Les Actes du BRG, 6 (2006) 449-468
© BRG, 2006

Article original

Optimisation du procédé de cryoconservation de la plumule de cocotier

Bernard MALAURIE[(1)*], HD. Dharshani BANDUPRIYA[(2)], Shyama C. FERNANDO[(2)], Jean-Luc VERDEIL[(1)]

[(1)] UMR 1098 BEPC, IRD, BP 64501, 911 Av Agropolis, 34394 Montpellier Cedex 5, France
[(2)] Coconut Research Institute, Tissue Culture Division, LUNUWILA, 61150, Sri Lanka

Abstract: Optimization process of coconut plumule cryopreservation. The coconut is a plant with recalcitrant oleaginous seed, one of the largest of the plant kingdom with embryo with no dormancy. It has a great socio-economic impact and is also well known for coconut water, coconut milk which get unequalled nutritive characteristics. Detailed analyses have been point out the important presence of certain nutritive elements with high concentration in sorbitol and certain growth regulators (cytokinin) with uncommon rates on seeds. In order to improve the percentage of success in survival and in recovery of encapsulated-dehydrated cryopreserved plumules, the addition of sorbitol and ABA (abscisic acid), which is known to have an effect on dormancy maintenance, on water balance and stress tolerance acquisition, were studied on embryos from Sri Lankan Tall ecotype under three types of conditioning (embryo set on albumen core or simply on top of solidified agar or immersed into KCl solution). The conditioning shows that the surrounding medium around the embryo (albumen or medium supply) was not primodial, as in agar support the only presence of water is sufficient to the good maintenance of embryos and to the good reactivity of plumules used in different pretreatments. ABA present an important significant effect depending treatments on survival and recovery of the development of the gemmule, in comparison to sucrose 0.75 M cryoprotector. According to in progress analysed data, this effect was not observed for sorbitol.

ABA/ encapsulation-dehydration/ gemmule development/ histology/ sending explant conditionning

Résumé : Le cocotier, plante oléagineuse à intérêt socio-économique important, est aussi connu pour son eau de coco (albumen liquide) et son lait de coco aux caractéristiques nutritives uniques. Des analyses fines ont mis en relief l'importance de certains éléments nutritifs avec de fortes concentrations en sorbitol, et en certains régulateurs de croissance (cytokinines) à des taux peu communs chez les graines. Afin d'améliorer les pourcentages de réussite à la survie et à la reprise des plumules cryoconservées par la technique d'encapsulation/déshydratation, l'adjonction de

* Correspondance et tirés à part : Bernard.Malaurie@mpl.ird.fr

sorbitol et d'ABA (acide abscissique) a été étudiée sur des embryons issus de l'écotype Grand du Sri Lanka provenant de trois types de conditionnement pour l'envoi (embryon conditionné, avant expédition, dans sa carotte d'albumen ou simplement posé sur un support gélosé ou immergé dans une solution de KCl). Le conditionnement montre que le milieu entourant l'embryon (albumen ou apport de milieu) n'est pas primordial, un support gélosé seul, sans milieu de culture, suffit au bon maintien des embryons et à la bonne réactivité des plumules utilisées après les différents prétraitements. L'ABA présente un effet significatif important selon le prétraitement, sur la survie et la reprise du développement par rapport au cryoprotecteur sacchaorose 0,75 M. Selon l'analyse des données en cours, cet effet n'a pas pu être mis en évidence pour le sorbitol.

ABA/ conditionnement des échantillons avant envoi/ encapsulation-déshydratation/ développement de la gemmule/ histologie

1. INTRODUCTION

Le cocotier (*Cocos nucifera* L.) est une plante oléagineuse pérenne cultivée dans plus de 90 pays sur près de 12 millions d'hectares. Il joue un rôle socio-économique primordial dans toute la zone intertropicale humide, en assurant un revenu monétaire à des millions de petits planteurs. Ces derniers assurent 95 % de la production mondiale, sur des plantations de 0,2 à 4 ha [20], [27]. Cette plante leur fournit également les matières indispensables à leur vie : nourriture, boisson, habitat. C'est ainsi que le cocotier est parfois dénommé « l'arbre aux cent usages ». Cette plante connue pour la production en huile de coprah (albumen déshydraté) est aussi connue pour son eau et son lait de coco (albumen liquide) dont les caractéristiques nutritives en font un des apports nutritifs les plus utilisés en nutrition infantile [3], [10], mais également dans le domaine de la culture *in vitro* des plantes [36],[32], [11], [43]. Des analyses fines du lait de coco ont mis en relief l'importance de certains éléments nutritifs dont 3 hexitols (sorbitol, *scyllo*-inositol, *myo*-inositol) présentant de fortes concentrations (sorbitol : 15 000 ppm) ; *scyllo*-inositol : 500 ppm ; *myo*-inositol : 100 ppm) [38]. Bien que l'étude menée par ces auteurs sur l'activité de ces hexitols sur la croissance de tissus de carotte ait montré une moindre réactivité du sorbitol par rapport au *myo*-inositol, il demeure important d'en vérifier l'action sur la culture de tissus de cocotier. Par ailleurs, le sorbitol, non détecté dans l'haustorium [partie distale du cotylédon qui joue un rôle de suçoir], a présenté une concentration élevée (autour de 6 $g.l^{-1}$) dans l'eau de coco [26]. Le sorbitol fait partie des cryoprotecteurs les plus communément utilisés et ajoutés dans le milieu de préculture avec un autre polyol (mannitol) et chez les sucres, le saccharose et le glucose [12]. Il rentre souvent dans la composition des cocktails de cryoconservation par vitrification, en association avec le glycérol, le DMSO [9], [28], ou se

retrouve associé au saccharose pour la conservation à long terme au froid de l'*Asparagus officinalis* [16]. La recherche d'acide abscissique (ABA) dans les embryons de cocotier issus de graines matures a montré qu'il était très faiblement présent, avec des valeurs de 0,548 nmol.g^{-1} MS (Hocher, communication personnelle), comparativement aux résultats obtenus sur l'embryon zygotique de palmier à huile avec 165 nmol^{-1} MS [1]. L'ABA est connu en tant qu'hormone végétale jouant un rôle déterminant dans le développement et la germination des graines, mais aussi dans les mécanismes de réponse des plantes aux stress osmotiques dûs à divers facteurs (déshydratation, congélation, milieux salins). Il joue un rôle important dans les processus d'acquisition de la tolérance à ces stress [23]. Un certain nombre de travaux rapportent l'effet de l'apport d'ABA exogène agissant avec un haut niveau de protection contre les dommages des tissus pendant la déshydratation et la congélation [7], [43], [19]. Cet effet peut être aussi amplifié en ajoutant du saccharose [7].

Par ailleurs, l'amplification des échanges internationaux de germoplasme entre pays membres du Cogent (Coconut genetic resources network) et les laboratoires du Sud implique l'emploi de mode de conditionnement du matériel respectant les recommandations de bases pour les échanges internationaux uniquement autorisés sous la forme de pollen ou d'embryon [20], [25], [27]. La connaissance du transfert de matériel, sous la forme d'embryon, relève donc du plus grand intérêt dans le cas de travaux de cryoconservation. Le transfert d'embryon pour une introduction *in vitro* ultérieure a été réalisé sous la forme de carotte d'albumen [35], ou en immersion dans une solution de KCl [2]; ou sous la forme d'embryon sur un support d'eau plus agar (Fernando, communication personnelle).

Cet article fait le point des travaux visant à optimiser le protocole de cryoconservation de la plumule de cocotier afin d'accroître les faibles taux de reprise (20 %) obtenus précédemment [33], [35]. Nous avons étudié l'influence du type de conditionnement du matériel avant expédition ainsi que l'effet de l'ABA, ou de sorbitol connus pour leur action cryoprotectrice.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est sous la forme de plumules (méristème caulinaire entouré de 2 à 3 niveaux de feuilles primordiales) excisées d'embryons matures (12 à 14 mois après la pollinisation). La variété de cocotier utilisé est le Grand du Sri Lanka (GSL). Les expérimentations ont été conduites sur du matériel conditionné pour l'envoi de trois différentes fa-

çons : carottes d'albumen (ALB), embryons dans des cryotubes contenant un support gélosé (SW) ou une solution de chlorure de potassium (KCl). La collecte des noix, le prélèvement des carottes d'albumen et le conditionnement des embryons dans les cryotubes ont été réalisés au CRI (Sri Lanka). L'extraction des cylindres d'albumen a été réalisée selon le protocole décrit par Assy Bah *et al.* [2] avec l'emploi d'une solution d'hypochlorite de sodium (8 % de chlore actif) pendant 20 min, suivie de trois rinçages. A la réception du matériel une nouvelle désinfection est effectuée sur les carottes d'albumen puis sur les embryons excisés dans une solution d'hypochlorite de sodium à 6 % de chlore actif pendant 20 min pour les carottes d'albumen et 5 min pour les embryons, suivi d'un important rinçage. Les plumules sont ensuite excisées en conditions aseptiques sous hotte à flux laminaire à l'aide d'une loupe binoculaire suivant le protocole décrit par Chan *et al.* [8].

2.2. Préculture

Afin de s'affranchir au maximum des risques importants de contamination avant d'entamer la phase de cryoconservation, les plumules excisées sont placées dans des boîtes de Petri (diamètre 5 cm), à raison de trois plumules par boîte, pendant au moins quatre jours sur un milieu standard pour une étape de « préculture ».

Le milieu standard contient les macro et micro éléments d'Eeuwens [13] dépourvus de fer, les vitamines de Morel et Wetmore [29] modifiées avec 1 $mg.l^{-1}$ de biotine, sans hormones, additionné de 1 ml FeEDTA (selon Jacobson 1951 dans George et Sherrington) [18], 100 $mg.l^{-1}$ d'acide ascorbique, 30 $mg.l^{-1}$ adénine sulfate et 2 $g.l^{-1}$ de charbon actif (Sigma C-5385). Ce milieu est complété par 0,12 M de saccharose. Le pH est ajusté à 5,0 avant l'addition de charbon. Le milieu est solidifié à l'aide de 4 $g.l^{-1}$ de Phytagel™ (Sigma P-8169) et autoclavé pendant 30 minutes à 112 °C. Les plumules sont cultivées dans des tubes à essai (24 x 150 mm) contenant 20 ml de milieu. Les plumules sont placées à l'obscurité à une température de 27 °C, jusqu'à ce que la gemmule émerge avec 3 ou 4 feuilles.

2.3. Encapsulation-déshydratation

Les plumules ne présentant pas de contamination à l'issue de la « préculture » sont déposées à la surface d'une solution d'alginate de sodium (Sigma 250 cps) 3 % (v/v) constituée du milieu standard et de 0,15 M de saccharose. La solution contenant les plumules est distribuée, goutte à goutte, à l'aide d'une pipette stérile dans une solution de chlorure de calcium contenant 0,15 M de saccharose à température de la salle. Chaque bille d'environ 4 mm de diamètre contient une plumule. Les billes sont prétraitées (P) pendant 3 jours dans le milieu standard liquide contenant 0,75 M

ou/et 1 M de saccharose complété selon l'expérimentation par une combinaison d'ABA, ou de sorbitol. L'ABA est stérilisé par filtration et ajouté au milieu après autoclavage. Une vingtaine de billes sont pour cela immergées dans 30 ml de milieu contenu dans des Erlenmeyers de 125 ml et placés sur agitateur rotatif sous 90-100 rpm. Une déshydratation de 16 h est réalisée dans des boîtes à pesées de 125 ml remplies de 40 g de silicagel, 20 plumules encapsulées étant déposées sur un papier filtre placé à la surface du silicagel. A la fin de la déshydratation une moitié des billes est transférée sur milieu standard, l'autre moitié étant introduite dans des cryotubes de 2 ml et immergée directement dans l'azote liquide (AL). Après une conservation d'au moins 2 h, les cryotubes subissent un réchauffement rapide dans un bain-marie à 40 °C pendant 3 min. Les billes cryoconservées sont transférées en tubes à essai sur milieu standard, à raison d'une par tube.

2.4. Facteurs étudiés pouvant affecter la survie et la reprise

Les facteurs étudiés sont : (1) le type de conditionnement des embryons lors de leur envoi, carottes d'albumen (ALB), embryons dans les cryotubes contenant un support gélosé (0,45 % agar) (SW) ou une solution de 16,4 $g.l^{-1}$ KCl (KCl), pour une durée de 7 jours ; (2) l'adjonction d'ABA (0, 10, 20, 40 µM) en combinaison avec 0,75 M de saccharose et une durée de 16 h de déshydratation. (3) l'addition de sorbitol (0 ; 0,03 ; 0,11 ; 0,27 ; 0,55 M) en combinaison avec ou sans 0,75 M de saccharose et une durée de 16 h de déshydratation. L'apport d'ABA et de sorbitol a été réalisé sur des plumules issues d'embryons conditionnés dans leur carotte d'albumen (ALB).

Toutes les expérimentations ont été complètement randomisées avec deux à trois répétitions de 4 à 16 plumules par traitements. La survie est estimée à 2 mois par le pourcentage des plumules présentant un gonflement des tissus. La reprise est estimée entre 4 mois et 8 mois, par le pourcentage des plumules présentant le développement de la gemmule. La teneur en eau des billes d'alginate, exprimée en gramme d'eau par gramme de matière sèche ($g.g^{-1}$ MS) a été déterminée en déshydratant des lots de 20 billes vides d'alginates dans un four à 60 °C pendant 72 h. La significativité des données a été évaluée en utilisant le test d'indépendance du χ^2 à $P = 0,05$ avec la correction de Yates. Toutes ces analyses statistiques ont été faites sous le logiciel Statistica.

2.5. Études histologiques

Parallèlement aux observations faites lors du développement morphologique *in vitro*, une étude histologique, utilisant l'histologie photonique classique, a été menée sur les plumules ayant subi les différentes étapes du procédé de cryoconservation avec les traitements « conditionnement », « ABA » et

« sorbitol ». Le matériel utilisé est sous la forme de plumules excisées des embryons issus des trois types de conditionnement (ALB, SW, KCl). A chaque étape, des plumules ont été fixées dans le fixateur et incluses dans la résine LBK (Histo-Technik). Les plumules sont fixées et traitées selon la méthode décrite par Buffard-Morel *et al.* [6]. Des coupes de 3 à 4 µm d'épaisseur sont obtenues à l'aide d'un ultra-microtome (Historange LBK UK) et les sections subissent une double coloration par la réaction à l'acide périodique Schiff (PAS) et la réaction spécifique des protéines Naphtol blue black (NBB) [15]. Le PAS colore en rose pourpre les réserves glucidiques (amidon) et les parois cellulaires cellulosiques et le NBB colorient spécifiquement en bleu les protéines solubles ou de réserves [6].

3. RÉSULTATS

3.1. Effet du conditionnement sur la reprise de croissance de la gemmule

Le type de conditionnement du matériel pour son expédition a son importance et l'observation des données présentées dans le tableau I montre un effet significatif sur la reprise de croissance de la gemmule. En effet, le prétraitement 0,75 M de saccharose montre que dans les conditions (+D/-AL), les conditionnements les plus favorables sont KCl (25 %) et SW (22 %) et présentent une différence significative avec ALB avec respectivement des valeurs de χ^2cor = 5,19, p = 0,0227 et χ^2cor = 4,60, p = 0,00321. Dans les conditions (+D/+AL), la réponse est moins marquée, cependant on note que le conditionnement le plus favorable est encore SW (27,59 %) avec une différence avec ALB au seuil p = 0,0693 (χ^2cor = 3,30).

L'augmentation de la concentration en sucre (prétraitement 1 M de saccharose) montre que dans les conditions (+D/-AL), il n'y a pas de différence marquée au seuil 0,05, cependant une légère différence peut être observée entre ALB (23,81 %) et SW (44,90 %) (χ^2cor = 3,53, p = 0,0601). Cependant, avec les conditions (+D/+AL), la réponse est ici significativement plus marquée, entre ALB (21,43 %) et SW (40 %) (χ^2cor = 9, p = 0,0027). On peut noter aussi une légère différence entre KCl et SW pour p = 0,0603 (χ^2cor = 3,53).

Tableau I : Effet du type de conditionnement sur la reprise de croissance de la gemmule des plumules après déshydratation et congélation dans l'azote liquide.

Conditionnement	Saccharose	Pourcentage de reprise		
		(-D/-AL)	(+D/-AL)	(+D/+AL)
	0,75M			
ALB		96,15 a	4,76 a	9,00 a
KCl		100 a	25,00 b	24,39 a*
SW		100 a	22,92 b	27,59 a*
	1M			
ALB		92,00 a	23,81 a	21,43 a
KCl		95,65 a	34,21 a**	19,51 a***
SW		96,30 a	44,90 a**	40,00 b***

Les valeurs présentes dans la même colonne pour une concentration en sucre donnée qui présentent la même lettre ne sont pas significativement différentes pour $p < 0,05$ avec la correction de Yates. Cependant les valeurs assignées d'un même astérisque sont différentes pour une valeur de p correspondante : * pour $p = 0,0693$; ** pour $p = 0,0601$; *** pour $p = 0,0603$. ALB : carottes d'albumen ; KCl : solution de chlorure de potassium ; SW : embryons dans les cryotubes contenant un support gélosé. D : déshydratation ; AL : azote liquide. Nombre d'échantillons étudiés dans l'expérience : a) pour 0,75 M (120 ALB, 114 KCl, 136 SW) ; b) pour 1 M (117 ALB, 110 KCl, 136 SW).

L'étude de l'effet de la concentration en saccharose par type de conditionnement et de conditions (±D/±AL) montre que celui-ci s'est avéré relativement faible dans le cadre de nos expérimentations et ne s'est avéré significatif que dans trois situations. Dans ces trois cas la concentration la plus performante a été à chaque fois 1 M.

L'observation de la perte d'eau des billes pour les différents types de conditionnement (58 à 71 % MF) montre que la concentration en saccharose du prétraitement, n'a pas d'effet significatif sur la perte en eau des billes (% MF). Cependant, l'étude de la teneur en eau des billes après 16 h de déshydratation (fig. 1) montre des différences significatives entre ALB et KCl pour 1 M saccharose ($\chi^2cor = 5,50$; $p = 0,0191$). Pour 0,75 M, cette différence est observée pour deux des conditionnements, où elle s'avère significative entre ALB (0,07 $g.H2O.g^{-1}$ DW) et SW (0,23 $g.H2O.g^{-1}$ DW) ($\chi^2cor = 8,82$; $p = 0,0030$) et très hautement significative entre ALB et KCl (0,34 $g.H2O.g^{-1}$ DW) ($\chi^2cor = 20,74$; $p = 0,0000$).

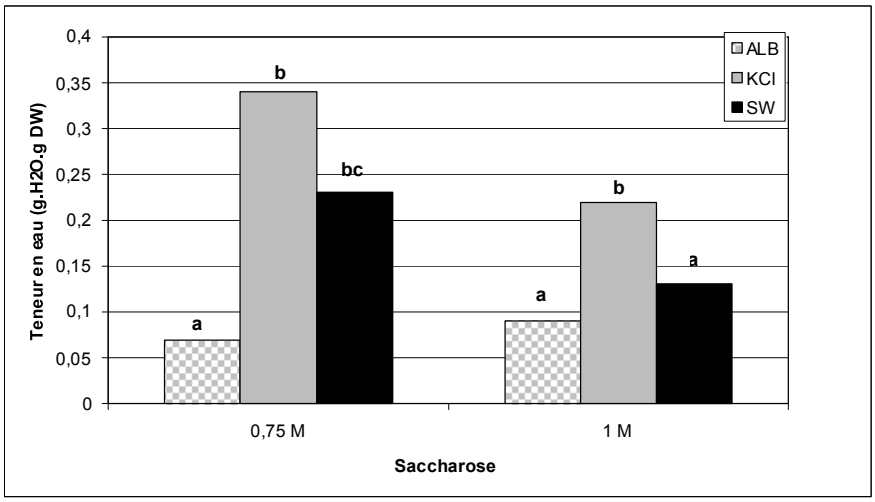

Figure 1 : Effet du type de conditionnement sur la teneur en eau des billes après 16 heures de déshydratation.
Les valeurs présentes dans la même colonne pour une concentration en sucre donnée qui présentent la même lettre ne sont pas significativement différentes pour $p < 0,05$ avec la correction de Yates. ALB : carottes d'albumen ; KCl : solution de chlorure de potassium ; SW : embryons dans les cryotubes contenant un support gélosé.

3.2. Effet du traitement ABA, sur la survie et la reprise de croissance de la gemmule

3.2.1. Survie

Les données expérimentales montrent que le prétraitement des plumules encapsulées en présence d'ABA peut avoir ou non un effet sur leur survie en fonction des combinaisons D/AL (fig. 2a). Pour la combinaison (-D/+AL), on observe que 10 µM ABA permet d'obtenir 38,10 % de survie, alors que l'absence d'ABA (0ABA) conduit à 5,88 % de survie. Cette différence est cependant peu marquée, au seuil $p = 0,0525$ ($\chi^2cor = 3,76$). Dans le cas de la combinaison (+D/+AL), l'adjonction d'ABA permet une meilleure réponse avec 10 µM ABA (53 %) par rapport à 20 µM ABA (14 %) [différence significative ($\chi^2cor = 5,05$, $p = 0,0246$)].

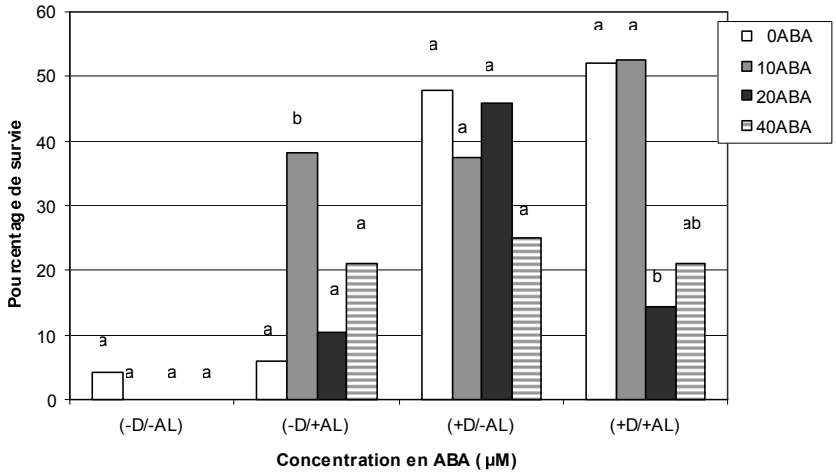

Figure 2a : Effet de l'acide abscissique (µM) sur la survie de la plumule après les traitements de déshydratation et de congélation dans l'azote liquide.
Les valeurs présentes dans la même colonne pour une concentration en sucre donnée qui présentent la même lettre ne sont pas significativement différentes pour $p < 0,05$ avec la correction de Yates. D : déshydratation ; AL : azote liquide. Nombre d'échantillons étudiés dans l'expérience : 95 (-D/-AL) ; 76 (-D/+AL) ; 95 (+D/-AL) ; 82 (+D/+AL).

3.2.2. Reprise

Dans le cadre des observations de la reprise de croissance de la gemmule (fig. 2b), nous observons un effet positif de l'apport d'ABA au milieu de prétraitement, surtout pour la condition (+D/-AL). Tous les traitements +ABA présentent une différence significative avec le control 0ABA (4,35 %) avec respectivement pour 10 µM ABA et 20 µM ABA (41,67 %) et des valeurs de $\chi^2cor = 7,16$, $p = 0,0075$, et $\chi^2cor = 8,56$, $p = 0,0034$ pour 40 µM ABA (45,83 %). Pour la condition (+D/+AL) une seule différence significative a été constatée entre 0ABA (8,70 %) et la concentration 20 µM ABA (38,10 %) ($\chi^2cor = 3,86$, $p = 0,0495$).

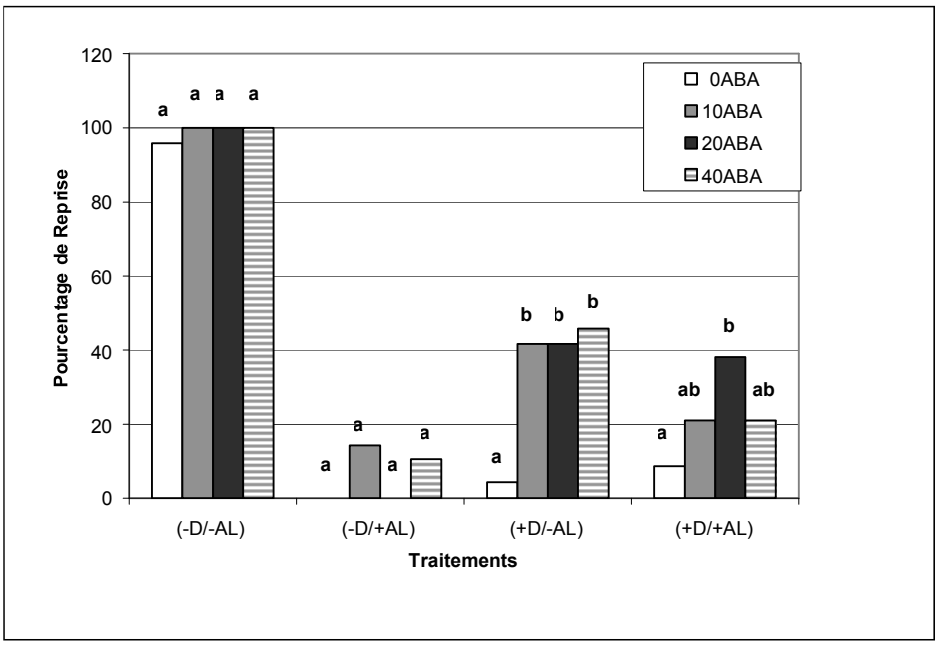

Figure 2b : Effet de l'acide abscissique (µM) sur la reprise de croissance de la gemmule des plumules après les traitements de déshydratation et de congélation dans l'azote liquide.

Les valeurs présentes dans la même colonne pour une concentration en sucre donnée qui présentent la même lettre ne sont pas significativement différentes pour $p < 0,05$ avec la correction de Yates. D : déshydratation ; AL : azote liquide. Nombre d'échantillons étudiés dans l'expérience identique à la Figure 2a.

Le traitement ABA provoque une perte d'eau croissante, passant de 62,30 %, 66,88, 68,25, à 69,78 %, respectivement pour 0, 10, 20 et 40 µM ABA. Cependant, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre ces différentes concentrations.

Au stade de l'expérimentation en cours, l'addition de sorbitol au milieu de prétraitement n'a pu mettre en évidence un effet significatif marqué sur la survie et la reprise par rapport au milieu saccharose seul (résultats non présentés). Cependant, le sorbitol associé au saccharose a favorisé certains développements similaires à ceux observés avec (0,75 M saccharose +D-AL) montrant la formation d'îlots de cellules isolées en divisions ayant constituées une paroi cellulaire externe, ou dans le cas présenté figure (4D) après (ABA+D+AL) (résultats non présentés).

3.3. Histologie

3.3.1. Effet du saccharose et de la déshydratation sur la cryoconservation des tissus de la plumule issus d'embryon ALB

Nous observons, à partir d'une coupe transversale de matériel sans aucun traitement (-P/-D/-AL), des cellules homogènes. Les cellules présentent un cytoplasme dense avec un nucléole distinct. Des cellules en division peuvent être observées (fig. 3A).

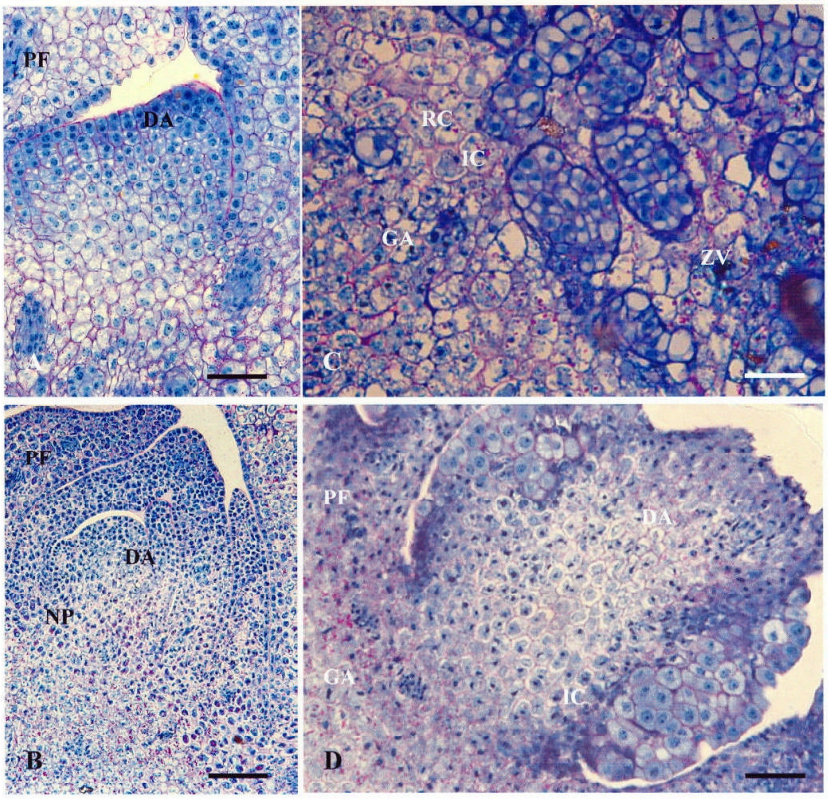

Figure 3 : Plumules ayant subi les différentes combinaisons de prétraitement 0,75M saccharose, déshydratation et immersion dans l'azote liquide.
(A), Plumule témoin (-P-D-AL) (*bar 380µM*) ; **(B)**, -P-D+AL (*bar 300µM*) ; **(C)**, +P+D-AL (*bar 740µM*) ; **(D)**, +P+D+AL (*bar 450µM*). PF, primordium foliaire ; DA, dôme apical ; GA, grains d'amidon ; IC, îlot de cellules ; NP, noyau picnotique (dû vraisemblablement à une condensation de la chromatine) ; ZV, zone vacuolaire ; RC, rétractation du cytoplasme. P, prétraitement saccharose ; D, déshydratation 16h ; AL, immersion dans l'azote liquide.

Quand les plumules sont immergées dans l'azote liquide sans prétraitement (-P/-D/+AL) nous pouvons observer la condensation du cytoplasme. Les noyaux sont fortement colorés de façon homogène avec le NBB. Les

noyaux sont de coloration dense, du à la condensation de la chromatine des cellules en division. Ici nous pouvons observer le comportement homogène des cellules face à l'immersion dans l'azote liquide (fig. 3B).

Après un prétraitement et déshydratation et sans l'immersion dans AL (+P/+D/-AL), nous observons que le prétraitement et la déshydratation a provoqué une grande hétérogénéité de réponse des cellules. Des zones vacuolaires sont maintenant présentes avec une perte de la position centrale par le noyau. Nous observons des îlots de cellules isolées en divisions ayant constitué une paroi cellulaire externe. Si la reprise de croissance est observée cela devrait être à partir des cellules du dôme du méristème caulinaire et de ces îlots de cellules (fig. 3C). Quand ces plumules, prétraitées au saccharose et déshydratées, sont immergées dans AL, une plus grande hétérogénéité peut être observée dans les cellules de la partie centrale. Le stress de la déshydratation n'est pas réversible, mais on peut cependant observer que quelques cellules sont résistantes au stress, car on distingue aussi des îlots de cellules isolées en divisions (fig. 3D).

3.3.2. Effet du saccharose et de l'ABA sur la déshydratation et la cryoconservation des tissus de la plumule issus d'embryon ALB

Ce prétraitement saccharose observé précédemment, a été complété par l'addition d'ABA (0, 10, 40 µM). Comme dans les plumules témoins (fig. 3A, C), la bonne conservation de la « sphéricité » des cellules du dôme est conservée, aussi bien quand ces plumules sont déshydratées (+10 µM ABA/+D/-AL) (fig. 4C), ou immergées dans AL sans déshydratation (+10 µM ABA/-D/+AL) (fig. 4B). On distingue bien que les cellules du dôme ont mieux résisté que les cellules de la base de la plumule. Nous remarquons cependant quelques cellules abîmées, mais les cellules environnantes sont en division, montrant bien que les altérations provoquées par ces conditions sont réversibles. Les mêmes résultats peuvent être observés aussi bien avec les fortes concentrations (40 µM ABA). Au regard de ces observations histologiques il apparaît donc que l'ABA améliore sensiblement le comportement des cellules à la cryoconservation. Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus sur le développement morphologique des plumules à la suite de ces différents traitements étudiés.

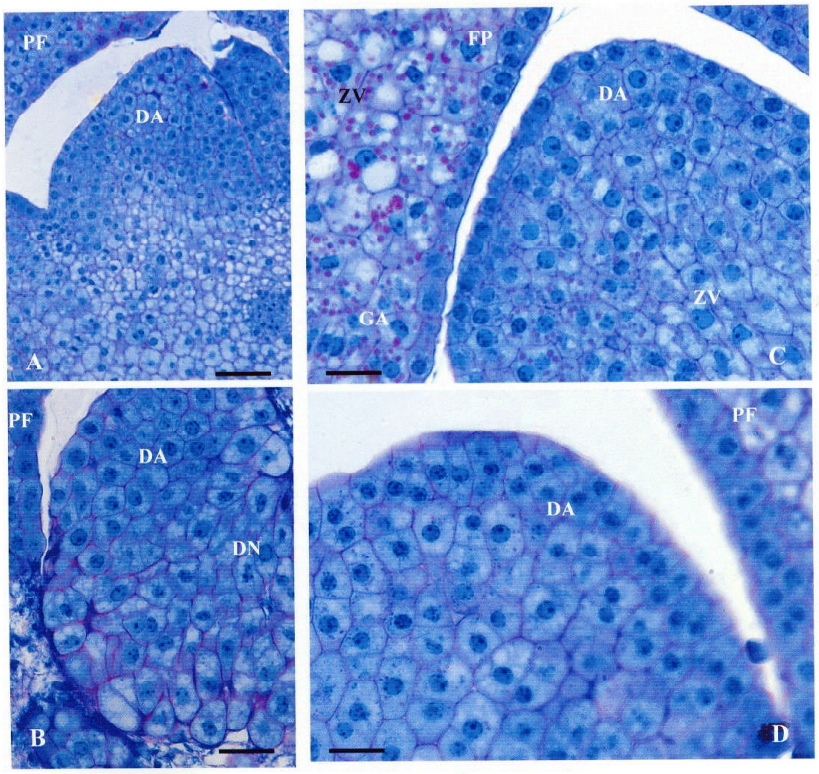

Figure 4 : Plumules ayant subi un prétraitement 0,75 M saccharose additionné de 10 µM d'ABA, suivi des différentes combinaisons déshydratation et immersion dans l'azote liquide.
(A), 10ABA-D-AL (*bar 390µM*) ; **(B)**, 10ABA-D+AL (*bar 740µM*) ; **(C)**, 10ABA+D-AL (*bar 740µM*) ; **(D)**, 10ABA+D+AL (*bar 740µM*). PF, primordium foliaire ; DA, dôme apical ; DN, déformation du noyau ; GA, grains d'amidon ; ZV, zone vacuolaire. P, prétraitement saccharose ; D, déshydratation 16h ; AL, immersion dans l'azote liquide.

4. DISCUSSION

L'utilisation des différents facteurs pouvant avoir un effet sur l'amélioration des taux de survie et de reprise des plumules cryoconservées obtenus précédemment par N'Nan [35] a été réalisée en ne retenant que les conditions optimales de concentration en saccharose (0,75 et/ou 1 M) et de durée de déshydratation (16 h). D'autres part, une étude de plusieurs types de conditionnement, pour l'acheminement de matériel des zones de collectes aux laboratoires n'appartenant pas à ces zones, a été réalisée pour mettre

en relief les éventuelles incidences de ces différents modes sur la capacité du matériel à répondre aux conditions de cryoconservation.

Ce travail présente trois formes de conditionnement utilisées pour l'expédition d'embryon zygotiques de cocotier ([2], [35] ; Fernando, communication personnelle). Les résultats montrent que les trois formes de conditionnement (carottes d'albumen (ALB), embryons dans des cryotubes contenant un support gélosé (SW) ou une solution de chlorure de potassium (KCl)) n'affectent pas la capacité de réponse des tissus de la plumule aux traitements de déshydratation et de congélation. Il permet même de montrer que les conditionnements SW et KCl sont compatibles à des expérimentations de cryoconservation. En effet, leurs taux de reprise sont supérieurs à ceux obtenus avec ALB pour 0,75 M (9 %). Dans le cas de 1 M de saccharose, la performance de SW est nettement plus marquée dans le cas de +D/+AL avec 40 % de reprise. L'observation des teneurs en eau entre ALB et le groupe SW et KCl renforce l'idée que le type de conditionnement a permis de réduire la teneur en eau jusqu'à un seuil plus propice à la reprise après cryoconservation.

Ces résultats sont fort intéressants car ils montrent que le milieu entourant l'embryon (albumen ou apport de milieu) n'est pas primordial, un support gélosé seul, sans milieu de culture, suffit au bon maintien des embryons et à la bonne réactivité des plumules utilisées dans les différents prétraitements. Ils devraient ainsi faciliter les échanges de germoplasmes entre les différents partenaires.

L'étude de l'effet de l'adjonction d'ABA au milieu de prétraitement montre qu'il stimule la reprise. Le traitement significativement le plus favorable pour la condition (+D/+AL) est 20 μM ABA avec 38 % de reprise. Ces résultats montrent bien que l'addition d'ABA au milieu de prétraitement améliore notablement la reprise après cryoconservation, avec des taux bien supérieurs à ceux obtenus par N'Nan *et al.* [34] sur 5 variétés. Ceci démontre l'importance de l'action de l'ABA sur la tolérance à la dessiccation et à la cryoconservation de plumules d'embryons de cocotier.

La réponse quasi nulle de l'adjonction d'ABA au témoin (-D/-AL) dans le cas de la survie par rapport à la reprise pourrait être expliquée par un temps de latence de croissance de la gemmule en absence de stress de déshydratation et par le fait que la réponse de la plumule à l'action de l'ABA va dépendre de son stade de développement, ceci a été observé sur les embryons somatiques de *Medicago* déshydratés et traités à l'ABA [44]. On voit par ailleurs, que l'ABA agit plus fortement au stade précoce, stade où normalement on observe une certaine latence dans le démarrage de la croissance de la gemmule en présence de stress de déshydratation et de congélation. Il faut remarquer que les embryons de cocotier collectés sous la rubri-

que « mature » détiennent une grande hétérogénéité de par l'étalement de ce stade (12 à 14 mois). Ceci est à mettre en relation avec l'étalement dans le temps du démarrage de la plumule, et cela pour un même lot.

L'addition d'ABA semble occasionner une perte d'eau (% MF) d'autant plus importante que la concentration en ABA est élevée (63,50 ± 2,12 ; 66,50 ± 2,12 ; 68,50 ± 4,95 ; 71,00 ± 2,83). Cependant, l'analyse n'a pas montré de différence significative entre ces différentes concentrations. Aberlenc [1] montre aussi que chez les embryons de palmier à huile, l'enrichissement du milieu en ABA entraîne une légère diminution de leur teneur en eau de 8,25 à 6,92 $g.g^{-1}$ MS. Une légère perte en eau ainsi que l'apport d'ABA seraient déterminants dans l'acquisition de la tolérance à la dessiccation [4].

Un certain nombre d'auteurs font état de l'influence de l'apport exogène d'ABA sur le haut degré de protection contre les dégradations des tissus pendant la déshydratation et la congélation [7], [23], [31]. Dans certains cas, cet apport n'est pas efficace seul [40], [14] et va nécessiter des combinaisons avec des traitements d'acclimatation au froid, ou l'action combinée avec tetcyclasis, connu pour activer la synthèse endogène d'ABA [5] ou peut être amplifié par l'emploi de saccharose [7], [14]. Cependant, son efficacité, quand il est employé seul (3,8 µM), peut s'avérer possible [17].

L'application de l'ABA a été, selon les auteurs, réalisée à différentes étapes des expérimentations. Sur des cals de riz l'addition au milieu de culture de 2 µM d'ABA, appliquée pendant les cinq jours précédant l'immersion directe dans l'azote liquide, s'avère être une procédure efficace pour la survie [30]. L'addition de 7,6 µM d'ABA sur les cellules encapsulées de *Medicago sativa* augmente leur viabilité après la déshydratation mais n'a pas d'effet sur la congélation [41]. La tolérance au froid d'embryon de carotte a été restaurée par l'addition de 1 µM d'ABA dans le milieu de prétraitement [40]. L'adjonction d'ABA agirait sur l'augmentation de la tolérance à la dessiccation d'embryons somatiques de céleri [24] et de melon [42], comme sur l'augmentation de la tolérance au froid sur des suspensions cellulaires de brome [22]. La recherche de la compréhension des modes d'action de l'ABA a conduit à de nombreux travaux. De nombreux gènes induits par les stress de la dessiccation et de la congélation répondent à l'application exogène de l'ABA [47]. Dans le cas du cocotier, une recherche de gènes impliqués, comme des mécanismes de l'expression de ces gènes [47], permettrait d'en maîtriser mieux les différentes étapes de sa cryoconservation.

L'étude des coupes histologiques vient renforcer les résultats des observations de survie et de reprise. En effet, l'analyse des coupes montre que l'ABA a un effet très positif sur la conservation des structures cellulaires après déshydratation et congélation, ce qui est à mettre en relation avec

l'amélioration en présence d'ABA de la tolérance au stress de la déshydratation et de la congélation. L'apport de 10 µM permet même aux cellules de garder les caractéristiques structurales des cellules témoins (-P-D-L et 0,75 M +D) pour des conditions d'immersion dans AL sans déshydratation (fig. 4B). L'histologie permet ainsi de décrire l'effet des traitements au niveau de la structure des tissus et des structures cellulaires ; elle permet aussi de voir si les dommages créés peuvent être réversibles ou non. En liaison avec ce que nous observons à la reprise, elle permet donc de définir les altérations cellulaires et tissulaires compatibles avec cette reprise qui peuvent être réversibles. L'hypothèse que nous soumettons au regard de ces observations est qu'il existerait peut-être un effet des traitements sur la structure cellulaire se situant au niveau des protéines chaperonnes. Ces protéines chaperonnes sont en effet décrites pour responsables des restaurations des systèmes dégradés lors de stress thermiques [21]. Afin de vérifier cette hypothèse des travaux devraient être menés dans ce sens.

Le sorbitol fait partie des cryoprotecteurs les plus communément utilisés et ajoutés dans le milieu de préculture avec un autre polyol (mannitol) et chez les sucres, le saccharose et le glucose [12]. Il rentre souvent dans la composition des cocktails de cryoconservation par vitrification, en association avec le glycérol, le DMSO [9], [28], ou se retrouve associé au saccharose pour la conservation à long terme au froid de l'*Asparagus officinalis* [16]. Chez le cocotier, la forte concentration trouvée de sorbitol dans l'eau de coco (autour de 6g/l) [26] pourrait peut-être avoir un impact sur l'évolution ultérieure de l'embryon *in vivo*. Selon les analyses des données en cours, son apport exogène au milieu de prétraitement (0,75 M de saccharose) des plumules n'a pas eu d'effet significatif marqué sur la survie et la reprise par rapport au milieu saccharose seul. Cependant, l'observation histologique montre que le sorbitol associé au saccharose favorise certains développements cytologiques caractéristiques de la tolérance à la déshydratation (accumulation de grain d'amidon, formation d'îlot de cellules…) [12]. Des travaux sur des suspensions cellulaires de patate douce montrent que le sorbitol n'est pas métabolisé par les cellules, et suggèrent qu'il agit seulement comme un osmoticum [46]. Cependant, le sorbitol pourrait avoir un rôle dans l'acquisition de la tolérance au froid [37]. On retrouve son implication chez les insectes, où il aurait un rôle thermoprotecteur [45].

Les résultats de cette étude ont été obtenus sur une seule variété de cocotier : le Grand du Sri Lanka. Afin de vérifier s'il existe un effet variété, des expérimentations sont prévues sur un plus grand nombre d'écotypes.

REMERCIEMENTS

Ces travaux ont été réalisés avec un soutien du Bureau des Ressources Génétiques (Paris, France) ; un des auteurs a bénéficié d'une bourse d'Échanges Scientifiques de Courte Durée (BESCD) gérée par le Département DSF de l'IRD. Les études histologiques ont été réalisées pour partie sur la Plateforme d'imagerie Rio-Imaging de Montpellier.

RÉFÉRENCES

[1] Aberlenc-Bertossi F., Etude de la tolérance à la dessiccation des embryons zygotiques et somatiques de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.). Thèse de Doctorat Univ. Paris 6, (2001) 103p.

[2] Assy-Bah B., Durand-Gasselin T., Pannetier C., Use of zygotic embryo culture to collect germplasm of coconut (*Cocos nucifera* L.), Plant Gen. Resourc. Newslet. 71 (1987) 4-10.

[3] Bachrach L.R., Gardner J.M., Caregiver knowledge, attitudes, and practices regarding childhood diarrhea and dehydration in Kingston, Jamaica. Rev Panam Salud Publica 12 (2002) 37-44.

[4] Black M., Corbineau F., Gee H., Come D., Water content, raffinose, and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos, Plant Physiology 120 (1999) 463-471.

[5] Beardmore T., Whittle C-A., Induction of tolerance to desiccation and cryopreservation in silver maple (*Acer saccharinum*) embryonic axes, Tree Physiol. 25 (2005) 965–972.

[6] Buffard-Morel J., Verdeil J.L., Pannetier C., Embryogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir de tissus foliaires : étude histologique, Can. J. Bot. 70 (1992) 735-741.

[7] Burch J., Wilkinson T., Cryopreservation of Protonemata of *Ditrichum cornubicum* (Paton) comparing the effectiveness of four cryoprotectant pretreatments. Cryolett. 23 (2002) 197-208.

[8] Chan JL., Sàenz L., Talavera C., Hornung R., Robert M., Oropeza C., Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis, Plant Cell Rep 17 (1998) 515-521.

[9] Chen Y., Wang J.H., Cryopreservation of carrot (*Daucus carota* L.) cell suspensions and protoplasts by vitrification, Cryolett. 24 (2003) 57-64.

[10] Cutting WA., Coconut water and home rehydration, Lancet 2 (8507) (1986) 640-641.

[11] Duhamet L., Action du lait de coco sur la croissance des cultivés de tissus de crown-gall de vigne, de tabac, de topinambour et de scorsonère. CR Soc. Biol. 145 (1951) 1781-1785.

[12] Dumet D., Engelmann F., Chabrillange N., Duval Y., Effect of various sugars and polyols on the resistance of oil palm somatic embryos to partial desiccation and freezing in liquid nitrogen, Seed Sci. Res. 4 (1994) 307-313.

[13] Eeuwens CJ., Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut (*Cocos nucifera* L.) and date (*Phoenix dactylifera* L.) palms cultured *in vitro*, Physiol. Plant. 36 (1976) 23-28.

[14] Fang J.Y., Wetten A., Hadley P., Cryopreservation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos for long-term germplasm storage, Plant Sci. 166 (2004) 669-675.

[15] Fisher D.B., Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. Histochemie 16 (1968) 92-96.

[16] Fletcher P.J., *In vitro* long-term storage of asparagus, New Zeland Journal of Crop and Horticultural Science 22 (1994) 351-359.

[17] Gagliardi R.F., Pacheco G.P., Carneiro L.A, Valls J.F.M., Vieira M.L.C., Mansur E., Cryopreservation of *Arachis* species by vitrification of *in vitro*-grown shoot apices and genetic stability of recovered plants, Cryolett. 24 (2003) 103-110.

[18] George E.F., Sherrington P.D., In: Plant propagation by tissue culture, Handbook of Directory and Commercial Laboratories. George E.F., Sherrington P.D. (eds) Exegetics Eversley Ldt, 1984, 709p.

[19] Hirata K., Miyamoto K., Cryopreservation of hairy root cultures of useful plants by encapsulation-dehydration, in Engelmann F., Takagi K. (eds) Cryopreservation of tropical plant germplasm, Current research progress and applications, JIRCAS, Tsukuba, Japan /IPGRI, Rome, Italy, 2000, pp. 444-445.

[20] Hocher V., Verdeil J.L, Malaurie B., *Cocos nucifera,* Coconut, In : Biotechnology of Fruit and Nut Crops, Chapter 4-1, Arecaceae, R.E. Litz (ed.) Tropical Research and Education Center, University of Florida, USA, Biotechnology in Agriculture Series N°29, CABI Publishing, 2004, pp 90-112.

[21] Iba K., Acclimative response to temperature stress in higher plants: Approaches of gene engineering for temperature tolerance, Annu. Rev. Plant Biol. 53 (2002) 225-245.

[22] Ishikawa M., Induction of freezing tolerance in plant cells, Japanese Journal of Freeze-Drying 35 (1989) 118–124.

[23] Kendall E.J., Karha K.K., Qureshi J.A., Chermak P., Cryopreservation of immature spring wheat zygotic embryos using abscisic acid pre-treatment, Plant Cell Rep. 12 (1993) 89-94.

[24] Kim Y.H, Janick J., ABA and polyox-encapsulation or high humidity increases survival of desiccated somatic embryos of celery, HortScience 24 (1989) 674–676.

[25] Malaurie B., Medium- and long-term conservation and safe international exchange of germplasm from food and cash tropical crops, Acta Hort. 560 (2001) 69-77.

[26] Malaurie B., N'Nan O., Hocher V., Ilbert P., Grosdemange F., Konan Konan J.L., Zakra N., Verdeil J.L., State of research on culture and cryopreservation of zygotic coconut embryos at IRD/CIRAD (France), in: Coconut Embryo *In Vitro* Culture Part II, Engelmann F., Batugal P.A., Oliver J.T. (eds.), IPGRI-APO, 2002, 146-156.

[27] Malaurie B., N'Nan O., Borges M., Bandupriya H.D.D., Perera P., Fernando S.C., Hocher V., Verdeil J.L., The use of biotechnology for conservation and dissemination of coconut genetic resources: an assessment of the IRD/CIRAD implication. In: Proceedings of International Conference of the Coconut Re-

search Institute of Sri Lanka - Part I (Review Papers and Guest Presentations). Peiris T.S.G., Ranasinghe C.S., (eds.). The Coconut Research Institute of Sri Lanka, Lunuwila 61150, Sri Lanka, (2004) pp 233-253.

[28] Mathur G., Alkutkar V.A., Nadgauda R.S., Cryopreservation of embryonic culture of *Pinus roxburghii*, Biol. Plantarum 46 (2003) 205-210.

[29] Morel G., Wetmore R.M. Fern callus tissue culture. Amer J Bot 38: (1951) 141-143.

[30] Moukadiri O., O'Connor J.E., Cornejo M.J., Effects of the cryopreservation procedures on recovered rice cell populations, Cryolett. 23 (2002) 11-20.

[31] Na H.Y., Kondo K., Cryopreservation of tissue-cultured shoot primordia from shoot apices of cultured protocorms in *Vanda pumila* following ABA preculture and desiccation, Plant Sci. 118 (1996) 195-201.

[32] Nickell L.G., Effect of coconut milk on the growth *in vitro* of plant virus tumour tissue, Bot. Gaz. 112 (1950) 225-229.

[33] N'Nan O., Verdeil J.L., Hocher V., Konan J.L., Zakra N., Malaurie B., Mise au point d'une méthode de cryoconservation d'apex caulinaire de cocotier (*Cocos nucifera* L.) / Development of a method for cryo-preservation of coconut (*Cocos nucifera* L.) caulinary meristems, Burotrop Bulletin N°20 (2002) p17, consultable sur site: http://www.agropolis.fr/pdf/bb20.pdf.

[34] N'Nan O., Borges M., Hocher V., Verdeil J.L., Konan J.L., Sangare A., Mondeil F., Malaurie B., Intérêt de l'utilisation des embryons et des plumules pour les échanges et la conservation des ressources génétiques du cocotier (*Cocos nucifera* L.), In IXe. Journ. Scientif. Réseau « Biotechnologies végétales : amélioration des plantes et sécurité alimentaire » de l'Agence Universitaire de la Francophonie, AUF. Thème - Biotechnologies Végétales, Biodiversité, et Biosécurité : défis et enjeux, (Ed.) Mawuena Dieudonné Gumedzoe, Lomé, Togo, 4-6 Octobre 2004, Presses Offset CTCE, Lomé Togo (2004) 80-84.

[35] N'Nan O., Utilisation des biotechnologies comme seconde voie pour les échanges et la conservation des ressources génétiques du cocotier (*Cocos nucifera* L.), Thèse de Doctorat, École Doctorale d'Angers ED 363, Spécialité : Physiologie de la Morphogenèse Végétale, Univ. Angers, 27 Février 2004, N° d'Ordre 594, 2004, 199 p.

[36] Overbeek J.V., Conklin M.E., Blakeslee A.F., Factors in coconut milk essential for growth and development of very young *Datura* embryos, Science 94 (1941) 350-352.

[37] Pieniazek J., Holubowicz T., Machnik B., Kasprzyk M., Apple stem callus frost tolerance and growth modification by adding sorbitol and some growth regulators to the medium, in ISHS Acta Horticulturae 81 Symposium on Winterhardiness in Woody Perennials Convener, Gertych Z., Pieniazek J., Holubowicz T. (eds) (1978).

[38] Pollard J.K, Shantz E.M., Steward F.C., Hexitols in coconut milk: their role in nurture of dividing cells, Plant. Physiol. 36 (1961) 492-498.

[39] Reed B.M., Responses to ABA and cold acclimation are genotype dependent for cryopreserved blackberry and raspberry meristems, Cryobiology 30 (1993) 179-184.

[40] Thierry C., Florin B., Pétiard V., Changes in protein metabolism during the acquisition of tolerance to cryopreservation of carrot somatic embryos, Plant Physiol. Biochem. 37 (1999) 145-154.

[41] Shibli R.A., Haagenson D.M., Cunningham S.M., Berg W.K., Volence J.J., Cryopreservation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cells by encapsulation dehydration, Plant Cell Rep. 20 (2001) 445-450.

[42] Shimonishi K., Ishikawa M., Suzuki S., Oosawa K., Cryopreservation of melon somatic embryos by desiccation method, in Engelmann F., Takagi K. (eds) Cryopreservation of tropical plant germplasm, Current research progress and applications, JIRCAS, Tsukuba, Japan /IPGRI, Rome, Italy, 2000, pp. 167-171.

[43] Sarawut Boonpeng, Suchada Vearasilp, Pimchai Apavatjrut, Sangtiwa Suriyong, Elke Pawelzik, Induced desiccation tolerance by ABA treatment in sugarcane somatic embryos, in "technological and institutional innovations for sustainable rural development" Deutscher Tropentag, October 8-10, 2003, Gottingen.

[44] Senaratna T., McKersie B.D., Bowle S.R., Desiccation tolerance of alfalfa *(Medicago sativa* L.) somatic embryos. Influence of abscisic acid, stress pretreatments and drying rates. Plant Sci 65 (1989) 253-259.

[45] Wolfe G.R., Hendrix D.L., Salvucci M.E., A thermoprotective role for sorbitol in the silverleaf whitefly, J. Insect Physiol. 44 (1998) 597-603.

[46] Wang H.L., Lee P.D., Liu L.F., Su J.C., Effect of sorbitol induced osmotic stress on the changes of carbohydrate and free amino acid pools in sweet potato cell suspension cultures, Bot. Bull. Acad. Sin. 40 (1999) 219-225.

[47] Yamaguchi-Shinozaki K., Kasuga M., Liu Q., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Shinozaki K., Molecular mechanisms of freezing and drought tolerance in plants, in Engelmann F., Takagi K. (eds) Cryopreservation of tropical plant germplasm, Current research progress and applications, JIRCAS, Tsukuba, Japan /IPGRI, Rome, Italy, 2000, pp.67-76.