Culture *in vitro* d'embryons zygotiques de cocotier *(Cocos nucifera L.)* Méthode, révisée et simplifiée, d'obtention de plants de cocotiers transférables au champ

B. ASSY BAH (1), T. DURAND-GASSELIN (1), F ENGELMANN (2) et C. PANNETIER (3)

Résumé. — Des améliorations ont été apportées à la technique de culture *in vitro* des embryons zygotiques de cocotier décrite dans nos articles précédents. La suppression de l'haustorium sur des embryons ayant développé une gemmule de 2 à 4 cm a entraîné une meilleure survie des plants après leur passage sur sable. L'augmentation de la concentration en saccharose dans le milieu a permis d'accélérer le développement des embryons. Dans ce cas, le système radiculaire formé sans adjonction d'auxines rhizogènes a été satisfaisant. On a obtenu ainsi, en 5 mois, des plantules vigoureuses ayant un développement harmonieux après leur passage en conditions naturelles.

INTRODUCTION

Depuis plus de trente ans, de nombreux travaux ont été effectués sur la culture *in vitro* des embryons zygotiques de cocotier [Cutter et Wilson, 1954, Abrahams et Thomas, 1962]. Des études ont ensuite été réalisées par l'équipe du Dr De Guzman sur les noix macapuno [De Guzman, 1970, Del Rosario et de Guzman 1976, 1981].

A la suite de ces travaux sur les noix macapuno ainsi que sur d'autres variétés de cocotier, des plantules entières ont été obtenues, mais il n'était plus fait état des résultats du transfert des plantules en conditions naturelles [Del Rosario et De Guzman, 1981 ; Fisher et Tsai, 1978, Gupta *et al.*, 1984] dans d'autres cas les plantules étaient mortes rapidement par pourrissement [Iyer, 1981].

Dans nos articles précédents [Assy Bah, 1986 ; Assy Bah *et al.*, 1987], nous avons décrit une technique de culture *in vitro* des embryons permettant l'obtention de plantules en 2 étapes, le développement du système foliaire étant suivi par celui du système radiculaire en présence d'ANA (Acide Naphtalène Acétique). Cependant, le transfert et la croissance de ces plantules en conditions naturelles posaient encore des problèmes importants.

Nous présentons dans cet article les améliorations apportées à la technique décrite précédemment. Elles concernent, d'une part, la suppression de l'haustorium, dont la présence favorise la mort des plantules après leur passage en prépépinière [Lyer, 1981]. Cette suppression permettrait de réduire le coût de la phase *in vitro*. En effet, l'embryon présente en culture *in vitro* une croissance importante du limbe cotylédonaire [Assy Bah, 1986], ce qui nécessite l'utilisation de tubes de culture de fort diamètre particulièrement coûteux. D'autre part, nous avons cherché à obtenir un développement simultané et harmonieux des systèmes foliaire et radiculaire qui permettrait l'obtention *in vitro* de plantules vigoureuses s'adaptant mieux aux conditions naturelles

(1) IRHO/CIRAD, station de la Mé - 13 B P 989 Abidjan 13 Côte d'Ivoire.

(2) ORSTOM, B.P 5045, 34032 Montpellier, Cedex France

(3) IRHO/CIRAD, Laboratoire de Biologie Cellulaire, INRA, Centre de Versailles, 78026 Versailles Cedex France.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal et conditions de culture.

Le matériel végétal utilisé était constitué d'embryons de semences PB 121 (hybride de Nain Jaune Malais × Grand Ouest Africain) matures ou presque (11 à 12 mois après la fécondation). Les méthodes de prélèvement et de culture *in vitro* des embryons ont déjà fait l'objet de descriptions détaillées [Assy Bah, 1986 ; Assay Bah *et al*, 1987]. On peut rappeler cependant que le milieu de base est constitué par les éléments de la formule de Murashige et Skoog (1962), des vitamines de Morel et Wetmore (1951), de 41 mg/l de complexe Fe-EDTA, de 100 mg/l d'ascorbate de sodium, de saccharose, de 8 g/l d'Agar et de charbon actif à la concentration de 2 g/l. Le pH du milieu est ajusté à 5,5 avant autoclavage. Le milieu de culture est réparti dans des tubes de 24 × 150 mm à raison de 20 ml par tube. Ils sont stérilisés par autoclavage pendant 20 min à 110 °C. Les embryons sont placés à 27 °C et maintenus à l'obscurité jusqu'à la sortie de la gemmule. Ils sont ensuite éclairés 12 heures par 24 heures (3 000 lux).

Méthode expérimentale.

L'étude de l'influence de la suppression de l'haustorium sur le développement des embryons a été réalisée selon le protocole suivant. Les embryons entiers ont été placés sur le milieu décrit précédemment contenant 20 g/l de saccharose, jusqu'à l'apparition d'une gemmule de 2 à 4 cm ou d'une feuille étalée. L'haustorium a alors été supprimé en coupant au niveau de l'étranglement qui sépare le pétiole cotylédonaire de l'haustorium. Les embryons ayant une gemmule de 2 à 4 cm ont été divisés en 2 lots. Une moitié a été repiquée sur le milieu standard, l'autre sur un milieu rhizogène contenant 20 mg/l d'ANA et 60 g/l de saccharose. Les embryons ayant une feuille étalée ont été placés sur le milieu standard. Les cultures ont été repiquées tous les mois.

Méthode de sevrage.

Les plantules débarrassées de leur milieu nutritif ont été mises dans des bacs de sable désinfecté par autoclavage. L'utilisation d'une cloche plastique pendant les deux premiè-

Retour au menu

res semaines, a permis le maintien d'une humidité saturante. Elles ont été arrosées à l'eau pendant 1 mois puis une solution nutritive (définie ci-dessous) leur a été apportée tous les deux jours. Après 2 mois sur sable, les pantules ont été transférées sur du terreau de forêt.

Composition de la solution nutritive utilisée pour le sevrage des plantules mg/l).

KNO_3	274
Ca $(NO_3)^2$, AH_2O	1 095
KH_2PO_4	137
$MgSO_4$, $7H_2O$	274
$(NH4)_2SO_4$	137
Kcl	2,74
H_3BO_3	3
$MnSO_4$, H_2O	1,7
$ZnSO_4$ $7H_2O$	2,74
$(MH_4)6MO_7$ O_{24}, $4H_2O$	2,74
H_2SO_4	0,137
Cu SO_4, $5H_2O$	1,37
EDTA	26,1
$FeSO_4$, $7H_2O$	24,9

RÉSULTATS

Influence de la suppression de l'haustorium sur l'évolution de l'embryon.

La suppression de l'haustorium des embryons ayant une feuille étalée a entraîné un taux de mortalité à 3 mois nettement plus élevé que pour des embryons ayant une gemmule de 2 à 4 cm (Tabl. I). Ces derniers ont présenté un taux de mortalité équivalent à celui d'embryons entiers au même stade de développement. Les embryons avec une gemmule de 2 à 4 cm se sont développés sur milieu standard malgré l'ablation de leur haustorium ; après 5 mois de culture, le nombre de ces embryons ayant une feuille étalée (29/33) n'a pas été significativement différent de celui observé chez les embryons entiers (32/33). Les observations ont également montré que le traitement à l'ANA des embryons au stade gemmule 2 à 4 cm n'avait pas inhibé le développement foliaire mais, au conraire, avait permis le développement simultané des systèmes foliaire et radiculaire.

L'embryon, privé de son haustorium lorsque la gemmule a entre 2 et 4 cm de long, s'est développé normalement *in vitro* et a donné des plantules de petite taille. Dans un autre essai, des embryons entiers ou sans haustorium ont été traités à l'ANA pour leur enracinement. Après leur transfert en conditions naturelles de culture, le taux de survie des plantules sans haustorium, a été de 92 p. 100 (67/73) après 2 mois de prépépinière, résultat très positif par rapport aux 49 p. 100 (22/45) observés sur des plantules avec haustorium. Cependant, après quelques mois de culture en conditions naturelles, la croissance des plantules avec ou sans haustorium est restée lente.

Effet de la teneur en saccharose sur la croissance et le développement des embryons.

Des essais préliminaires nous ont permis d'observer qu'une augmentation de la concentration en saccharose dans le milieu de culture a entraîné un développement plus rapide des embryons, en particulier au niveau du système racinaire qui s'est formée sans utilisation d'auxines rhizogènes. Nous avons donc voulu, dans une deuxième partie, préciser les concentrations optimales de saccharose et observer le développement *in vivo* de ce nouveau type de matériel, dont le système radiculaire s'est développé sans apport d'ANA.

Après leur prélèvement et leur désinfection, les embryons ont été placés sur des milieux contenant 20, 30, 60, 90 ou 120 g/l de saccharose. Après 2 mois de culture, les embryons

TABLEAU I. — **Développement des embryons, avec ou sans haustorium, en fonction du milieu de culture utilisé**
(Embryo development, wish a without haustorium, depending on the culture medium used)

Matériel *(Material)*	Embryons entiers *(Whole embryos)*	Embryons sans haustorium *(Embryos without haustorium)*	Embryons sans haustorium *(Embryos without haustorium)*	Embryons sans haustorium *(Embryos without haustorium)*
Etat de développement *(Stage of development)*	gemmule 2 à 4 cm	gemmule 2 à 4 cm	1 feuille étalée *(1 un furled leaf)*	gemmule 2 à 4 cm
Milieu de culture *(Culture medium)*	standard	standard	standard	enracinement *(rooting)*
Taux de mortalité à 3 mois *(Mortality rate at 3 months)*	0 % 0/49 (1)	2 % 1/49 (1)	74 % 34/46	0 % 0/54
Pourcentage d'embryons ayant une feuille à 3 mois *(Percentage of embryos with a leaf at 3 months)*	97 % 32/33 (1)	24 % 8/33 (1)	—	78 % 42/54
Pourcentage d'embryons ayant une feuille à 5 mois *(Percentage of embryos with a leaf at 5 months)*	97 % 32/33	88 % 29/33	—	92 % 50/54
Nombre de plantules ayant une racine et une feuille 5 mois *(Number of planthets wish a root and a leaf at 5 months)*	24 % 8/33	18 % 6/3	—	74 % 40/54

(1) Differences d'effectifs dues à une contamination de 32 % des embryons entre 0 et 3 mois de culture *(Difference in numbers due to 32 % embryo between 1 and 3 months culturing)*

Retour au menu

cultivés sur 90 g/l de saccharose ont été partagés en 2 lots . une moitié a été laissée sur le même milieu, l'autre repiquée sur 60 g/l de saccharose.

A) Développement *in vitro*.

— Vitesse de germination

L'observation du tableau II montre qu'une augmentation de la concentration en saccharose jusqu'à 60 g/l a permis d'accélérer la germination. En effet, dans cette condition, 70 p. 100 des embryons ont germé après 1 mois de culture contre 44 p. 100 sur le milieu standard, alors que la plus forte concentration en saccharose (120 g/l) ralentit la germination. Mais à 3 mois de culture, l'augmentation de la concentration de saccharose jusqu'à 120 g/l s'avère sans effet sur le taux de germination.

— Croissance de la gemmule

Pour des milieux contenant 20, 30, 60, 90 g/l de saccharose, des plantules ont été obtenues après 5 mois de culture ; celles cultivées sur 60 et 90 g/l de saccharose présentaient un bulbe plus gros et plus vigoureux que celles entretenues sur 20 et 30 g/l de saccharose (Fig. 1). L'émission des feuilles a été retardée et parfois même inhibée lorsque les embryons ont été cultivés sur 120 g/l de saccharose (Tabl. III). A cette concentration la croissance de la gemmule est très lente et le bulbe est hypertrophié (Fig. 1). L'influence défavorable des fortes concentrations en saccharose a été confirmée en observant la croissance de la gemmule des embryons sur la séquence 90-60 g/l de saccharose. Il s'est avéré que l'accroissement en longueur de ces derniers est 3 fois plus élevé que celui des embryons ayant évolué sur 90 g/l de saccharose (résultats non présentés).

— Vitesse d'apparition de la racine

On a observé que plus la concentration en saccharose augmente dans le milieu de culture, plus le nombre de racines émises est important (Tabl. IV). A 2 mois de culture, le nombre de plantules ayant plusieurs racines bien dévelop-

TABLEAU II. — **Evolution du taux de germination des embryons en fonction de la concentration en saccharose du milieu de culture** — *(Evolution of embryo germination rates according to sucrose concentration in culture medium)*

	Concentration en saccharose du milieu de culture (G/L) *(Sucrose concentration in culture medium - g/l)*									
Durée en mois *(Length in months)*	20		30		60		90		120	
1	26/59	44 %	20/49	41 %	40/57	70 %	20/52	38 %	0/12	0 %
2	52/59	88 %	36/49	73 %	53/57	93 %	49/52	94 %	8/12	67 %
3	57/59	97 %	49/49	100 %	56/57	98 %	49/52	94 %	11/12	92 %
4	59/59	100 %	49/49	100 %	57/57	100 %	50/52	96 %	12/12	100 %

TABLEAU III. — **Développement du système foliaire des embryons, après 4 mois de culture, en fonction de la concentration en saccharose du milieu** — *(Embryo leaf system development, after 4 month's culturing, according to sucrose concentration in culture medium)*

Concentration en saccharose (g/l) *(Sucrose concentration)*	20	30	60	90	120	90/60
% d'embryons avec au moins une feuille *(% of embryos with at least one leaf)*	27/59 46 %	24/49 49 %	30/57 53 %	9/18 50 %	1/12 8 %	18/34 53 %

TABLEAU IV. — **Développement du système racinaire des embryons en fonction de la concentration en saccharose du milieu** — *(Embryo root system development according to sucrose concentration in culture medium)*

	Concentration du milieu en saccharose (g/l) *(Sucrose concentration in medium - g/l)*											
	20		30		60		90		120		90/60	
Durée *(Length)*	1 racine *(1 root)*	Plusieurs racines *(Several roots)*	1 racine	Plusieurs racines	1 racine	Plusieurs racines	1 racine	Plusieurs racines	1 racine	Plusieurs racines	1 racine	Plusieurs racines
2 mois *(months)*	28/59 47 %	0/59 0 %	25/49 51 %	0/49 0 %	35/57 61 %	14/57 24 %	13/18 72 %	4/18 22 %	9/12 75 %	4/12 33 %	27/34 79 %	4/34 12 %
3 mois	52/59 88 %	30/59 0 %	0/49 61 %	6/49 12 %	27/57 47 %	27/57 47 %	8/18 44 %	10/18 55 %	7/12 58 %	5/12 42 %	24/34 70 %	7/34 20 %
4 mois	52/59 88 %	0/59 0 %	37/49 75 %	6/49 12 %	25/57 44 %	30/57 53 %	5/18 28 %	13/18 72 %	5/12 42 %	7/12 58 %	22/34 65 %	12/34 35 %

Retour au menu

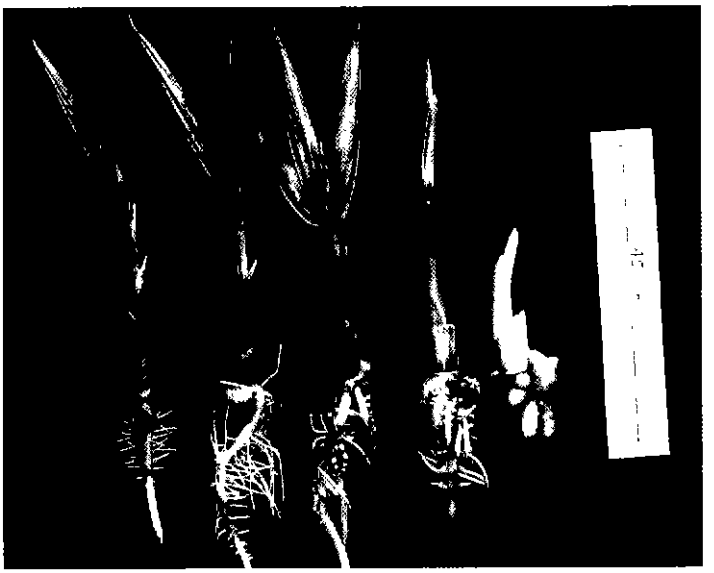


FIG 1. — Plantules obtenues sur (de gauche à droite) 20, 30 60, 90 et 120 g/l de saccharose à 4 mois de culture *in vitro* — *Plantlets obtained on (from left to right) : 20, 30, 60, 90 and 120 g/l of sucrose, 4 months after the start of* in vitro *culturing)*

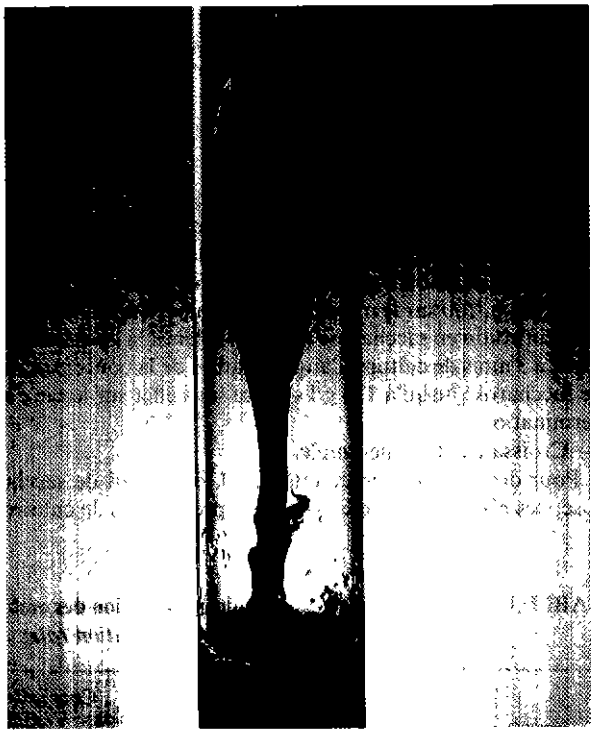


FIG 2 – Plantule obtenue sur 60 g/l de saccharose à 4 mois de culture *in vitro* — *(Plantlet obtained on 60 g/l of sucrose, 4 months after the start of* in vitro *culturing)*

FIG 3. — Développement, après 2 mois de sevrage sur sable, de plantules obtenues sur un milieu contenant 60 g/l de saccharose sans traitement à l'ANA — *(Development, after 2 months' weaning on sand, of plantlets obtained on a medium containing 60 g/l of sucrose, without NAA treatment).*

FIG 4 — Développement du système racinaire de plantules cultivées *in vitro* sur 60 et 20 g/l de saccharose après 2 mois de sevrage (de gauche à droite) — *Root system development of plantlets grown in vitro on 60 and 20 g/l of sucrose, 2 months after weaning - from left to right).*

Retour au menu

TABLEAU V. — **Survie et développement des plantules après leur passage *in vivo* en fonction de la concentration en saccharose du milieu de culture**

(Plantlet survival and development after transfer in vivo, *according to sucrose concentration in the culture medium)*

Concentration en saccharose (g/l) *(Sucrose concentration - g/l)*	20		30		60		90		90/60	
% de plants sevrables *(% of weanable plants)*	5/51	10 %	4/36	11 %	38/52	73 %	11/18	58 %	11/25	44 %
Taux de survie à 2 mois *(Survival rate at 2 months)*	4/5	80 %	3/4	75 %	36/38	95 %	7/11	64 %	10/11	91 %
Taux de survie à 6 mois *(Survival rate at 6 months)*	4/5	80 %	2/4	50 %	35/38	92 %	6/11	54 %	10/11	91 %
Nombre moyen de feuilles émises en 6 mois *(Mean number of leaves emitted in 6 months)*	3		4		5		5		6	

pées est élevé, pour des concentrations en saccharose supérieures ou égales à 60 g/l. Cependant, on observe une hypertrophie du système radiculaire avec 120 g/l de saccharose (Fig. 1).

A 4 mois de culture, les plantules ayant le développement le plus satisfaisant sont celles cultivées sur 60 g/l de saccharose (Fig. 1 et 2). Cependant, les plantules obtenues sur 90 g/l, qui présentent à 4 mois un léger retard, auront un comportement équivalent lors de leur passage en conditions naturelles.

B) Développement des plantules en conditions naturelles.

Après 5 mois de culture *in vitro*, le pourcentage de plantules transférables en conditions naturelles, c'est-à-dire présentant au moins une feuille étalée et une ou plusieurs racines dont la principale a au moins 3 cm de long, est très faible pour les concentrations en saccharose les plus basses (Tabl. V). Après 2 mois de sevrage sur sable (Fig. 3), les plantules obtenues sur 60 et 90 g/l présentent beaucoup plus de racines absorbantes que celles obtenues avec des concentrations plus faibles (Fig. 4). De plus, ces plantules se développent beaucoup plus vite que celles obtenues sur 20 g/l de saccharose ; en effet, la vitesse d'émission est de 5 feuilles en moyenne en 6 mois. Les feuilles obtenues sur 60 et 90 g/l de saccharose ont une morphologie de type bifide (Fig. 5), comme celle observée au cours d'une germination naturelle.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Avec la méthode décrite dans les articles précédents, nous avons obtenu des plantules, présentant une croissance *in vitro* lente, pour l'enracinement desquelles l'emploi d'ANA a été obligatoire. De plus, ces plantules transférées en conditions naturelles sont mortes rapidement ou ont eu une croissance très lente. Cette croissance ralentie pourrait être due à un effet inhibiteur de l'ANA apporté pendant la phase *in vitro* sur le développement ultérieur du système radiculaire. Sachant que la réussite du transfert des plantules en conditions naturelles est une étape indispensable à l'utilisation de la culture *in vitro* pour la collecte et les échanges de germplasm de cocotier, des améliorations ont été donc apportées au procédé de culture *in vitro* des embryons zygotiques de cocotier grâce à plusieurs modifications.

La suppression de l'haustorium après 3 mois de culture des embryons, lorsque la gemmule a 2 à 4 cm de long, a permis d'améliorer le taux de survie des plantules sur sable car l'on n'observe plus de pourrissement du bulbe. De plus, le développement de l'embryon en plantule a pu être réalisé dans des tubes de dimensions standard (24 × 240 mm) au lieu de tubes à fort diamètre (35 × 240 mm). La surface d'étagères en chambre de culture est réduite et l'on diminue ainsi très sensiblement le coût de production des plantules. L'augmentation de la quantité de saccharose dans le milieu jusqu'à 60 ou 90 g/l a permis d'obtenir des plantules vigou-

FIG 5 — Developpement des plantules après 6 mois en conditions naturelles, en fonction de la concentration en saccharose du milieu de culture *in vitro* (de gauche à droite : 90, 60, 30 et 20 g/l) *(— Plantlet development after 6 months under natural conditions, according to sucrose concentration in the* in vitro *culture medium — from left to right 90, 60, 30 and 20 g/l).*

Retour au menu

FIG 6. — Développement au champ d'une plantule *in vitro* 2 ans après la sortie de tube — *(Development in the field of a plantlet obtained in vitro. 2 years after removal from the tube)*

reuses et nettement moins étiolées que celles obtenues dans les conditions précédentes. D'autre part, le système racinaire s'est formé sans apport d'auxine avant l'ouverture de la première feuille, comme au cours de la germination de la noix. De plus, le développement des feuilles et des racines a été simultané. L'émission rapide des racines *in vitro* a pu cependant, en présence d'une trop forte concentration de saccharose, entraîner une hypertrophie du bulbe et des racines, qui a ralenti le développement du système foliaire. En présence de faibles concentrations en sucre, la formation du système racinaire a nécessité l'emploi d'ANA qui a été défavorable au développement des plantules en conditions naturelles Le développement simultané des feuilles et des racines sur 60 ou 90 g/l de saccharose a permis de raccourcir la durée de culture *in vitro* des plantules d'environ 2 à 3 mois. On a obtenu des plants sevrables 5 mois après la mise en culture des embryons. Enfin, il a été montré par ailleurs que l'utilisation de milieux plus riches en sucre, lors de mises en culture en conditions de prospection, n'entraînait pas d'augmentation du taux de contamination.

Ainsi, les conditions de culture *in vitro* des embryons zygotiques de cocotier sont maîtrisées. Le développement de l'embryon en plantule se fait sur un seul milieu de culture avec suppression de l'haustorium à 3 mois. Après 5 mois de culture *in vitro*, 73 p. 100 des plantules ont été transférées en conditions naturelles. Le taux de survie à 6 mois a été de 92 p. 100 et la vitesse d'émission des feuilles (5 feuilles en 6 mois) est équivalente à celle observée chez une germination de graine. Après leur transfert au champ, les plantules ont un développement normal (Fig. 6).

Ces résultats permettent, dès maintenant, de proposer une méthode simplifiée (Fig. 7) de culture *in vitro* d'embryons zygotiques de cocotier permettant l'obtention de plantules vigoureuses ayant un développement harmonieux en conditions naturelles.

Remerciements. — *Ce travail a pu être réalisé grâce au soutien financier de l'IBPGR.*

Travaux effectués *(Work carried out)*	Résultats *(Results)*		Durée de culture *(Time)*
	%	Effectifs *(Effectives)*	
Mise en culture d'une centaine d'embryons matures sur un milieu contenant 60 g/l de saccharose *(Around 100 embryos cultured on medium containing 60 g of sucrose)*		100	
Repiquage *(Transfer)*	5 à 20 % de contamination *(Contamination rate)*	80 à 95	1 mois *(month)*
Repiquage	70 à 90 % de germination *(germination rate)*	56 à 86	2 mois
Suppression de l'haustorium Repiquage *(Haustrium eliminated)*			3 mois
Repiquage			4 mois
Transfer en prépépinière sur sable *(Transfert to prenursery on sand)*	73 à 90 % de plantules sevrables *(73 to 90 % of plantlets suitable for weaning)*	41 à 77	5 mois
Transfert en prépépinière sur terreau *(Transfer to prenursery on leaf mould)*	92 à 98 % des plants transférables *(92 to 98 % of plants suitable for transfer)*	38 à 75	7 mois
Transfert au champ *(Transfer on the field)*	100 % des plants transférab. *(100 % of plants suitable for transfer)*	38 à 75	11 mois

FIG 7 — **Représentation schématique et performances du procédé de culture *in vitro* des embryons matures de cocotier** — *(Schematic representation and performance of the mature coconut embryo in vitro culture process).*

Retour au menu

BIBLIOGRAPHIE

[1] ABRAHAMS A et THOMAS K J. (1962). — A note on the vitro culture on excised coconut embryos — *Indian coconut J*, **15**, 2. p. 84-87

[2] ASSY-BAH B (1986). — Culture *in vitro* d'embryons zygotiques de cocotiers — *Oléagineux 41*, 7, p 321-328.

[3] ASSY-BAH B., DURAND-GASSELIN T. et PANNETIER C. (1987). — Use of zygotic embryo culture to collect germplasm of coconut — *FAO/IBPGR Plant Genetic Ressources Newsletter*, **71**, p. 4-10.

[4] CUTTER V M. et WILSON K S. (1954) — Effect of coconut endosperm and other growth stimulants, upon the development *in vitro* of embryos of *Cocos nucifera* — *Bot. Gaz* **115**, p. 234-240

[5] DE GUZMAN E. V. (1970). — The growth and development of coconut « Makapuno » embryos *in vitro*. I. The induction of rooting — *Philip. Agric. 53*, **2**, p. 65-78.

[6] DEL ROSARIO A. G et DE GUZMAN E. V. (1976) — The growth of coconut « Makapuno » embryos *in vitro* as affected by mineral composition and sugar level of medium during the liquid and solid cultures — *Philip J. Sci.* **105**, p 215-222.

[7] DEL ROSARIO A G. et DE GUZMAN E V. (1981) — The status of the plant tissue culture in Philippines — *In* : Rao A N. (ED) Tissue Culture of Economically Important Plants (Proc Int Symp Singapore, COSTED, ANBS), p 292-294.

[8] FISHER J B. et TSAI J H. (1978) — *In vitro* growth of embryos and callus of coconut palm — *In vitro*, 14. **3**, p 307-311.

[9] GUPTA P.K., KENDURKAR S.V., KULKARNI V.M., SHIGURKAR M V, MASCARENHAS A. F (1984) — Somatic embryogenesis and plants from zygotic embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro* — *Plant Cell Reports*, **3**, p 222-225.

[10] IYER R D. (1981). — Embryo and tissue culture for crop improvement, especially of perennials, germplasm conservation and exchange — *In* : Rao A. N (Ed) Tissue Culture of Economically Important Plants (Proc Int Symp. Singapore, COSTED, ANBS), p 229-230

[11] MOREL G. et WETMORE R M. (1951). — Fern callus tissue culture — *Am J Bot*, **38**, p 141-143.

[12] MURASHIGE T. et SKOOG F (1962). — A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture — *Physiol Plant*, **15**, p. 473-497

SUMMARY

The *in vitro* culture of coconut (*cocos nucifera* L.) zygotic embryos. Revised and simplified method for obtaining coconut plantlets suitable for transfer to the field.

B. ASSY BAH, T. DURAND-GASSELIN, F. ENGELMANN and C. PANNETIER, *Oléagineux*, 1989, **44**, N° 11, p. 515-523.

Improvements have been made to the technique for *in vitro* culture of coconut zygotic embryos described in previous articles Elimination of the haustorium on embryos with a gemmule 2 to 4 cm long leads to a better survival rate after transfer to sand Increasing the sucrose concentration in the culture medium makes it possible to speed up embryo development. In this case, the root system, formed without the addition of rhizogenesis auxin, is satisfactory. In this way, sturdy plantlets, which develop well after transfer to natural conditions, have been obtained in five months.

RESUMEN

Cultivo *in vitro* de embriones zigo'ticos de cocotero (*cocos nucifera* L.) Método revisado y simplificado de obtencio'n de plantones de cocotero que puedan transferirse al campo.

B ASSY BAH, T. DURAND-GASSELIN, F. ENGELMANN, C. PANNETIER, *Oléagineux*, 1989, **44**, N° 11, p. 515-523

La técnica de cultivo *in vitro* de embriones zigóticos de cocotero que se describió en nuestros articulos anteriores se ha mejorado Se suprimió el haustorio en embriones que desarrollaron una gémula de 2 a 4 cm, lo cual mejoró las condiciones de supervivencia de los plantones después de haberse transferido a arena. El aumento de la concentración de sacarosa en el medio produjo una acelaración del desarrollo de los embriones. En tal caso, el sistema radicular formado sin agregarse auxinas rizógenas resultó satisfactorio. Asi se obtuvo en un plazo de 5 meses plántulas vigorosas con desarrollo harmonioso después de pasarlas a condiciones naturales.

The *in vitro* culture of coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryos. Revised and simplified method for obtaining coconut plantlets suitable for transfer to the field

B. ASSY BAH (1), T. DURAND-GASSELIN (1), F. ENGELMANN (2) and C. PANNETIER (3)

INTRODUCTION

For over thirty years, much work has been carried out on the *in vitro* culture of coconut zygotic embryos [Cutter and Wilson, 1954 ; Abrahams and Thomas, 1962]. Dr De Guzman's team then conducted studies of macapuno nuts [De Guzman, 1970 ; Del Rosario and De Guzman 1976, 1981].

Following this work on macapuno nuts and other coconut varieties, whole plantlets were obtained, but either no results were given for plantlet transfer to natural conditions [Del Rosario and De Guzman, 1981 ; Fisher and Tsai, 1978 ; Gupta *et al*, 1984] or the plantlets rotted and died rapidly [Iyer, 1981].

In our previous articles [Assy Bah, 1986 ; Assy Bah *et al.*, 1987] [3], we described an *in vitro* embryo culture technique which made it possible to obtain plantlets in two stages, with leaf system development followed by root system development in the presence of NAA (Naphthalene Acetic Acid) However, transferring the plantlets to natural conditions, and their subsequent growth, still posed major problems

This article sets out the improvements made to the technique described previously. These concern the elimination of the haustorium, whose presence is more likely to lead to plantlet death after transfer to the prenursery [Iyer, 1981]. Its elimination means that the cost of the *in vitro* phase can be reduced. In fact, the cotyledonary lamina grows significantly in *in vitro* culture [Assy Bah, 1986], which

(1) IRHO/CIRAD La Mé station - 13 B P 989 Abidjan 13 Côte d'Ivoire.

(2) ORSTOM, B P 5045, 34032 Montpellier Cedex France.

(3) IRHO/CIRAD. Cellular Biology Laboratory - INRA. Centre de Versailles, 78026 Versailles Cedex France.

Retour au menu

necessitates the use of particularly costly, large diameter culture tubes In addition, we have attempted to obtain simultaneous and harmonious development of the leaf and root systems, to enable *in vitro* production of sturdy plantlets more capable of adapting to natural conditions.

MATERIAL AND METHODS

Planting material and culturing conditions.

The planting material used consisted of embryos from PB 121 seednuts (Malayan Yellow Dwarf × West African Tall hybrid), either mature or almost (11 to 12 months after pollination) The methods for embryo sampling and *in vitro* embryo culture have already been described in detail [Assy Bah, 1986 ; Assy Bah *et al.*, 1987] It should be remembered, however, that the basic medium comprises Murashige and Skoog's mineral solution (1962), Morel and Westmore's vitamin compound (1951), 41 mg/l of Fe-EDTA complex, 100 mg/1 of sodium ascorbate, sucrose, 8 g/l of agar and 2 g/l of activated charcoal. The pH is adjusted to 5.5 and the medium is then placed in an autoclave. 20 ml of medium are placed in each 24 × 150 mm tube The tubes are sterilized in the autoclave for 20 minutes at 110 °C The embryos are placed at 27 °C and kept in the dark until the gemmule emerges. They are then exposed to light for 12 out of every 24 hours (3,000 lux).

Experimental method.

A study of the effect on embryo development of eliminating the haustorium was carried out in the following way. The whole embryos were placed on the medium described above, containing 20 g/l of sucrose, until a 2 to 4 cm gemmule or an unfurled leaf was obtained. The haustorium was then eliminated by cutting at the constriction separating the cotyledonary petiole from the haustorium. Embryos with a gemmule 2 to 4 cm long were split into 2 batches. Half were transferred to the standard medium, half to a rooting medium containing 20 mg/l of NAA and 60 g/l of sucrose. Embryos with an unfurled leaf were placed on the standard medium. The embryos were transferred monthly.

Weaning method.

Once removed from the culture medium, the plantlets were placed on sand, sterilized beforehand in an autoclave. Using a plastic cloche during the first two weeks made it possible to maintain maximum relative humidity conditions. They were watered with water alone for the first month, and then a nutritive solution (described below) was applied every two days. After two months on sand, the plantlets were transferred to forest leaf mould.

Composition of the nutritive solution used for weaning plantlets (mg/l).

KNO_3	274
$Ca\ (NO_3)^2\ 4H_2O$	1 095
KH_2PO_4	137
$MgSO_4\ 7H_2O$	274
$(NH_4)_2SO_4$	137
KCl	2 74
H_3BO_3	3
$MnSO_4\ H_2O$	1.7
$ZnSO_4\ 7H_2O$	2.74
$(NH_4)\ 6MO_7O_{24}\ 4H_2O$	2.74
H_2SO_4	0 137
$CuSO_4\ 5H_2O$	1.37
EDTA	26.1
$FeSO_4\ 7H_2O$	24.9

RESULTS

The effect on embryo development of eliminating the haustorium.

Eliminating the haustorium on embryos with one unfurled leaf resulted in a mortality rate at 3 months markedly higher than for embryos with a gemmule 2 to 4 cm long (Table I) The latter had a mortality rate equivalent to that for whole embryos at the same stage of development. The embryos with a gemmule 2 to 4 cm long developed on the standard medium, despite having their haustoria removed ; after 5 months' culturing, the number of such embryos with one unfurled leaf (29/33) did not differ significantly from that observed with whole embryos (32/33). Observations also showed that treating embryos with auxin at the 2 to 4 cm gemmule stage had not inhibited leaf development but, on the contrary had enabled simultaneous leaf and root system development.

Those embryos which had their haustoria removed when the gemmule was 2 to 4 cm long developed normally *in vitro*, and produced small plantlets. In another trial, whole embryos and embryos with their haustoria removed were treated with NAA to encourage rooting. After transfer to natural conditions, the survival rate for plantlets without haustoria was 92 % (67/73) after two months in the prenursery, a very positive result compared with the 49 % (22/45) observed for plantlets with haustoria. However, after a few months under natural conditions, plantlet growth, both with and without haustoria remained slow

The effect of sucrose content on embryo growth and development.

Preliminary trials demonstrated that increasing the sucrose concentration of the culture medium led to faster embryo development, particularly the root system, which formed without rooting auxin applications. We then wished to ascertain the optimum sucrose concentrations and observe the *in vivo* development of this new planting material, whose root system developed without NAA applications.

After sampling and disinfection, the embryos were placed on media containing 20, 30, 60, 90 and 120 g/l of sucrose. After 2 months' culturing, the embryos cultured on 90 g/l of sucrose were split into 2 batches half were left on the same medium, half transferred to 60 g/l of sucrose.

A) *In vitro* development.

— Germination rate

Table II shows that increasing the sucrose concentration to 60 g/l made it possible to speed up germination. In fact, under these conditions, 70 % of the embryos had germinated after 1 month's culturing, as against 44 % on the standard medium. The highest sucrose concentration (120 g/l) slows germination, but on 3 months' culturing, increasing the sucrose concentration to 120 g/l proved to have had no effect on germination.

— Gemmule growth

For media containing 20, 30, 60 and 90 g/l of sucrose, plantlets were obtained after 5 months' culturing ; those cultured on 60 and 90 g/l of sucrose had a larger and more sturdy root bulb than those maintained on 20 and 30 g/l of sucrose (Fig. 1) Leaf emission was delayed and sometimes even blocked with embryos cultured on 120 g/l of sucrose (Table III). At this concentration, gemmule growth was very slow and the root bulb hypertrophied (Fig. 1). The negative effect of high sucrose concentrations was confirmed by observing the gemmule growth of the embryos on the 90-60 g/l sucrose sequence It transpired that they grow three times faster than those of embryos on 90 g/l of sucrose (results not shown).

— Speed of root emission

It was noted that the higher the sucrose concentration in the culture medium, the more roots were emitted (Table IV). After 2 months' culturing, the number of plantlets with several welldeveloped roots was high for sucrose concentrations of 60 g/l or more. However, the root system was seen to hypertrophy with 120 g/l of sucrose (Fig 1)

After 4 months' culturing, the most satisfactory growth was observed with plantlets cultured on 60 g/l of sucrose (Fig. 1 and 2). However, the plantlets obtained on 90 g/l, which were slightly behind at 4 months, performed equally well when transferred to natural conditions.

B) Plantlet development under natural conditions.

After 5 months' *in vitro* culture, the percentage of plantlets suitable for transfer to natural conditions, *i.e.* with at least one unfurled leaf and one or several roots, the principal root being at least 3 cm long, was very low for the lowest sucrose concentrations (Table V). After 2 months' weaning on sand (Fig 3), the plantlets obtained on 60 and 90 g/l had many more absorbing roots than those obtained on lower concentrations (Fig. 4). In addition, these plantlets developed much faster than those obtained on 20 g/l of sucrose ; in fact, the average rate of emission was 5 leaves in 6 months. The leaves obtained on 60 and 90 g/l of sucrose had a bifid type morphology (Fig. 5), as would be seen with natural germination.

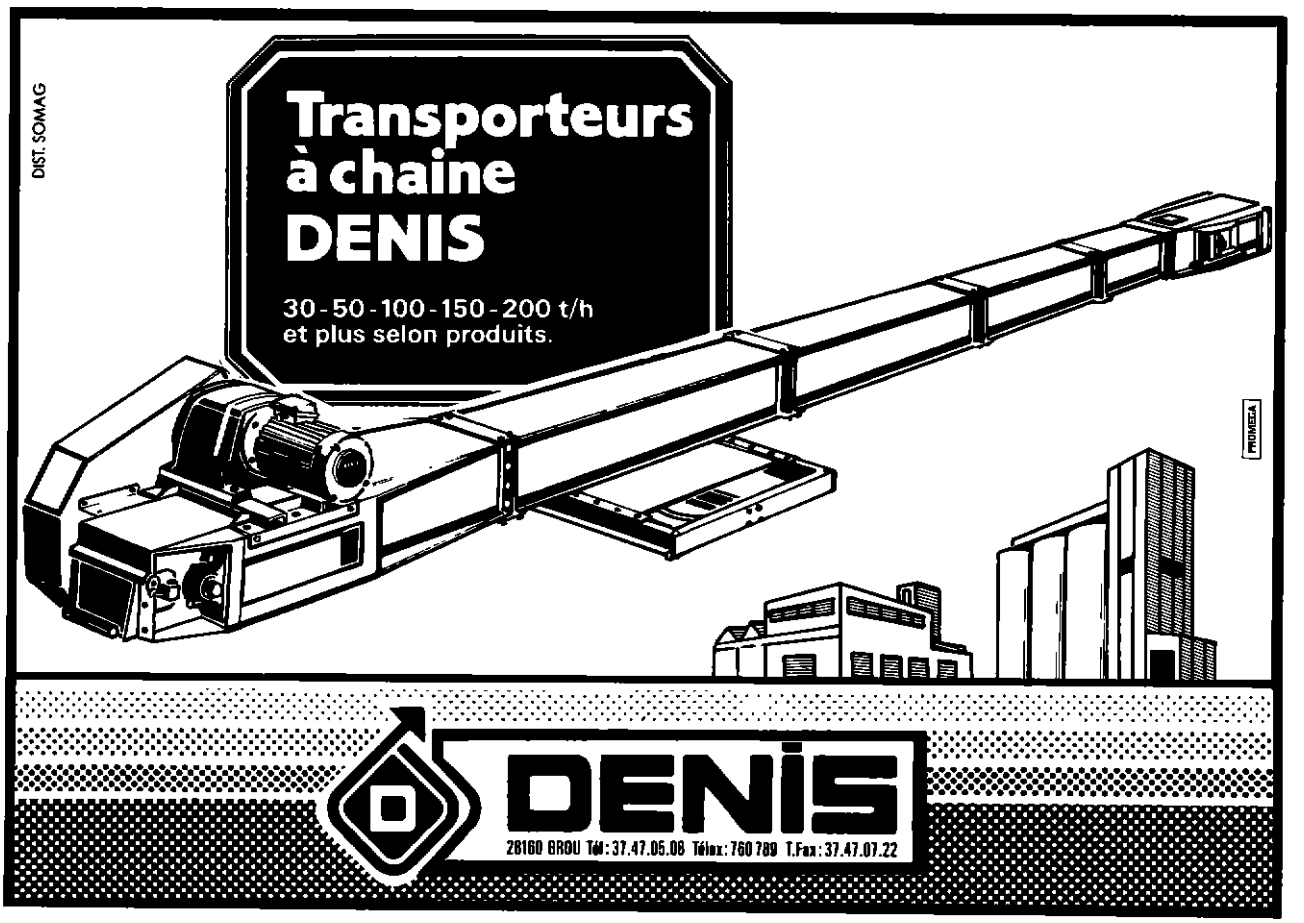
DISCUSSION AND CONCLUSION

Using the method described in previous articles, we obtained plantlets with slow growth *in vitro*, which needed NAA applications

Retour au menu

to ensure rooting In addition, once the plantlets were transferred to natural conditions, they either died rapidly or grew very slowly. This slow growth may have been due to the inhibitory effect on future root system development of the NAA applied during the *in vitro* phase. Given that the successful transfer of plantlets to natural conditions is an essentiel stage in using *in vitro* culture for coconut germplasm collection and exchanges, the *in vitro* culture technique for coconut zygotic embryos was improved through several modifications.

Eliminating the haustorium after 3 months' embryo culturing, when the gemmule was 2 to 4 cm long, increased the plantlet survival rate on sand, since the root bulbs did not rot. Furthermore, embryo development into plantlets was possible in standard sized tubes (24 × 240 mm) rather than large diameter tubes (35 × 240 mm). Shelf space in the culture room, hence plantlet production costs, were reduced markedly. Increasing the sucrose concentration in the medium to 60 or 90 g/l made it possible to obtain sturdy plantlets, significantly less etiolated than those obtained under previous culture conditions. In addition, the root system formed without auxin applications before the first leaf unfurled, as with nut germination, and leaf and root development was simultaneous However, rapid *in vitro* root emission may have been responsible for hypertrophied root bulbs and roots when sucrose concentrations were too high, which slowed down leaf system development. In the presence of low sucrose concentrations, NAA was necessary for root system formation, but proved unfavourable to plantlet development under natural conditions. Simultaneous leaf and root development on 60 and 90 g/l of sucrose meant that the *in vitro* culture period could be shortened by around 2 to 3 months. Plants suitable for weaning were obtained 5 months after the start of embryo culture. Lastly, it has been shown elsewhere that using media with higher sucrose contents for culturing under survey conditions does not increase the contamination rate

The conditions for the *in vitro* culture of coconut zygotic embryos have now been mastered. Embryo development into plantlets is obtained on a single culture medium, with the haustorium removed at 3 months After 5 months' *in vitro* culturing, 73 % of the plantlets were transferred to natural conditions. The survival rate at 6 months was 92 %, and the leaf emission rate (5 leaves in 6 months) equivalent to that observed with seednut germination. After transfer to the field, plantlets developed normally (Fig. 6). These results mean that it is now possible to propose a simplified method (Fig. 7) for the *in vitro* culture of coconut zygotic embryos, enabling sturdy plantlets to be obtained with develop harmoniously under natural conditions.

Acknowledgements. — *This work was made possible by financial support from IBPGR.*