various stages of maturity. The bagging must therefore take place 8 days at least before the start of the female phase (pollination) or the collection of the spikelets (obtaining the pollen).

— *the interval between spathe opening and the start of receptivity of the female flowers*. This is from 22 to 24 days for the Tall coconuts (types I and II of Sangare) and from 16 to 21 days for Dwarf × Tall hybrids and certain Green Dwarfs (type IV); and from 2 to 7 days for the other Dwarfs (type III). There may be no interval at certain seasons and on certain trees.

On Dwarfs, bagging should therefore be done before the presumed date of natural opening of the inflorescence.

Time and frequency of pollen applications depend on :

— *length of receptivity of a female flower*. — Observations made in the Ivory Coast show that this is from 2.5 to 3 days for the Talls and from 1.5 to 2 days for the Dwarfs.

A single application of pollen is sufficient to ensure pollination of all flowers for 5 to 6 days of the female phase of Talls and for 3 to 4 days on Dwarfs;

— *length of the female phase*. — There are 2 categories: Coconuts with a long female phase (more than 13 days); these are all Dwarfs, type III of Sangare; those with a short female phase (less than 7 days) which includes all Talls and certain Green Dwarfs, types I, II and IV. Crosses between these 2 categories generally behave like Talls. The Dwarf inflorescence should therefore be pollinated several times.

III. — MATERIAL

Choice of material conditions the value of the technique. It should enable the harvesting, conditioning and storing of pure pollen with good viability, the avoidance, at all stages, of contamination by undesirable pollen, and the obtaining of a large number of legitimate seeds. The work of Whitehead in Jamaica [6] on preparation and conditioning of pollen, helped in the choice of material, but the greatest contribution has been made by research done on the oil palm and coconut Stations of the I. R. H. O.

1. — Isolation bag.

Material.

Several years elapsed before a bag was found which ensured both perfect isolation of the inflorescence and acceptable fruit yield. Many materials (paper, terylene, various quality canvases) were tested on oil palm inflorescences at La Mé in the Ivory Coast.

These trials led to the choice of a green « Dickson CD72 » finely woven canvas, permeable to air but impermeable to pollen and water. The same type of material has been adopted for the coconut after a series of tests proving that it allowed a good number of fruits per bunch to be obtained: 6.1 nuts/bunch on the average out of 681 bunches of Malay. Red Dwarf harvested in 1978, with no illegitimates.

The fact that this material has been tested on the oil palm is a guarantee of quality. In effect, a foreign pollen grain introduced accidentally into an isolation bag (poor quality material for example) has more chance of pollinating one of the 1 to 3 000 female flowers of the oil palm bunch than one of the 20 to 30 female flowers of the coconut inflorescence. An illegitimate will result which is spotted easily if no other pollen was deliberately introduced into the bag (blank pollination).

Other materials were recommended in some countries, for example polythene in Sri Lanka around 1960 [7], but the pin holes which had to be made to facilitate air circulation were probably large enough to allow entry of undesirable pollen. In Jamaica Harries [8] used polyurethane foam to isolate each flower individually but this product is not suitable for isolating an entire inflorescence.

The bag.

The bag is 60 cm wide by 90 cm long; it has two transparent rexon windows sealed to the canvas, one on each side to follow the flowers' evolution. The seams are double-stitched.

The bag for harvesting pollen is different from that used for pollination, in that it has a sleeve on the right side for passing an arm through, and under one of the windows, there is a small sleeve to which a 20/100 plastic pouch is attached to receive the spikelets (Fig. 1 A, B).

2. — Isolation box.

Isolation boxes enable pollen to be handled free from risk of contamination by foreign pollen.

These boxes are made of aluminum sheet, and measure 60 cm × 60 cm × 30 cm high. A tempered glass window 20 × 40 cm is let into the top, and on one side there is an airtight door with 2 sleeves (interior \varnothing 17 cm) through which the hands are passed for the various operations (Fig. 2, 3).

Before being used, the cell is disinfected by heat; two 1 000 W infra-red lamps bring the temperature of the box up to 150 °C. This temperature is maintained for 15 min; it is left to cool for about 30 min. before use.

3. — Oven.

Male flowers are put into the oven to dry them so as to make it easier to collect the pollen by sifting and to reduce humidity to a level ensuring good conservation.

The work of Whitehead [6] has shown that in order not to damage pollen grains, drying must be done at temperatures under 40 °C.

The oven must be chosen according to the following criteria :

- it must be large enough to dry all the pollen collected in one day,
- the temperature must be close to 40 °C but not over that,
- there must be forced ventilation to speed up drying.

At the Marc Delorme Coconut Station at Port-Bouet, where 12 000 pollen units (0.25 g) are prepared every year, the capacity of the oven used is 200 l.

4. — Vacuum apparatus.

After drying, the pollen is placed in ampoules under a high vacuum. As Whitehead does, we use a Speedivac 5PS type apparatus built by Edwards High Vacuum.

This apparatus is made up of a vacuum pump (EC 2 406 type), a water trap and a rack which enables 48 ampoules to be treated at once. The ampoules are drawn out with a blow-lamp before being placed on the rack, then, when the vacuum forms, they are sealed at drawn point. The vacuum inside the ampoules is checked with an Edwards model T2 high frequency controller.

This equipment has proved very satisfactory and the treatment does not affect the viability of the pollen at all. However, to make identity control easier, we are considering using flasks instead of ampoules and a simple vacuum pump instead of the Speedivac, as described in *Oléagineux* by Rognon [9] and Benard [10]. A trial comparing the 2 methods is now going on.

5. — Freezer.

Freezing enables pollen viability to be maintained at its original level for at least 6 months [Rognon, 11].

The ampoules containing the pollen are placed in a freezer at -20°C . The size of the freezer depends on the quantity of pollen stocked.

6. — Other material.

Other material needed for artificial pollination includes :

— light metal ladders. These make the pollinisers' work easier, and enable regular checks by monitors and supervisors. Without these checks, the quality of the work deteriorates very quickly. The use of a tree is thus linked to the possibility of getting a ladder of reasonable weight which makes it possible to reach the crown without taking unnecessary risks. The I. R. H. O. no longer uses trees over 15 m high as parents,

— a small oven at 105°C to determine the water content of pollen,

— a precision scale, a microscope and small laboratory material for pollen viability tests,

— a Dymo punch to print on aluminium ribbon,

— polyethylene wash-bottles for pollination,

— shears.

IV. — HARVESTING POLLEN

This includes 4 successive operations : isolating the inflorescence, harvesting male spikelets and identifying them, preparing and conditioning the pollen, and quality control : humidity and viability.

1. — Isolating the inflorescence.

Isolating the inflorescence for harvesting the pollen is not often practised elsewhere. Many people do in fact consider that contamination by foreign pollen is negligible given the quantity of pollen obtained. We do not agree, and we consider that isolating the inflorescence is useful as pollen competition phenomena can occur to favorize one or another contaminating pollen.

Bagging considerably reduces the length of the male phase. On Talls, 10 days after spathe opening and on Dwarfs 8 days after, most of the male flowers of a bagged inflorescence have fallen. According to the type of coconut and the quantities of pollen needed, the spikelets are harvested from 5 to 8 days after spathe opening, and, if the 8 days of isolation are to be respected, the bag must be put on 0 to 3 days before the supposed date of natural opening of the spathe. In practice, it does sometimes happen that the bagging lasts only from 6 to 7 days, but as 24 hours elapse before the pollen is conditioned, risk of contamination is really insignificant.

After having cut the 2 spathe of the inflorescence, the bag is put on. The lower part is closed around the base of the peduncle, which is wrapped beforehand with a kapok pad dipped in insecticide to avoid penetration by insects.

2. — Harvesting and identification of spikelets.

The spikelets are thus harvested from 6 to 8 days after bagging. The harvester follows the maturation through the windows, and determines the exact date of collection. To remove the spikelets, he introduces his arm holding the shears into the sleeve of the bag. He disinfects his hand, arm and shears with surgical spirit first. Spikelets bearing at least 20 p. 100 open male flowers are cut and placed into the plastic pouch fixed to the bag. This pouch is closed and taken to the laboratory and the bag is removed. The number of the parent and registration number of the tree are marked on the plastic pouch when the bag is put on, as well as on the labels placed inside the pouch. Immediately after collection, the harvesting date is also written on the plastic pouch (Fig. 4).

3. — Preparing the pollen.

Only very small quantities of pollen are collected by shaking a coconut inflorescence or by sifting crushed flowers ; they are too humid. It is essential to dry the crushed male flowers first ; then 8 to 10 or even 15 g of pollen per inflorescence can be obtained.

Whatever the collection day may be, a large proportion of male flowers is immature and thus gives non-viable pollen. This explains the relatively low viability percentage which we will discuss below.

Under natural conditions, the lifespan of fresh pollen is only a few days. Several treatments are thus indispensable in order to increase this conservation period to carry out artificial pollination programmes. At present, the most effective technique consists of keeping the dehydrated pollen (5 p. 100

water) in the freezer at -20°C and conditioning it under high vacuum.

The various steps in preparation are as follows : stripping the male flowers, crushing, oven-drying, sifting and packing in ampoules, creation of vacuum and sealing, and storing.

All manipulations take place in the laboratory in a disinfected isolation box containing the necessary material (sieve, ampoule, paper bag etc.). The materials which cannot tolerate high temperature sterilisation are placed, clean, into airtight plastic bags and used 10 days later. These bags are cleaned with surgical spirit before being placed in the box. Before handling anything, the operator washes his hands with surgical spirit.

Stripping. — After being disinfected with spirit, the pouch containing the spikelets is introduced by one of the sleeves and its contents transferred to the isolation box where the male flowers are detached. These flowers are then placed in paper bags with identification tags ; the bags are closed and then taken out of the box. The identity of the pollen and collection date are marked on them.

Crushing. — The paper bag containing the male flowers is placed in a canvas bag which protects it during the crushing operation. The male flowers are simply crushed with a roller to open them and assist drying.

Drying. — The canvas bags are placed for 20 hours in the oven, set at 40°C . This brings the pollen humidity down to about 5 p. 100.

Sieving and packing in ampoules. — After drying, the paper bag is placed in an isolation box. The male flowers are then sieved to extract their pollen, which is distributed among the ampoules at the rate of about 0.25 g each, the dose required for one pollination. Pollen, a sterile cotton, a paper tag giving the pollen identity and the harvesting date, and another sterile cotton, are placed in each ampoule.

Creating the vacuum. — The filled ampoules are pre-drawn with a blowlamp then placed on the « Speedivac » rack teats. Five minutes after creating the vacuum at 0.06 mm of mercury, the ampoules are sealed at the throat.

Storing the pollen. — The conditioned pollen in its ampoule is kept in the freezer at -20°C for a period of anything up to 6 months [Rognon, 11]. Beyond this period, it should be tested for viability before using. At I. R. H. O., the pollen is generally used before it has been in storage 3 months.

4. — Quality, viability and moisture checks.

On each lot of prepared pollens, one ampoule is chosen for viability and moisture tests. If the results are not good, a second one is tested ; the whole lot is destroyed in case of confirmation.

The germinative power of the pollen is observed on an agar agar (1.2 p. 100) and sugar (11 p. 100) medium after having activated germination by exposing it for 2 hours at 35°C .

Germinated and non-germinated grains are counted by microscope, observing several randomly chosen fields and counting at least 100 grains.

Moisture percentage is calculated by weighing fresh weight and dry weight after 24 hours in a 105°C oven.

High frequency equipment is used to test the vacuum. Quality norms are as follows :

— germination ≥ 35 p. 100,

— humidity : between 4 and 8 p. 100.

Viability variations can be observed with test method and the products used. But these are limited, and for viabilities over 50, they are very rare (average at Port-Bouet : 42). They can only be got on very small quantities of fresh pollen.

V. — POLLINATION

There are several operations : emasculation and bagging, pollination, removal of the bag, and check of fruit-set.

1. — Emasculation and bagging.

To ensure there is no fertilisation by a foreign pollen landing on the inflorescence before bagging, it must take place at least 8 days before the start of receptivity of the 1st female flower ; in practice 14 days before pollination. Emasculation and bagging dates thus depend on the interval between opening of the spathe and receptivity of the 1st female flower. In type I and II coconuts, this interval is from 22 to 24 days ; emasculation takes place 5 days after opening of the spathe and bagging, 3 days later.

In type III Dwarfs which may have receptive female flo-

wers as soon as the spathe opens, bagging and emasculation are done 48 h before the supposed natural opening date (earlier emasculation would only cause damage). Trained personnel can easily estimate this date. There is thus little risk of contamination for the Dwarf inflorescence. However, some risk remains, and with certain Dwarfs, particularly the Cameroon Red Dwarf, it cannot always be avoided. Furthermore, the C. R. D. is the variety which sometimes gives illegitimate nuts for 300 to 400 legitimate). To cut down this contamination risk on Dwarfs, we now recommend eliminating the female flowers closest to receptivity at the time of emasculation.

Group IV trees are emasculated on the day of spathe opening and bagging takes place 3 days later.

It should be noted that after pollen has been collected on a Tall inflorescence, the female flowers of the same inflorescence can still be bagged for artificial pollination, whereas this is impossible with Dwarfs. On type III Dwarfs, the inflorescence used for pollen is lost for pollination. This must be taken into account in the programmes.

Emasculation. — The spikelets bearing male flowers are not cut; they hold the bag up and prevent the female flowers from touching the sides. All the male flowers are stripped including those which surround the base of each female flower. When the spathe has been artificially opened, care is taken not to damage the female flowers and not to break the spikelets, of which the tissue is fragile.

Bagging. — This is the same as described for pollen collection. The lower part of the bag is attached to the peduncle of the inflorescence surrounded by a kapok wad containing insecticide.

2. — Pollination.

Pollination is carried out according to precise programmes (crossing plan) indicating the pollen to be used on the relevant mother tree.

Visits are made to determine the date of receptivity of the flowers. Harries in his article on the policaps technique [8] says that if isolation bags are used, it is impossible to observe the receptivity stage of the female flowers, without opening the bags, thus creating contamination risks. This is incorrect. At I. R. H. O., as in many other research centres, the bags used for artificial pollination have windows making it easy to see the female flowers. On the contrary, the policaps technique, which uses totally opaque sleeves in polyurethane foam instead of bags, is the only one where isolation must be broken to observe receptivity, because the upper part of the policap must be opened to check the flower's stage of development; if it is not receptive, the policap is closed until the next observation. The number of observations and therefore openings of the policap may be considerable. Leaving a non-isolated female flower as a control to estimate the approximate date of receptivity of the other flowers is not very helpful in the case of Dwarf pollination as the receptivity of the various female flowers is spread over a fortnight.

Preparation of the talc-pollen mixture.

On the set date, the pollen ampoule is removed from the freezer. The pollen is then diluted with about 4 g talc in a polyethylene wash-bottle sterilized with formol. Handling is done in an isolation box containing the reserve of talc, heat-sterilized beforehand.

The wash-bottle is closed again and taken out of the box. When not in use, the disinfected wash-bottles are closed and kept in an airtight box.

Identification.

A paper tag is glued to the wash-bottle; it is marked with the registration number and number of both the male and female parents.

The wash-bottle is accompanied by a metal tag to be fixed onto the inflorescence, on which the line number, pollination number, date, registration and number of the female and the male parent and the programme are all marked (Fig. 5).

Pollen application.

After having checked in the field that the registration and numbers of the parents marked on the tree agree with those on the wash-bottle and on the metal tag, the latter is fixed to the tie at the bottom of the bag. The polliniser washes his hands and disinfects the tip of the wash-bottle with spirit. He puts the wash-bottle tube into the 6 mm hole cut for this purpose in the rexon window, after removing the sticking-plaster covering it. He sprays the talc-pollen mixture into the bag. When all the mixture has been applied, he closes the hole in the window again with sticking plaster. The bag is then carefully shaken to ensure good distribution of the pollen (Fig. 6).

Date and frequency of applications.

On Talls, the female phase lasts less than 7 days; the length of receptivity of a flower is from 2.5 to 3 days, so one can ensure pollination of most of the female flowers by applying pollen the 3rd day after the start of the female phase, i. e. 14 days after bagging.

On type III Dwarfs, the female phase lasts about 14 days, and the length of receptivity of the flower from 1.5 to 2 days. Pollination is done 3 times, at 3-day intervals, i. e. in general, 4, 7 and 10 days after the start of the female phase. But the pollen applied can live for several days and it may be possible to reduce the number of pollinations on a Dwarf inflorescence (trial in process).

3. — Removal of the bag.

The bag is removed 10 days after the last pollination. If there are unwithered female flowers at this stage, the spikelets bearing them are cut. The metal tag is then attached to the inflorescence.

Before re-use, the bags are washed in a 20 p. 100 formol solution then dried in the shade. After checking to ensure they are in perfect condition, they can be used again. In practice, they are used an average of 10 times.

4. — Check of fruit-set.

Three months after pollination, fruit-set is checked to determine the number of nuts set by pollination so that the carrying-out of the programme can be followed. The number of nuts in fact harvested is, on the average, 80 p. 100 of the nuts set at 3 months. The seed yield of artificial pollination is low: an average of 3 to 4 nuts per bunch. Thus, out of 8 841 bunches of W. A. T. pollinated from 1975 to 1977, 3.1 nuts/bunch were obtained; but 861 M. R. D. bunches pollinated in 1977 produced 6.1/bunch.

The main causes of poor yields are:

bagging: this does reduce fruit-set. In a trial made at Port-Bouet (PB-ES/SEL no. 7) we observed: seasonal variations in fruit set are the same for artificial and open pollination;

	P. 100 flower set/ total flower
Normal artificial pollination	18
Normal pollination but bag removed for 8 h after pollination	25
Open pollination	52

length of pollination period: if a tree is used for several months, repeated visits by pollinisers and handling of ladders, means that already well-developed fruit will fall;

rat attacks: explain in part the difference between numbers of flowers set at 3 months and number of nuts harvested. In principle, rats should be easy to control using anticoagulant baits.

Progress achieved in pollen viability means that this no longer seems to be a limiting factor.

Yield of pollinations varies very much depending on the type of mother-tree. Thus, whatever pollen applied, the M. R. D. give more nuts than all other coconuts, and the Green Dwarfs less, whereas, under natural conditions they have similar setting rates.

To increase the number of nuts produced by artificial pollination, the I. R. H. O. discovered that the best technique involved cutting the 5 or 6 youngest bunches from the mother-trees 3 months before pollination starts. This method made it possible to obtain, for example, an average of 10 nuts/bunch on Yellow Dwarf out of 549 bunches in 1978-1979, instead of the usual 3 to 4.

VI. — HARVESTING THE NUTS

The nuts are harvested 12 to 13 months after pollination, but the exact date depends on the speed of ripening of each variety.

To avoid losing nuts in case they drop before harvesting day, they are marked at 9 months. The pollination number is written on the skin with a black felt pen.

The harvests are done by programmes and by crossings; the nuts are separated from the bunch and tied by a string threaded through the husks, to which is attached the metal pollination tag.

The nuts are then taken to the nursery. An aluminium tag inscribed with the pollination number is then pegged in the husk of each nut. The inscription on this new tag is made with « Dymo » punch. When all the nuts from a bunch are labelled, the string tying them together, and the pollination tag are removed after a final check. In the seedbed as in the nursery, the crosses are kept separate. An order number is given to each cross, marked on the seedbed and nursery notice boards and on the bags. As the plant develops, the metal tag is moved from the husk to the base of a leaf.

The order number on the bag and the pollination number enable control at field planting.

VII. — ORGANISATION AND CONTROLS

Pollination tasks require a lot of attention. They must be organised so as to make the staff's job easier, to avoid error and discourage negligence. Controls at every level make it possible to ensure that organization is efficient and that the quality of the work is satisfactory.

1. — Organization.

The staff comprises 4 types of employee :

— the pollen harvesters : they collect the spikelets, prepare and condition the pollen. One employee is needed for 6 to 8 000 ampoules of 0.25 g each prepared each year ;

— baggers : emasculate the inflorescences of the mother trees, place the bags and remove them after pollination. A bagger is responsible for 50 to 100 trees depending on the height of the trees ;

— pollinisers : apply the chosen pollen to the female flowers ; they are responsible for 70 to 150 trees depending on height and number of pollinations to be done on each tree ;

— supervisors : check work at all stages. One supervisor is needed for about 10 baggers and pollinisers. Add to this list one nurseryman.

The tasks.

Each pollen harvester and bagger has a table enabling him to follow day by day the stage of development of the inflorescence on each of the parents for which he is responsible. This table is updated daily after field visits. The harvester or bagger can then establish the next day's programme (visits, emasculation, bagging or removing bags) ; the polliniser can estimate his pollen needs for the following day, the supervisor can make sure there has been no negligence and chose the trees which he will check on the morrow ; finally, the programme director can control all the personal and the successful carrying out of the programmes.

Different persons are used for isolating the inflorescences to those doing pollinations to avoid an employee pollinating inflorescences that were badly isolated to hide his error.

To ensure the quality of isolation work, blank pollinations are practised ; one for every 20 pollinations (5 p. 100). Only talc is sprayed on the inflorescence on the day planned for pollination. The programme director decides the day before which one is to be done.

2. — Checks.

Checks are done at all levels including :

— *Checking the work.* — The following points are verified :

- regularity of visits to trees,
- quality of material, especially bags,
- absence of male flowers on inflorescences after emasculation,
- bagging and in particular the tie round the peduncle and the stage of development of female flowers,
- pollination,
- removal of bags = flowers still receptive,
- interval between bagging, pollination and removing bag,
- blank pollinations : the absence of fruit-set 3 months after pollination shows the quality of work of the worker responsible, but before that, the female flowers or spikelets must be checked to see whether they have not been wilfully damaged to provoke total abortion.

— *Checking identification.* — The labelling system described makes it possible to check the exact identity of the cross made at any moment. Any errors at whatever level in the work or in identification, mean cancelling the artificial pollinations (s) concerned.

VIII. — RECORDING

Recording has two aims : to identify the parents involved in each pollination, and to permit simple and precise control of the carrying out of the various operations. The daily report supplied by each employee in which all observations and work done are noted is the basis for recording.

1. — Notebook for pollen harvesting.

Bagging, spikelet collection and pollen conditioning dates are noted here, as well as number of units or ampoules prepared, germination and moisture percentages for each sample. These data are regrouped by parents, with their numbers, code, varieties and programme.

2. — Register of artificial pollinations.

A number is given to each pollination in the order in which it is carried out. Against this number, in the register, are entered details of the mother-tree and the male parent (no. of parent, code, variety), the number of the reference programme and that of the line created. The dates of emasculation, placing and removal of the bag, and intervals between these operations (in days) are noted here too, along with the age of the pollen used, the number of nuts set at 3 months, the harvesting date and the number of nuts obtained.

3. — Crossing plan.

The crossing plan enables the programme director to carry out the planned crosses in a precise order, and to follow the programme's progress ; it fixes the pollen to be used for each inflorescence of a mother-tree. The number and date of pollination as well as the number of nuts set 3 months after pollination are also noted on the plan.

4. — Monthly report.

The monthly report summarizes by month and by programme the quantities of pollen obtained and used, the pollinations done, the fruits set at 3 months, the number of nuts harvested and the result of the blank pollination checks.

IX. — CONCLUSION

The method we have described here is dependable. It is used by I. R. H. O. research workers in the Ivory Coast and the New Hebrides, where more than 10 000 artificial pollinations are done yearly. Numerous trials and studies have enabled us to test all the stages and have helped to perfect it. Some may think the precautions we recommend are exaggerated ; they may say that the quantities of pollen artificially applied so far exceed those of contaminant pollen that less onerous methods are justified. They are wrong for several reasons :

— I. R. H. O.'s experience is based on more than 100 000 artificial pollinations, which have shown that the proportion of illegitimates rises very rapidly as soon as there is any lack of rigour in the applying of isolation or identification recommendations. Furthermore, the results from other research organisations have confirmed this.

— The presence of even a very small number of illegitimates can have serious consequences for the progress of research programmes. Within a population, it is individuals most remarkable for inheritable characters which are usually selected as parents, but in doing this, one may be selecting one of the rare illegitimates of this population.

Any technique where there is a risk of illegitimacy must be ruled out.

