

# Embryogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L) : obtention de plusieurs clones de vitroplants

## Coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis: obtention of several clone ramets

J.L. VERDEIL<sup>(1)</sup>, C. HUET<sup>(2)</sup>, F. GROSDÉMANGES<sup>(2)</sup>, A. RIVAL<sup>(1)</sup> ET J. BUFFARD-MOREL<sup>(2)</sup>

**Résumé.** — Une étape importante vient d'être franchie dans la maîtrise de la multiplication végétative du cocotier : l'obtention de façon reproductible de vitroplants sur 5 clones appartenant à des génotypes différents. Deux sources de tissus prélevés sur individus adultes sont utilisées : explants foliaires et explants inflorescenciels. Le procédé mis en oeuvre comprend les étapes suivantes : callogénèse sur explants primaires, induction de l'embryogenèse sur les cals, maturation des embryons, développement des pousses feuillées et des racines. La production régulière de cals embryogènes et d'embryons somatiques complets a permis leur description histologique.

**Mots clés.** — *Cocos nucifera* L., embryogenèse somatique, étude histologique, vitroplants

**Abstract.** — An important step forward has been made in mastering coconut vegetative propagation: ramets have been reproducibly obtained on 5 clones belonging to different genotypes. Two tissue sources taken from adult individuals are used: leaf explants and inflorescence explants. The process used comprises the following stages: callogenesis on primary explants, embryogenesis induction on calli, embryo maturation, shoot and root development. With regular production of embryogenic calli and whole somatic embryos, their histological description was made possible.

**Key words.** — *Cocos nucifera* L., somatic embryogenesis, histology, ramets

### INTRODUCTION

Le cocotier, généralement allogame, n'est multiplié actuellement que par voie sexuée. Les seuls espoirs pour parvenir à sa propagation asexuée reposent sur les techniques de culture *in vitro* et plus particulièrement sur l'embryogenèse somatique. La productivité des plantations de cocotier pourrait être augmentée de façon significative si l'on disposait d'un matériel homogène obtenu par clonage des individus hautement producteurs. La multiplication végétative des spécimens tolérants ou résistants offrirait également un moyen de lutte efficace contre certaines maladies qui constituent une menace réelle pour les cocoteraies de certaines régions du globe. Trois équipes seulement ont pu, à ce jour obtenir la régénération complète de plants à partir de tissus somatiques [6, 1, 2]. Cependant le clonage du cocotier demeure à notre connaissance encore mal maîtrisé, en raison de l'absence de reproductibilité des résultats.

Début 1991, une étape importante vient d'être franchie dans la maîtrise de la micropropagation du cocotier par l'équipe ORSTOM-IRHO qui travaille depuis 1981 sur ce sujet [2, 3, 5, 8] : l'obtention reproductible de vitroplants représentant 5 clones différents. Le schéma du procédé expérimental mis en oeuvre est le suivant :

- Callogénèse à partir de fragments de feuilles ou d'inflorescences conduisant à la formation de tissus inorganisés (cals) :

### INTRODUCTION

Coconut, which is generally allogamous, is currently only multiplied from seed. The only hopes for its asexual propagation lie in *in vitro* culture techniques and more particularly in somatic embryogenesis. Coconut plantation productivity could be significantly increased if homogeneous material obtained by cloning high-yielding individuals were available. Vegetative propagation of tolerant or resistant specimens would also offer an effective control of various diseases that are a real threat to coconut plantations in certain parts of the world. So far, only three teams have been able to claim complete regeneration of plants from somatic tissues [6, 1, 2]. However, as far as we are aware, coconut cloning has still not been fully mastered, given the lack of result reproducibility.

At the beginning of 1991, an important step forward was made in mastering coconut micropropagation, by the ORSTOM-IRHO team, which has been working on this subject since 1981 [2, 3, 5, 8], with the reproducible obtention of ramets from 5 different clones. The experimental procedure used was as follows:

- callogenesis from leaf or inflorescence fragments, leading to the formation of disorganized tissue (calli);

(1) IRHO/CIRAD - Laboratoire de ressources génétiques et d'amélioration des plantes tropicales - ORSTOM-911, Av. Agropolis, BP 5045, 34032 - Montpellier cedex 1, France.

(2) ORSTOM - Laboratoire de ressources génétiques et d'amélioration des plantes tropicales - ORSTOM-911, Av. Agropolis, BP 5045, 34032 - Montpellier cedex 1, France.

- maintien en culture des cals isolés et induction de l'embryogenèse ;
- maturation puis conversion des embryons.

La néoformation reproductible d'embryons complets a été obtenue grâce à la mise en place d'une approche analytique (étude histologique, étude de la composition des milieux) ; elle a permis de mieux appréhender les causes de blocage ou de déviation de l'embryogenèse somatique fréquemment observés sur cocotier.

Cette note de synthèse fait le point des résultats obtenus récemment et tient compte de l'aspect évolutif des cultures tant au niveau morphologique qu'au niveau histocytologique.

## MATERIELS, METHODES ET PRINCIPAUX RESULTATS

### □ Callogenèse à partir d'explants foliaires et inflorescenciels

Cette étape est actuellement maîtrisée sur les deux sources tissulaires travaillées (feuilles et inflorescences immatures). Le matériel végétal, fourni par la station de sélection M. Delorme de Côte-d'Ivoire, est prélevé sur des individus adultes (20-25 ans). Il provient essentiellement de la variété Nain Jaune Malais et de l'hybride Nain Jaune Malais × Grand Ouest Africain (hybride PB121 créée par l'IRHO-CIRAD).

Les explants foliaires sont constitués de fragments (longueur 1 cm) de jeunes feuilles non chlorophylliennes, les explants inflorescenciels sont représentés par des fragments d'épillet (longueur 1 à 1.5 mm) appartenant à de jeunes inflorescences (spathe interne comprise entre 15 et 40 cm de longueur).

Le milieu de base précédemment décrit [3] est additionné de 30 à 80 mg/l de 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique) en présence de charbon actif (2 ou 3 g/l). Les gammes de concentrations utilisées tiennent compte des différences de réactivité entre les individus de même origine génétique ou d'origines différentes.

Les premiers cals apparaissent quatre mois après la mise en culture (Fig. 1 et 2) et l'optimum de callogenèse se situe aux environs du neuvième mois (35 à 40% des explants sont alors porteurs de cals).

Les études histologiques ont permis de mettre en évidence deux origines possibles pour la formation des cals :

- une origine interne au niveau des cellules périvasculaires des explants foliaires (Fig. 3) et du rachis des fragments inflorescenciels ;
- une origine externe au niveau des méristèmes floraux mâles préexistants (Fig. 4).

Quelle que soit leur origine tissulaire, la croissance et la multiplication des cals est assurée par la mise en place d'une assise méristématique périphérique organisée de part en part en assise de type cambial.

### □ Induction de l'embryogenèse

Les cals sont isolés de l'explant à partir du sixième mois de culture et sont placés sur un milieu enrichi en 2,4-D par rapport à la concentration initiale ; ces conditions de culture peuvent conduire après des délais variables (1 à 12 mois) à l'induction de l'embryogenèse suivant deux voies possibles :

- l'une, d'origine pluricellulaire, à partir de structures méristématiques épidermiques qui apparaissent à la surface de certains cals (Fig. 5). Cette voie conduit à la néoformation de structures de type embryon sou-

- *subculture of isolated calli and embryogenesis induction;*
- *embryo maturation, then conversion.*

*Reproducible neoformation of whole embryos was obtained by taking an analytical approach (histological study, study of medium compositions); this provided a better understanding of the reasons for the halt or deviation in somatic embryogenesis often seen on coconut.*

*This brief note takes stock of recently acquired results and takes into account the evolutionary nature of the cultures, from both a morphological and a histocytological point of view.*

## MATERIAL, METHODS AND MAIN RESULTS

### □ Callogenesis from leaf and inflorescence explants

*This stage has now been mastered on the two tissue sources worked on (immature leaves and inflorescences). The plant material, supplied by the M. Delorme station in the Ivory Coast, was taken from adult individuals (20-25 years) and came primarily from the Malayan Yellow Dwarf variety and the Malayan Yellow Dwarf × West African Tall hybrid (PB 121 hybrid created by IRHO-CIRAD).*

*The leaf explants comprised fragments (1 cm long) of young non-chlorophyllous leaves and the inflorescence explants were spikelet fragments (1 to 1.5 mm long) from young inflorescences (internal spathe between 15 and 40 cm long).*

*Thirty to 80 mg/l of 2,4-D (2,4 dichlorophenoxyacetic acid) were added to the basic culture medium described previously [3], in the presence of activated charcoal (2 or 3 g/l). The different concentrations used took into account the differences in reactivity between specimens of the same genetic origin or of different origins.*

*The first calli appeared four months after the start of culturing (Figs. 1 and 2) and optimum callogenesis occurred at around the ninth month (35 to 40% of explants then bore calli).*

*Histological studies revealed two possible origins for callus formation:*

- *an internal origin in the perivascular cells of leaf explants (Fig. 3) and of the rachis of inflorescence fragments,*
- *an external origin in the pre-existing male floral meristems (Fig. 4).*

*Whatever their tissue origin, calli growth and multiplication is ensured by installing a peripheral meristematic layer organized here and there through as a cambial type layer.*

### □ Embryogenesis induction

*The calli were isolated from the explant from the sixth month of culturing onwards and placed on a medium rich in 2,4-D compared to the initial concentration; after varying lengths of time (1 to 12 months) these culturing conditions resulted in embryogenesis induction, in two possible ways:*

- *one, of multicellular origin, from epidermized meristematic structures that appeared on the surface of certain calli (Fig. 5). This way led to neoformation of often incomplete embryo type*

vent incomplètes (haustorium avec ou sans racine, embryons soudés à aspect parfois foliacé) ;

- l'autre, d'origine unicellulaire, caractérisée par des cellules embryogènes à gros noyaux, à cytoplasme dense riche en protéines solubles (coloration par le Naphthol Blue-Black). Ces cellules sont isolées du reste du cal par un épaississement de leur paroi mis en évidence par une coloration au P.A.S. (Fig. 6). Elles rappellent alors les cellules embryogènes décrites sur palmier à huile [7]. Cette seconde voie conduit à la formation de proembryons qui possèdent les caractéristiques des premiers stades de l'embryon zygotique (Fig. 7).

#### □ Maturation des embryons et obtention de pousses feuillées

La maturation des embryons est obtenue en réduisant progressivement la concentration en 2,4-D utilisée en embryogénèse. Des coupes histologiques d'embryons somatiques ont permis de mettre en évidence un apex caulinaire parfaitement structuré (Fig. 9) et la présence de réserves d'amidon dans le tissu haustorial à l'opposé du méristème de tige (localisation identique à celle trouvée dans l'embryon zygotique).

Le développement des pousses feuillées est réalisé sur un milieu dépourvu d'hormones (Fig. 8 et 10). L'émission de la racine peut parfois s'observer spontanément (sans traitement hormonal) ; cependant, dans la majorité des cas, elle nécessite un traitement auxinique à base d'ANA.

### CONCLUSION

Les résultats récents obtenus par l'équipe ORSTOM-IRHO/CIRAD ont conduit à la mise au point d'un premier protocole expérimental permettant l'obtention reproductible d'embryons somatiques complets. Une vingtaine de vitroplants appartenant à 5 clones différents ont pu être ainsi obtenus à partir d'explants foliaires et inflorescenciels. Le nombre de vitroplants régénérés par clone reste faible en raison de l'absence de phase de multiplication des embryoides. La maîtrise de la prolifération intensive des embryons néoformés, est actuellement recherchée au Laboratoire. Elle représente la condition indispensable pour une application à grande échelle.

Les techniques de régénération *in vitro* par embryogénèse somatique pouvant être source de variation somaclonale, il est dès à présent indispensable de vérifier la conformité des plants produits par ce protocole. Les premières observations concernant les caractéristiques de croissance et l'aspect végétatif des vitroplants régénérés sont tout à fait encourageants (Fig. 10, 11, 12).

**Remerciements.** — Nous remercions la station de recherche M. Delorme (Port Bouët, Côte-d'Ivoire) pour la fourniture du matériel végétal et pour sa précieuse collaboration.

*structures (haustorium with or without root, fused embryos, sometimes of a leaf-like appearance),*

- *the other, of unicellular origin, characterized by embryogenic cells with a large nucleus and dense cytoplasm rich in soluble proteins (staining with Naphthol Blue-Black). These cells were isolated from the rest of the callus by thickening of their wall, revealed by staining with P.A.S. (Fig. 6). They are similar to the embryogenic cells described for oil palm [7]. This second way led to formation of proembryos, which had the characteristics of the first stages of zygotic embryos (Fig. 7).*

#### □ Embryo maturation and obtaining shoots

*Embryo maturation was achieved by gradually reducing the 2,4-D concentration used for embryogenesis. Histological cross-sections of somatic embryos revealed a perfectly structured shoot meristem (Fig. 9) and the existence of starch reserves in the haustorial tissue opposite the stem meristem (identical location to that found in zygotic embryos).*

*Shoot development was carried out on a hormone-free medium (Figs. 8 and 10). Root emission was sometimes seen to be spontaneous (no hormone treatment), but in the majority of cases an NAA-based auxin treatment is required.*

### CONCLUSION

*The results recently obtained by the ORSTOM/IRHO-CIRAD team have led to the development of an initial experimental procedure for reproducible obtention of whole somatic embryos. Twenty or so ramets belonging to 5 different clones were obtained in this way from leaf and inflorescence explants. The number of ramets regenerated per clone remains small due to the absence of an embryoid multiplication phase. The command of intensive neoformed embryo proliferation, currently being sought in the laboratory, is a prerequisite for the large scale application.*

*As in vitro regeneration techniques involving somatic embryogenesis could be a source of somaclonal variation, it is now essential to check that the plants produced using this procedure are true-to-type. Initial observations of the growth and vegetative appearance of regenerated ramets are most encouraging (Figs. 10, 11, 12).*

**Acknowledgements.** — *We should like to thank the M. Delorme research station (Port Bouët, Ivory Coast) for supplying the plant material and for its valuable help.*

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] BRANTON R.L. et BLAKE J. (1984). — Clonal propagation of coconut palm. Proc Int. Cocoa/Coconuts. Kuala Lumpur. 1-8
- [2] BUFFARD-MOREL J., VERDEIL J.L et PANNETIER C. (1988). — Vegetative propagation of Coconut palm (*Cocos nucifera* L.) through somatic embryogenesis. Proc. Int. Biotech. Symp. 8th Paris. 117
- [3] BUFFARD-MOREL J., VERDEIL J.L et PANNETIER C. (1992). — Embryogenèse somatique du Cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir de tissus foliaires : étude histologique. Can. J ; Bot (sous presse).
- [4] HACCIUS B. (1978). — Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. Phytomorphology 28 : 74-81
- [5] PANNETIER C. et BUFFARD-MOREL J. (1982). Premiers résultats concernant la production d'embryons somatiques à partir de tissus foliaires de Cocotier (*Cocos nucifera* L.). *Oléagineux*, 37, 349-354
- [6] RAJU C.R, PRAKASH KUMAR P., CHANDRAMOHAN M. et IYER R.D (1984). Coconut plantlets from leaf tissue cultures. Journal of Plantation Crops 12 : 75-81
- [7] SCHWENDIMAN J., PANNETIER C. et MICHAUX-FERRIÈRE N. (1990). Histology of embryogenic formations during *in vitro* somatic embryogenesis of oil palm *Elaeis guineensis* Jacq. *Oléagineux*, 45 : 409-418.
- [8] VERDEIL J.L, BUFFARD-MOREL J et PANNETIER C. (1989) — Embryogenèse somatique du Cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir de tissus foliaires et inflorescenciels - Bilan des recherches et perspectives. *Oléagineux*, 44 : 403-411

## RESUMEN

**Embriogénesis somática del cocotero (*Cocos nucifera* L.) : obtención de varios clones de plántulas *in vitro*.**

VERDEIL J.L., HUET C., GROSDÉMANGES F., RIVAL A. y BUFFARD-MOREL J., *Oléagineux*, 1992, 47, N° 7, p. 465-469

Una etapa importante para el dominio de la propagación vegetativa del cocotero acaba de superarse : se logró obtener plántulas *in vitro* reproductibles en 5 clones pertenecientes a genotipos distintos. Se emplean dos tipos de tejidos tomados en individuos adultos : explantes de hojas y explantes de inflorescencias. El proceso empleado incluye las siguientes etapas : calogénesis en explantes primarios, inducción de la embriogénesis en los callos, maduración de los embriones, desarrollo de los brotes con hojas y de las raíces. La producción regular de callos de embriogénesis y de embriones somáticos completos hizo posible su descripción histológica.

**Palabras claves.** — *Cocos nucifera* L., embriogénesis somática, histología, plántulas *in vitro*.

## Légendes photos :

- FIG. 1. — Cals sur explant foliaire (× 1,4) après 4 mois de culture — (*Calli on leaf explant (× 1.4) after 4 month's culturing*)
- FIG. 2. — Cals néoformés au niveau des territoires floraux (× 2,2). Observations réalisées à partir du 4<sup>e</sup> mois de culture. — (*Neoformed calli infloral zones × 2.2-). Observations carried out from 4th month of culturing onwards*)
- FIG. 3. — Coupe histologique d'un explant foliaire porteur de cals : nodules méristématiques prenant naissance au niveau des cellules périvasculaires (× 4,5) (*Histological cross-section of a leaf explant with calli : meristematic nodules forming in perivascular cells × 4.5-*)
- FIG. 4. — Coupe histologique d'un explant inflorescenciel porteur de cals d'origine externe prenant naissance au niveau du méristème floral (× 12) — (*Histological cross-section of an inflorescence explant with calli of external origin forming in the floral meristem × 12-*)
- FIG. 5. — Structure embryogène apparue après isolement des cals et donnant naissance à des embryons (× 1,4) — (*Embryogenic structure appearing after callus isolation and giving rise to embryos × 1.4-*)
- FIG. 6. — Coupe histologique d'un cal embryogène (double coloration PAS-naphthol Blue-Black) (× 89) — (*Histological cross-section of an embryogenic callus -dual staining with PAS-Naphthol Blue-Black- × 89-*)
- FIG. 7. — Individualisation de cellules embryogènes et de proembryos au sein d'un cal par épaissement des parois externes (× 89) — (*Individualization of embryogenic cells and proembryos in a callus through external cell wall thickening × 89-*)
- FIG. 8. — Massif d'embryons avec émission des premières gaines foliaires (× 1,6) — (*Embryo clump with emission of the first leaf sheaths × 1.6*)
- FIG. 9. — Coupe dans un embryon somatique montrant la présence d'un apex caulinaire bien structuré (× 45) — (*Cross-section of a somatic embryo showing the existence of a well structured cauline apex × 45-*)
- FIG. 10. — Pousse feuillée obtenue à partir d'un embryon somatique isolé (× 0,6) — (*Shoot obtained from an isolated somatic embryo × 0.6-*)
- FIG. 11. — Système racinaire d'un vitroplant de cocotier en pépinière (× 0,5) — (*Root system of a coconut ramet in the nursery × 0.5-*)
- FIG. 12. — Vitroplant issu d'embryon somatique après acclimatation et transfert en sol (× 0,3) — (*Ramet from a somatic embryo after acclimatization and transfer to soil × 0.3-*)

