**PCT** ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

**(51) Classification internationale des brevets 5 :** A01H 4/00 — A1

**(11) Numéro de publication internationale:** WO 94/16551

**(43) Date de publication internationale:** 4 août 1994 (04.08.94)

**(21) Numéro de la demande internationale:** PCT/FR94/00067

**(22) Date de dépôt international:** 20 janvier 1994 (20.01.94)

**(30) Données relatives à la priorité:**
93/00986 29 janvier 1993 (29.01.93) FR

**(71) Déposants** *(pour tous les Etats désignés sauf US)*: INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE POUR LE DEVELOPPEMENT EN COOPERATION (ORSTOM) [FR/FR]; 213, rue Lafayette, F-75480 Paris Cédex 10 (FR). CENTRE DE COOPERATION INTERNATIONALE EN RECHERCHE AGRONOMIQUE POUR LE DEVELOPPEMENT (CIRAD) [FR/FR]; 42, rue Scheffer, F-75116 Paris (FR).

**(72) Inventeurs; et**
**(75) Inventeurs/Déposants** *(US seulement)*: BUFFARD-MOREL, Jacqueline [FR/FR]; Résidence Pierre-Rouge, 2, rue Beau-Séjour, F-34000 Montpellier (FR). PANNETIER, Catherine [FR/FR]; 19, rue du Docteur-Lombard, F-92130 Issy-les-Moulineaux (FR). VERDEIL, Jean-Luc [FR/FR]; Résidence la Paquière, 91, avenue du Vert-Bois, F-34090 Montpellier (FR).

**(74) Mandataire:** PHELIP, Bruno; Cabinet Harle & Phelip, 21, rue de La Rochefoucauld, F-75009 Paris (FR).

**(81) Etats désignés:** JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

**Publiée**
*Avec rapport de recherche internationale.*
*Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.*

**(54) Title:** PROCESS FOR REGENERATING THE COCONUT PALM FROM EXPLANTS, AND PLANTS OBTAINED BY SUCH PROCESS

**(54) Titre:** PROCEDE DE REGENERATION DU COCOTIER A PARTIR D'EXPLANTS, ET PLANTS OBTENUS PAR CE PROCEDE

**(57) Abstract**

Process for regenerating the coconut palm from explants comprising the following steps: induction of the formation of callus from explants; induction of the embryogenesis on the callus; formation of embryonic structures; maturation of embryos; caulogenesis; rhizogenesis. The maturation of embryos is effected by pricking out said structures in a medium free from activated carbon and auxine, and comprising at least one cytokinine.

**(57) Abrégé**

Procédé de régénération du cocotier à partir d'explants comprenant les étapes de: induction de la formation de cals à partir d'explants, induction de l'embryogenèse sur les cals, obtention de structures embryonnaires, maturation des embryons, caulogenèse et, rhizogenèse. La maturation des embryons est effectuée par repiquage de ces structures sur un milieu dépourvu de charbon actif et d'auxine, et comprenant au moins une cytokinine.

*UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION*

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **AT** | Autriche | **GB** | Royaume-Uni | **MR** | Mauritanie |
| **AU** | Australie | **GE** | Géorgie | **MW** | Malawi |
| **BB** | Barbade | **GN** | Guinée | **NE** | Niger |
| **BE** | Belgique | **GR** | Grèce | **NL** | Pays-Bas |
| **BF** | Burkina Faso | **HU** | Hongrie | **NO** | Norvège |
| **BG** | Bulgarie | **IE** | Irlande | **NZ** | Nouvelle-Zélande |
| **BJ** | Bénin | **IT** | Italie | **PL** | Pologne |
| **BR** | Brésil | **JP** | Japon | **PT** | Portugal |
| **BY** | Bélarus | **KE** | Kenya | **RO** | Roumanie |
| **CA** | Canada | **KG** | Kirghizistan | **RU** | Fédération de Russie |
| **CF** | République centrafricaine | **KP** | République populaire démocratique de Corée | **SD** | Soudan |
| **CG** | Congo | | | **SE** | Suède |
| **CH** | Suisse | **KR** | République de Corée | **SI** | Slovénie |
| **CI** | Côte d'Ivoire | **KZ** | Kazakhstan | **SK** | Slovaquie |
| **CM** | Cameroun | **LI** | Liechtenstein | **SN** | Sénégal |
| **CN** | Chine | **LK** | Sri Lanka | **TD** | Tchad |
| **CS** | Tchécoslovaquie | **LU** | Luxembourg | **TG** | Togo |
| **CZ** | République tchèque | **LV** | Lettonie | **TJ** | Tadjikistan |
| **DE** | Allemagne | **MC** | Monaco | **TT** | Trinité-et-Tobago |
| **DK** | Danemark | **MD** | République de Moldova | **UA** | Ukraine |
| **ES** | Espagne | **MG** | Madagascar | **US** | Etats-Unis d'Amérique |
| **FI** | Finlande | **ML** | Mali | **UZ** | Ouzbékistan |
| **FR** | France | **MN** | Mongolie | **VN** | Viet Nam |
| **GA** | Gabon | | | | |

"Procédé de régénération du cocotier à partir d'explants,et plants obtenus par ce procédé".

La présente invention a pour objet un procédé de régénération du cocotier à partir d'explants .

Elle est également relative aux plants obtenus par ce procédé .

Le cocotier a fait l'objet depuis les vingt dernières années d'un effort de sélection par les méthodes classiques qui ont conduit à l'obtention d'hybrides performants, présentant des rendements deux à trois fois supérieurs à ceux obtenus avec les variétés locales non sélectionnées.

La sélection classique se heurte cependant à différentes contraintes liées aux caractères morphologiques et à la biologie de cette plante :

- une allogamie fréquente responsable de la grande variabilité au sein des descendances et de l'hétérogénéité des plantations;
- des cycles de sélection très longs ( 12 à 16 ans);
- des coefficients de multiplication faibles , le cocotier étant uniquement propagé par graines et le nombre de noix par arbre restant peu élevé,
- une multiplication végétative inexistante dans les conditions naturelles, le cocotier ne possédant qu'un seul bourgeon végétatif en position terminale et ne formant pas de rejets.

La mise au point d'une méthode de multiplication végétative permettrait de contourner ces difficultés et d'obtenir un matériel homogène par clonage d'individus hautement performants, ce qui conduirait à une amélioration sensible de la productivité et de l'homogénéité des plantations.

Meunier et al.( Recent advances in genetic

improvement of coconut yield. In : Pushprajah E., Chew Poh Soon (eds) Cocoa and Coconuts progress and outlook. Kuala Lumpur : Inc. Soc. Plant, pp 719-732 ( 1989)) , estiment que le clonage des meilleurs individus au sein d'une descendance hybride PB 121 devrait permettre théoriquement une augmentation de 24 % des rendements en coprah.

Les tentatives de régénération du cocotier ont abouti à la connaissance des demandeurs à l'obtention de quelques vitroplants mais n'ont pas conduit à la mise en oeuvre d'un procédé reproductible de régénération in vitro à partir d'explants .

Blake et Eeuwens ( Proc. Costed Symposium on Tissue Culture of Economically Important Plants , Singapore, 1981 Ed. A.N. Rao) décrivent les premières tentatives de multiplication in vitro du cocotier . Les auteurs mentionnent l'obtention de plantules à partir de fragments d'inflorescences mais les plants obtenus n'ont pu être enracinés.

Un compte-rendu de Branton et Blake ( 1984, International Conference on Cocoa and Coconuts ) mentionne l'obtention de deux vitroplants mais le procédé utilisé par ces auteurs conduit selon eux au développement, dans environ 90% des cas, de structures embryoïdes anormales .

Buffard-Morel et al. ( Compte-Rendu du 8ème Congrès International sur les Biotechnologies, Paris, 1988) décrivent l'obtention d'une plantule à partir d'explants foliaires. Le milieu de régénération utilisé n'est pas indiqué.

Une revue parue ultérieurement ( Blake, Coconut Micropropagation , in Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.10, Legumes and oil seeds crops ed. Y.P.S. Bajaj, pages 538-544, 1989) mentionne que des plantes ont parfois été obtenues par différentes

équipes mais sans qu'il soit réellement possible de reproduire les conditions d'obtention et d'obtenir de grandes quantités de plantes .

L'article conclut que les résultats peu encourageants enregistrés dans la régénération du cocotier peuvent être expliqués par le fait que l'on s'attendait à ce que les tissus de cocotiers se comportent comme ceux du palmier à huile.

L'article le plus récent mentionnant l'obtention de vitroplants est un article de Verdeil et al. (Oléagineux , 1992 ,Vol. 47, n°7, pages 465-469 ).

Les auteurs mentionnent l'obtention d'une vingtaine de vitroplants . Selon ce procédé des cals sont obtenus sur un milieu additionné de 30 à 80 mg/l d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique ( 2,4-D) en présence de charbon actif (2 ou 3 g/l). Ces cals sont obtenus sur des explants soit foliaires soit inflorescenciels . Ils sont isolés de l'explant à partir du 6ème mois de culture et sont placés sur un milieu enrichi en 2,4-D par rapport à la concentration initiale, afin d'induire une embryogenèse. Les cals évoluent selon deux voies d'embryogenèse décrites par des études histologiques dont l'une conduit plus spécifiquement à la formation de pro-embryons, qui possèdent les caractéristiques des premiers stades de l'embryon zygotique.

La maturation de ces pro-embryons en embryons est obtenue en réduisant progressivement la concentration en 2,4-D utilisée lors de l'étape précédente . Le développement des pousses feuillées est réalisé sur un milieu dépourvu d'hormone et l'émission de racines , ou rhizogénèse , est induite par un traitement auxinique à base d'acide naphtalène acétique (ANA). Néanmoins , cette rhizogénèse peut parfois s'observer spontanément, c'est-à-dire sans traitement

hormonal.

Enfin, l'article de BUFFARD-MOREL et al. (Journal Canadien de Botanique , 1992,70(4): 735-741 ) décrit la formation d'une pousse feuillée sur un massif d'embryons , son isolement du massif et son enracinement. Ce vitroplant poursuit actuellement sa croissance en champ depuis 1989.

Cette plante a été régénérée à partir de cals obtenus sur un milieu gélosé contenant du saccharose , du charbon activé à raison de 2 à 3 g/l , ainsi que du 2,4-D à des concentrations variant de 30 à 60 mg/l.

L'induction de l'embryogenèse sur ces cals est effectuée sur des milieux appauvris progressivement en 2,4-D. Selon les auteurs les concentrations sont abaissées de 0,22 $10^{-4}$ à 0,45 $10^{-4}$ moles/l tous les quatres mois.

Aucune information n'est donnée concernant la maturation des embryons .

Il ressort de l'analyse de l'état de la technique ci-dessus qu'aucun procédé de régénération de cocotiers à partir d'explants , permettant l'obtention de plantes ne présentant pas d'anormalités, dans des conditions industrielles , n'a été décrit .

Les demandeurs se sont donc attachés à la mise au point d'un procédé permettant d'obtenir la multiplication d'un individu adulte donné de cocotier sans le léser, et notamment sans modifier ses capacités de production ou de reproduction .

Un autre objectif des demandeurs est un procédé ne provoquant pas de variabilité dans les plants qui en sont issus. Enfin, un tel procédé doit permettre l'obtention avec un rendement important d'un grand nombre de plants à partir d'un clone déterminé , dans des conditions de production industrielles .

Les demandeurs se sont heurtés au fait que les

méthodes de régénération mises au point pour d'autres plantes tel que le palmier à huile, n'étaient pas transposables à la régénération du cocotier .

Ils ont montré de manière surprenante que l'on pouvait régénérer à partir d'explants obtenus sans léser le donneur , des plantes ayant des caractéristiques morphologiques normales par maturation des embryoïdes en embryons sur un milieu ne comprenant pas de charbon actif et d'auxine mais comprenant au moins une cytokinine.

La présente invention a donc pour objet un procédé de régénération du cocotier à partir d'explants comprenant les étapes de :

- induction de la formation de cals à partir d'explants,
- induction de l'embryogenèse sur les cals ,
- obtention de structures embryonnaires
- maturation des embryons,
- caulogenèse , et
- rhizogénèse.

caractérisé en ce que la maturation des embryons , est effectuée par repiquage de ces structures sur un milieu dépourvu de charbon actif et d'auxine , et comprenant au moins une cytokinine.

Avantageusement, la cytokinine est la 6-benzylaminopurine, la zéatine ( forme libre, riboside ou ribotide), l'isopentényl-adénine ( forme libre, riboside ou ribotide) , la kinétine ou la $N,N_1$-diphénylurée mais elle peut être toute autre cytokinine naturelle ou de synthèse, seule ou en combinaison .

La concentration en cytokinine peut être comprise entre 0,1 et 10 mg/l de milieu , et préférentiellement entre 1 et 5 mg/l. Encore préférentiellement elle sera de l'ordre de 2,25 mg/l de milieu .

Avantageusement , l'induction des cals est effectuée sur un milieu gélosé comprenant une auxine et du charbon actif. Cette auxine est préférentiellement de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique .

L'embryogenèse peut être induite sur les cals par augmentation de la quantité d'auxine dans le milieu gélosé sur lequel ils sont repiqués .

Les structures embryonnaires sont avantageusement obtenues à partir des structures embryogènes par réduction progressive de la quantité d'auxine dans le milieu.

La caulogénèse est avantageusement induite par repiquage des embryons obtenus après maturation , sur un milieu gélosé comprenant du charbon actif et dépourvu de facteur de croissance.

La rhizogénèse si elle n'est pas spontanée , peut être induite par transfert des embryons présentant une pousse feuillée sur un milieu contenant de l'acide naphtalène acétique ( ANA), ou de l'ANA et du charbon actif .

Avantageusement, les explants utilisés dans le procédé et sur lesquels on induit des cals sont des fragments de tissus foliaires ou des fragments d'inflorescence .

Les résultats obtenus dans l'étape de maturation des embryons sur un milieu dépourvu de charbon actif et contenant des facteurs de croissance, sont surprenants. L'homme du métier pour la reproduction <u>in vitro</u> du cocotier ayant plutôt tendance à adjoindre systématiquement du charbon actif dans des milieux contenant des facteurs de croissance .

Les techniques de manipulation des tissus végétaux <u>in vitro</u> ainsi que les techniques générales de régénération des plantes à partir d'explants , pouvant être utilisées dans le cadre de la présente invention

sont celles décrites en particulier dans George E.F. et Sherrington P.D. (1984) Plant Propagation by Tissue Culture ,Exegetics Limited, Eversley, Basingstoke - Hants - RG 27 O9 Y, ENGLAND, Printed by Easter Press, Reading, Berks .

On se référera donc pour la mise en oeuvre du procédé objet de la présente demande à ce manuel général.

Ce procédé est avantageusement destiné à la régénération in vitro du cocotier , et en particulier des génotypes Nain jaune Malais, hybride Nain Jaune Malais x Grand Ouest Africain (PB 121), et hybride Grand Ouest Africain x Nain Rouge du Cameroun (PB111) créés par IRHO/CI, Grand-Ouest Africain, Nain rouge Cameroun et Nain vert .

La présente invention a également pour objet des plants, ou des plantules, obtenus par un procédé de régénération in vitro , caractérisés en ce qu'ils présentent un cotylédon fusiforme et de faible taille par comparaison avec celle d'un cotylédon de plants, ou de plantules, issus de noix d'un même génotype.

Avantageusement de tels plants ou plantules présentent un port plus étalé et des pétioles et des limbes plus courtes par comparaison avec ceux de plants ou de plantules issus de la culture d'embryons zygotiques .

Ils sont susceptibles d'être obtenus par le procédé objet de la présente invention et décrit ci-dessus.

La présente invention est illustrée sans pour autant être limitée par l'exemple suivant dans lequel :

La figure 1 représente un schéma général de mise en oeuvre du procédé objet de l'invention.

Les figures 2 et 3 sont des photographies respectivement d'un vitroplant selon la présente

demande et d'un plant issu d'une noix obtenue par la technique classique de reproduction .

EXEMPLE :

Multiplication in vitro du cocotier à partir de fragments de feuilles et d'inflorescences .

a) Formation de cals.

La callogenèse conduit à la formation de tissu inorganisé ou cal, à partir de fragments de feuilles ou d'inflorescences immatures.

1) collecte du matériel au champ.

Des feuilles immatures ( feuilles de rang F-6 et F-7, FO étant la première feuille déployée) et des inflorescences immatures , situées à l'aisselle des feuilles de rang F+2, F+3, F+4, sont collectées au champ .

Ces deux sources d'explants sont collectées sur des arbres adultes de génotype Nain Jaune Malais, hybride Nain Jaune Malais x Grand Ouest Africain (PB 121), hybride Grand Ouest Africain x Nain Rouge du Cameroun (hybride PB 111) qui sont des hybrides crées par le département oléagineux du CIRAD, sans léser le bourgeon terminal, ce qui permet la survie de la plante-mère.

2) Désinfection du matériel et mise en culture.

Le matériel est désinfecté superficiellement par une solution d'eau de javel du commerce diluée seize fois.

Les explants sont fragmentés sous hotte à flux laminaire, puis chaque fragment est placé dans une solution d'attente anti-oxydante afin d'éviter le brunissement des explants (30 g/l de saccharose, 100 mg/l d'ascorbate de sodium et 150mg/l d'acide citrique).

Les explants sont alors repiqués sur le milieu de callogenèse ayant la composition suivante:

- solution minérale de Eeuwens (Physiol. Plant, 36, 23-28, (1976)) pour les macro et les microéléments,
- vitamines de Morel et Wetmore ( 1951- Fern callus tissue culture. Amer. J. Bot. 38:141-143),
- ascorbate de sodium 100 mg/l
- saccharose 30 g/l,
-2,4-D (Sigma) 44, 55 et 66 mg/l
-charbon actif neutralisé (Sigma) 2 g/l
-bacto agar (Sigma) 7,5 g/l
- eau désionisée Millipore, q.s.p. 1 l.

Le pH est ajusté à 4,5 avant adjonction de l'agar puis du charbon actif.

Les milieux sont distribués dans des tubes de 24 x 160 mm fermés par un capuchon en verre et autoclavés à 115°C pendant 30 minutes.

3) Stockage des explants mis en culture.

Les tubes de culture sont placés à l'obscurité dans une chambre de culture maintenue à 27°C ± 1°C et ils sont incubés pendant plusieurs mois jusqu'à l'apparition des cals (entre 3 et 10 mois suivant les génotypes ).

b) Isolement des cals et induction de l'embryogenèse.

1) Matériel végétal utilisé.

Deux types de cals pouvant être distingués sur des critères morphologiques sont obtenus:

a) des cals nodulaires jaunâtres ,

b) des cals blancs de type granuleux.

L'embryogenèse est obtenue sur les deux types de cals.

Ce type de cal granuleux est obtenu sur explants inflorescenciels, directement à partir des bourgeons floraux durant l'étape de callogenèse. Sur explants foliaires ils apparaissent après l'isolement des cals primaires nodulaires et compacts.

2) Milieu d'embryogenèse et conditions d'obtention de structures embryogènes.

L'embryogénèse est obtenue par repiquage des cals sur deux milieux contenant l'un 80 mg/l de 2,4-D, 2 g/l de charbon, 40 g/l de saccharose et 40 mg/l de sulfate d'adénine (milieu M3), et l'autre 120 mg/l de 2,4-D, 3 g/l de charbon actif, 20 mg/l de sulfate d'adénine et 20 g/l de glucose (milieu G3). La solution minérale utilisée est celle de Murashige et Skoog. (Physiol. Plant, 15, 473-497, (1962)).

Le repiquage des cals sur le milieu d'embryogenèse se fait régulièrement tous les deux mois.

Les cultures sont maintenues à l'obscurité, à 27°C.

Dans ces conditions de culture, des structures embryogènes blanches et épidermisées apparaissent entre 2 et 20 mois après le premier repiquage sur au plus 10% des cals isolés à partir des trois génotypes.

c) Obtention des structures embryonnaires et maturation des embryons.

Les structures blanches et épidermisées sont repiquées sur des milieux progressivement appauvris en 2,4-D. Lorsque les structures embryogènes évoluent en structures embryonnaires, elles sont repiquées sur un milieu dépourvu de 2,4-D et de charbon actif et contenant une cytokinine: la BAP à raison de 2,25 mg/l (milieu CK3).

Le milieu de base est le suivant :

- macro éléments de Murashige et Skoog (MS)
- micro éléments de Murashige et Skoog modifiés par Nitsch (MSNC)( Nitsch (1969) Phytomorph. 19, 389-404)
- vitamines de Morel et Wetmore ( précédemment cités)

- saccharose 30 g/l.

Les structures embryonnaires obtenues sont repiquées tous les deux mois sur ce milieu jusqu'à émission de la première gaine foliaire.

d) Isolement des embryons et caulogenèse.

Les embryons sont transférés, après émission de la première feuille en forme d'écaille sur le milieu suivant : solutions minérales MS et MSNC, hydrolysat de caséine 500 mg/l, saccharose 30 g/l, bacto agar 7,5 g/l et charbon actif 2 g/l. Les embryons peuvent alors être transférés dans une salle lumineuse ( photopériode de 12 heures) . Ils sont repiqués tous les deux mois jusqu'à ce que les pousses feuillées atteignent 5 à 8 cm de hauteur.

e) Enracinement des embryons ayant émis leur pousse feuillée.

Deux types de milieu peuvent être utilisés pour l'enracinement :

- soit un milieu gélosé renfermant le milieu de base standard, 60 g/l de saccharose, 500 mg/l d'hydrolysat de caséine, 20 mg/l d'ANA, 2 g/l de charbon actif, bacto agar 7,5 g/l. Le pH de ce milieu est ajusté à 5,6,

- soit un milieu liquide renfermant le milieu standard, 20 g/l de saccharose et 0,5 à 2 mg/l d'ANA.

Dans le premier cas (a) après apparition des premières racines ( 2 mois environ), le vitroplant est transféré sur un milieu de même composition, mais dépourvu d'ANA et contenant du charbon actif à 2 g/l.

Dans le deuxième cas (b) le vitroplant est transféré après 24 à 48 heures sur le même milieu dépourvu d'ANA mais renfermant 60 g/l de saccharose.

f ) Caractéristiques des plantules obtenues.

Environ quarante vitroplants de différents génotypes ont été obtenues par ce procédé.

Aucun des vitroplants obtenus en tubes ne présente d'anomalies morphologiques.

En début d'émission des pousses feuillées, les vitroplants se distinguent des plants issus de noix obtenues par les techniques classiques de reproduction par les caractéristiques suivantes :

- le cotylédon des plants obtenus in vitro reste très petit et est généralement fusiforme, à la différence de celui de plants issus de la culture d'embryons zygotiques dans lesquels il devient très volumineux et occupe toute la cavité de la noix ,

- les plants obtenus in vitro sont de taille plus faible, à stades de croissance comparables, à ceux issus de noix d'un même génotype ,

- le port des plants obtenus in vitro est différent . Il est plus étalé , les feuilles sont plus ramassées et présentent des pétioles et des limbes plus courts que ceux de plants issus de noix à des stades de croissance comparables.

Ces différences ressortent clairement de la comparaison des photographies des figures 2 et 3 qui représentent respectivement un vitroplant selon l'invention et un plant obtenu classiquement par embryogenèse zygotique . Sur la figure 3, (A) indique le cotylédon.

Les comparaisons données ci-dessus s'entendent pour des plants à des stades de croissance comparables . Ces différences s'estompent progressivement avec le développement des plants.

Il s'agit de comparaisons statistiques représentant les morphologies moyennes des populations.

## REVENDICATIONS

1. Procédé de régénération du cocotier à partir d'explants comprenant les étapes de :

- induction de la formation de cals à partir d'explants,
- induction de l'embryogenèse sur les cals ,
- obtention de structures embryonnaires,
- maturation des embryons,
- caulogenèse et,
- rhizogenèse.

caractérisé en ce que la maturation des embryons est effectuée par repiquage de ces structures sur un milieu dépourvu de charbon actif et d'auxine, et comprenant au moins une cytokinine.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la cytokinine est la 6-benzyl-aminopurine, la zéatine, l'isopentényl-adénine, la kinétine , ou la N, N1-diphénylurée.

3. Procédé selon l'une des revendications 1 à 2, caractérisé en ce que la concentration en cytokinine est comprise entre 0,1 et 10 mg/l de milieu, préférentiellement entre 1 et 5 mg/l de milieu et encore plus préférentiellement est de l'ordre de 2,25 mg/l de milieu.

4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les cals sont induits sur un milieu gélosé comprenant une auxine et du charbon actif.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'auxine est l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'embryogenèse est induite par augmentation de la quantité d'auxine dans le milieu gélosé.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la caulogenèse est induite par repiquage des embryons sur un milieu gélosé comprenant du charbon actif et dépourvu de facteur de croissance .

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la rhizogenèse est induite par transfert des embryons présentant une pousse feuillée sur un milieu gélosé contenant du charbon actif et de l'acide naphtalène acétique .

9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la rhizogenèse est induite par transfert sur un milieu liquide renfermant du saccharose et de l'acide naphtalène acétique.

10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que les explants sont des fragments de tissus foliaires ou d'inflorescences .

11. Plant ou plantule de cocotier susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'une des revendications 1 à 10.

12. Plant ou plantule selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il présente un cotylédon fusiforme et de faible taille par comparaison avec celle d'un cotylédon de plants, ou de plantules, issus de noix .

13. Plant ou plantule selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il présente un port plus étalé et des pétioles et des limbes plus courts par comparaison avec ceux de plants ou de plantules issus de noix d'un même génotype.

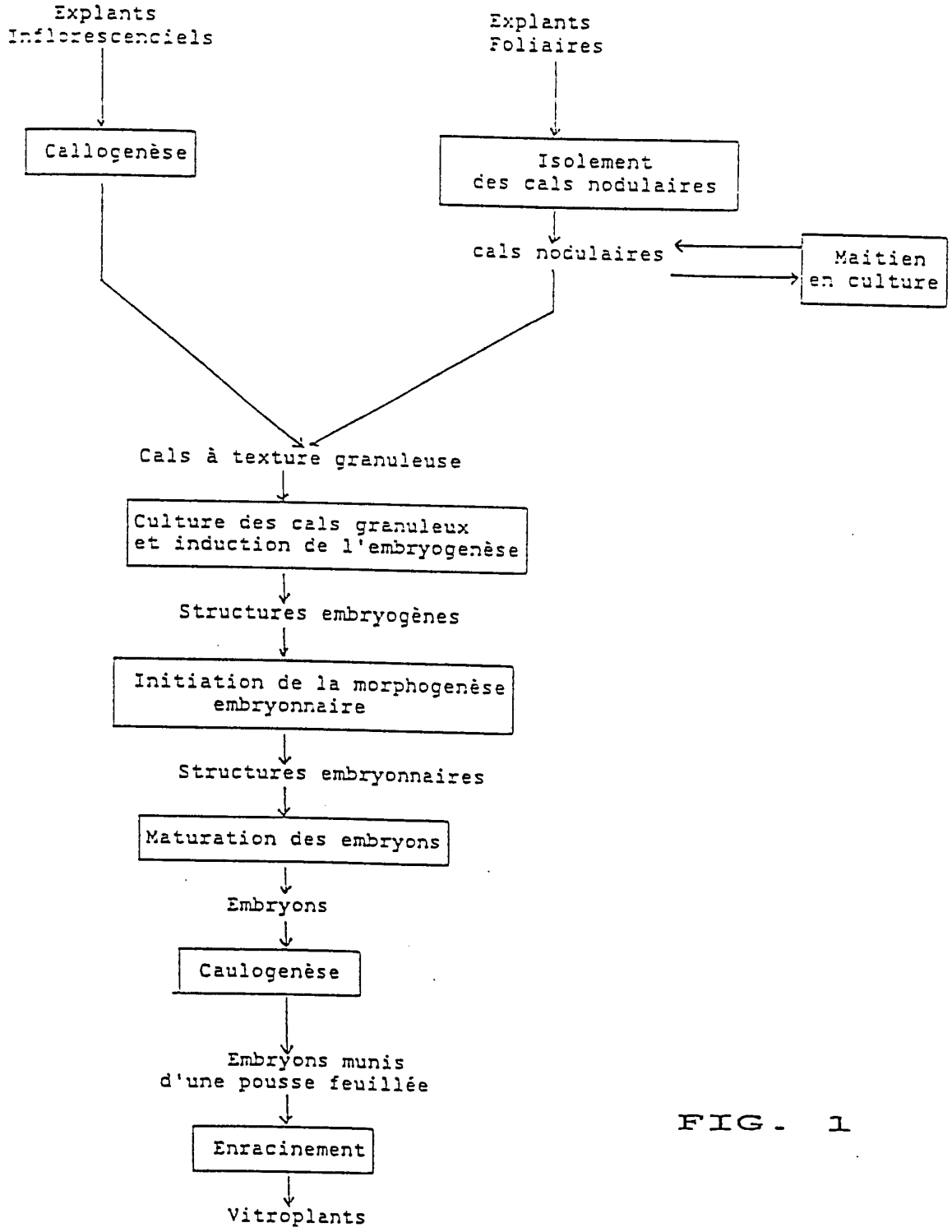
Explants Inflorescenciels
Explants Foliaires
Calloçenèse
Isolement des cals nodulaires
cals nodulaires
Maitien en culture
Cals à texture granuleuse
Culture des cals granuleux et induction de l'embryogenèse
Structures embryogènes
Initiation de la morphogenèse embryonnaire
Structures embryonnaires
Maturation des embryons
Embryons
Caulogenèse
Embryons munis d'une pousse feuillée
Enracinement
Vitroplants

FIG. 1

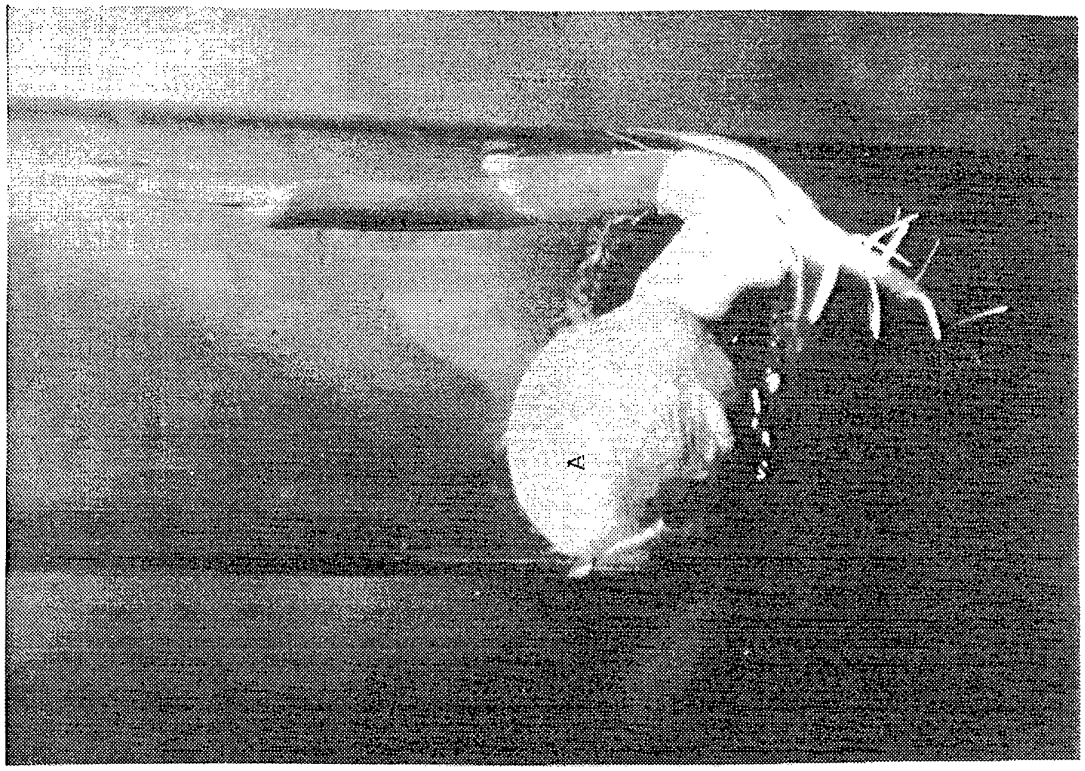


FIG.3

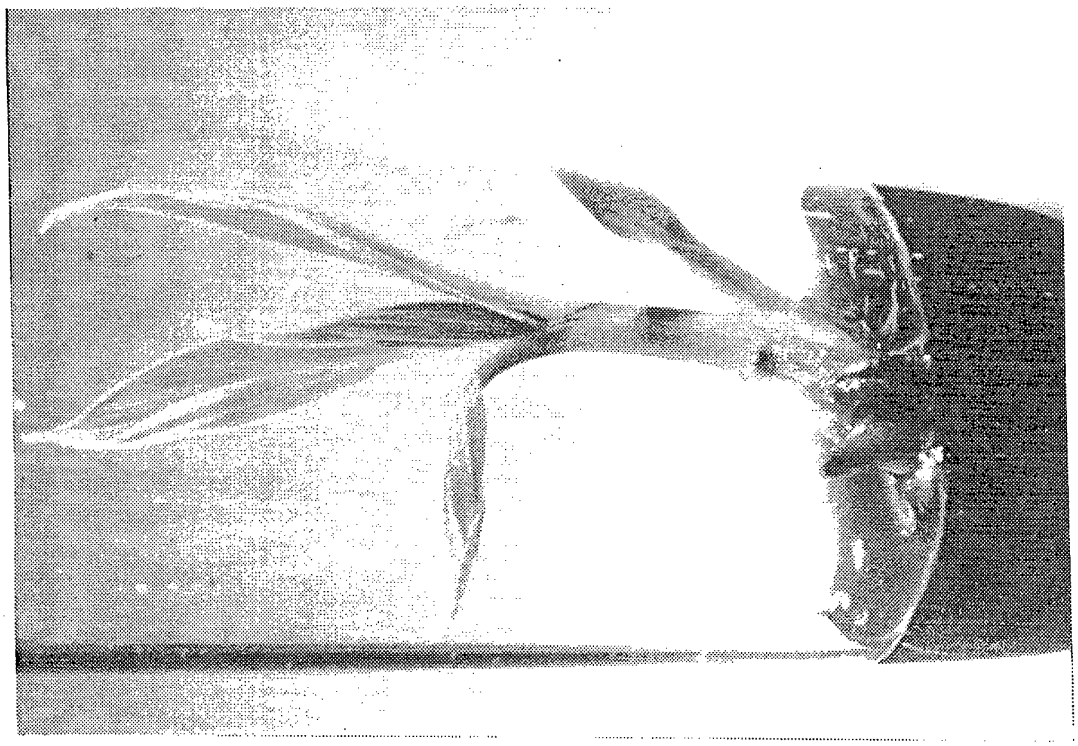

FIG.2

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR 94/00067

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.$^5$ A01H4/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.$^5$ A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| Y | CANADIAN JOURNAL OF BOTANY<br>vol. 70, No 4 , 1992<br>pages 735 - 741<br>J.BUFFARD-MOREL ET AL 'Embryogénèse somatique du coctier (Cocos nucifera L9 à partir d'explants foliaires : étude histologique'<br>cited in the application | 1,11 |
| A | see page 735, right hand column, line 11 - page 740, right hand column, line 46<br>---<br>-/-- | 2-10,12, 13 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 2 May 1994 (02.05.94) | 24 May 1994 (24.05.94) |
| Name and mailing address of the ISA/<br>European Patent Office<br>Facsimile No. | Authorized officer<br><br>Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR 94/00067

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| Y | OLEAGINEUX<br>vol. 47, No 7 , 1992<br>pages 465 - 469<br>J.L.VERDEIL ET AL 'Embryogénèse somatique du cocotier (Cocos nucifera L.) Obtention de plusieurs clones de vitroplants'<br>cited in the application<br>see page 466, left hand column, line 13 - page 467, left hand column, line 27<br>--- | 1,11 |
| A | COCOA AND COCONUTS: PROGRESS AND OUTLOOK; PROCEEDINGS INT.CONF.COCOA AND COCONUTS KUALA LUMPUR 1984 1986 , KUALA LUMPUR<br>pages 771 - 779<br>R.L.BRANTON & J.BLAKE 'Clonal propagation of coconut palm'<br>cited in the application<br>see page 771, line 37 - page 777, line 7<br>--- | 1-11 |
| A | Y.P.S.BAJAJ -ED- 'Biotechnology in agriculture and forestry, Vol.10 Legumes and oilseed crops I'<br>1990 , SPRINGER VERLAG , BERLIN<br>cited in the application<br>Chapter IV.10, pages 538-554, J.BLAKE: "Coconut (Cocos nucifera L.) : Micropropagation".<br>see page 542, line 12 - page 552, line 14<br>--- | 1-11 |
| A | COCOA AND COCONUTS: PROGRESS AND OUTLOOK; PROCEEDINGS INT.CONF.COCOA AND COCONUTS KUALA LUMPUR 1984 1986 , KUALA LUMPUR<br>pages 781 - 786<br>B.G.SMITH 'Tissue culture of Cocos nucifera - biochemical changes preceeding embryogenesis'<br>cited in the application<br>see the whole document<br>--- | 1-11 |
| A | TISSUE CULTURE OF ECONOMICALLY INPORTANT PLANTS, PROCEEDINGS INTERNATIONAL SYMPOSIUMSINGAPORE 1981 1981 , SINGAPORE<br>pages 145 - 148<br>J.BLAKE & C.J.EEUWENS 'Culture of coconut palm tissues with a view to vegatative propagation'<br>see page 146, left hand column, line 1 - page 148, left hand column, line 11<br>--- | 1-10 |

-/--

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR 94/00067

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| A | Y.P.S.BAJAJ -ED- 'Biotechnology in agriculture and forestry, Vol.1 Tress I' 1986 , SPRINGER VERLAG , BERLIN cited in the application Chapter 13, pages 430-450, C.PANNETIER & J.BUFFARD-MOREL: " Coconut palm (Cocos nucifera L.)" see page 438, line 34 - page 449, line 32 --- | 1-10 |
| A | GB,A,2 210 058 (KAO CORPORATION) 1 June 1989 see page 4, line 13 - page 7, line 25; claim 1 --- | 1-5,7-11 |
| A | W.R.SHARP ET AL -EDS- 'Handbook of plant cell culture, Vol.2. Crop species' 1984 , MACMILLAN PUBLISHING COMPANY , NEW YORK Chapter 18, pages 505-545, B.TISSERAT : "Date palm." --- | |
| A | ANNALS OF BOTANY vol. 52 , 1983 R.L.BRANTON & J.BLAKE 'Development of organized structures in callus derived from explants of Cocos nucifera L.' --- | |
| A | F.A.HAMMERSCHLAG & R.E.LITZ 'Biotechnology of perennial fruit crops' 1992 , C.A.B. INTERNATIONAL , WALLINGFORD UK Chapter 16, pages 383-400, A.K.BENBADIS :"Coconut and date palm" ----- | |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No
PCT/FR 94/00067

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---|---|
| GB-A-2210058 | 01-06-89 | JP-A- 1085014 | 30-03-89 |
| | | US-A- 5229290 | 20-07-93 |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem Internationale No
PCT/FR 94/00067

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 5 A01H4/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 5 A01H

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie ° | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|---|---|---|
| Y | CANADIAN JOURNAL OF BOTANY<br>vol. 70, no. 4 , 1992<br>pages 735 - 741<br>J.BUFFARD-MOREL ET AL 'Embryogénèse somatique du coctier (Cocos nucifera L9 à partir d'explants foliaires : étude histologique'<br>cité dans la demande | 1,11 |
| A | voir page 735, colonne de droite, ligne 11 - page 740, colonne de droite, ligne 46 | 2-10,12, 13 |

---

-/--

[X] Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

[X] Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

2

| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale |
|---|---|
| 2 Mai 1994 | 2 4 -05- 1994 |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale<br>Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax (+31-70) 340-3016 | Fonctionnaire autorisé<br>Dissen, H |

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (juillet 1992)

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|---|---|---|
| Y | OLEAGINEUX<br>vol. 47, no. 7 , 1992<br>pages 465 - 469<br>J.L.VERDEIL ET AL 'Embryogénèse somatique du cocotier (Cocos nucifera L.) Obtention de plusieurs clones de vitroplants'<br>cité dans la demande<br>voir page 466, colonne de gauche, ligne 13 - page 467, colonne de gauche, ligne 27<br>--- | 1,11 |
| A | COCOA AND COCONUTS: PROGRESS AND OUTLOOK; PROCEEDINGS INT.CONF.COCOA AND COCONUTS KUALA LUMPUR 1984 1986 , KUALA LUMPUR<br>pages 771 - 779<br>R.L.BRANTON & J.BLAKE 'Clonal propagation of coconut palm'<br>cité dans la demande<br>voir page 771, ligne 37 - page 777, ligne 7<br>--- | 1-11 |
| A | Y.P.S.BAJAJ -ED- 'Biotechnology in agriculture and forestry, Vol.10 Legumes and oilseed crops I'<br>1990 , SPRINGER VERLAG , BERLIN<br>cité dans la demande<br>Chapter IV.10, pages 538-554, J.BLAKE: "Coconut (Cocos nucifera L.) : Micropropagation".<br>voir page 542, ligne 12 - page 552, ligne 14<br>--- | 1-11 |
| A | COCOA AND COCONUTS: PROGRESS AND OUTLOOK; PROCEEDINGS INT.CONF.COCOA AND COCONUTS KUALA LUMPUR 1984 1986 , KUALA LUMPUR<br>pages 781 - 786<br>B.G.SMITH 'Tissue culture of Cocos nucifera - biochemical changes preceeding embryogenesis'<br>cité dans la demande<br>voir le document en entier<br>--- | 1-11 |
| A | TISSUE CULTURE OF ECONOMICALLY INPORTANT PLANTS, PROCEEDINGS INTERNATIONAL SYMPOSIUMSINGAPORE 1981 1981 , SINGAPORE<br>pages 145 - 148<br>J.BLAKE & C.J.EEUWENS 'Culture of coconut palm tissues with a view to vegatative propagation'<br>voir page 146, colonne de gauche, ligne 1 - page 148, colonne de gauche, ligne 11<br>--- | 1-10 |

2

-/--

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|---|---|---|
| A | Y.P.S.BAJAJ -ED- 'Biotechnology in agriculture and forestry, Vol.1 Tress I' 1986 , SPRINGER VERLAG , BERLIN cité dans la demande Chapter 13, pages 430-450, C.PANNETIER & J.BUFFARD-MOREL: " Coconut palm (Cocos nucifera L.)" voir page 438, ligne 34 - page 449, ligne 32 --- | 1-10 |
| A | GB,A,2 210 058 (KAO CORPORATION) 1 Juin 1989 voir page 4, ligne 13 - page 7, ligne 25; revendication 1 --- | 1-5,7-11 |
| A | W.R.SHARP ET AL -EDS- 'Handbook of plant cell culture, Vol.2. Crop species' 1984 , MACMILLAN PUBLISHING COMPANY , NEW YORK Chapter 18, pages 505-545, B.TISSERAT : "Date palm." --- | |
| A | ANNALS OF BOTANY vol. 52 , 1983 R.L.BRANTON & J.BLAKE 'Development of organized structures in callus derived from explants of Cocos nucifera L.' --- | |
| A | F.A.HAMMERSCHLAG & R.E.LITZ 'Biotechnology of perennial fruit crops' 1992 , C.A.B. INTERNATIONAL , WALLINGFORD UK Chapter 16, pages 383-400, A.K.BENBADIS :"Coconut and date palm" ----- | |

2

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs au membres de familles de brevets

Der e Internationale No
PCT/FR 94/00067

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|---|---|---|
| GB-A-2210058 | 01-06-89 | JP-A- 1085014 | 30-03-89 |
| | | US-A- 5229290 | 20-07-93 |