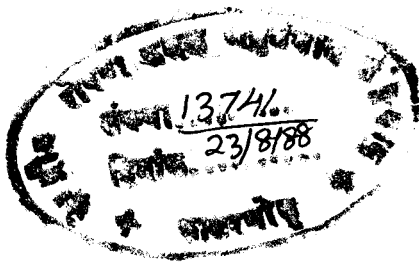


# Culture *in vitro* d'embryons zygotiques de cocotiers



B. ASSY BAH (1)

**Résumé.** — Le développement d'embryons excisés de noix de cocotier provenant de l'hybride GOA × NJM (PB-121) a été obtenu sur un milieu de culture simple, gélosé en présence de charbon actif. Un traitement auxinique a permis d'induire la formation d'un système racinaire bien développé. Après 5 à 6 mois de culture les plantules ont pu être transférées au sol avec succès. La méthode ainsi mise au point a été appliquée à 20 variétés de cocotier ; les résultats sont présentés dans cet article.

## INTRODUCTION

Dans le cadre des problèmes posés par l'amélioration du cocotier, la culture *in vitro* d'embryons zygotiques ouvre des perspectives intéressantes.

En effet, les semences de cocotier sont caractérisées par un poids et un volume importants, elles ne sont pas dormantes et leur germination est assez rapide. Par ailleurs la présence de bourre complique la réalisation des traitements phytosanitaires. L'ensemble de ces caractéristiques rend difficiles et coûteux le stockage et les échanges de semences, en particulier à l'occasion de prospections.

La culture *in vitro* d'embryons zygotiques représente une solution élégante et économique à ces problèmes. Un certain nombre de travaux ont déjà été réalisés sur ce sujet.

Les premiers travaux publiés dans ce domaine sont ceux de Cutter et Wilson [1954], puis Abrahams et Thomas [1962], et Ventura *et al.* [1966].

De nombreuses études ont ensuite été réalisées par l'équipe du Dr. De Guzman sur la culture d'embryons de noix macapuno, dont l'endosperme semi-liquide est très apprécié, mais qui ne germent pas dans les conditions naturelles [De Guzman 1970 ; Balaga et De Guzman 1971 ; Del Rosario et De Guzman 1976, 1981]. A partir d'embryons des variétés Grand Jamaïcain et Nain Vert, Fisher et Tsai [1978] ont obtenu le développement de jeunes plants ; de même Iyer [1981] rapporte l'obtention de plantules après 4 mois 1/2 de culture, cependant le transfert en sol n'a pu être réalisé avec succès. Ahée et Guénin (*non publié*) ont étudié la culture *in vitro* d'embryons issus d'un hybride Nain Jaune Malais × Grand Ouest Africain (PB-121 créé par l'IRHO) ; après 4 à 6 mois de culture, 30 p. 100 des embryons présentaient une partie aérienne bien développée ; un traitement auxinique assurait la formation d'un système racinaire satisfaisant et les plantules transférées sur sol ont poursuivi leur développement.

Le pourcentage de plantules obtenu en fonction de la taille (âge) de l'embryon a été étudié par Gupta *et al.* [1984] sur la variété de Grand de la Côte Ouest d'Inde

mais le transfert aux conditions naturelles de culture n'a pas été mentionné par ces auteurs.

Les travaux que nous avons entrepris avaient pour objectif la mise au point d'une méthode simple et performante de germination *in vitro* d'embryons excisés, et du transfert des plantules aux conditions naturelles de culture, applicable à toutes les variétés.

Les premières recherches ont été effectuées en France dans le laboratoire de physiologie végétale des Services scientifiques centraux de l'ORSTOM, puis ont été poursuivies en Côte d'Ivoire dans le laboratoire de culture *in vitro* de la station de recherche de La Mé.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Matériel végétal.

Les noix ont été, fournies par la station de recherche Marc-Delorme en Côte d'Ivoire. Pour les travaux réalisés en France des noix de semences PB-121 (hybride NJM × GOA) ont été expédiées par avion. On a utilisé des noix mures ou presque (11 et 12 mois après la fécondation) et immatures (7 et 8 mois après la fécondation).

En Côte d'Ivoire nous avons testé la méthode de culture *in vitro* sur 20 variétés (10 Grands et 10 Nains, voir Tabl. II, III au § Résultats).

### Prélèvement des embryons.

Les noix ont été débarrassées de la bourre et trempées dans une solution d'hypochlorite de Na à 3° chlorogénique. Elles ont ensuite été cassées en deux et on a prélevé de l'intérieur le cylindre d'albumen contenant l'embryon à l'aide d'un emporte-pièce.

Ce cylindre a été désinfecté dans une solution d'hypochlorite de Ca, à 45 g/litre pendant 20 minutes puis rincé trois fois à l'eau bidistillée stérile. Les embryons ont été ensuite isolés et pesés en conditions aseptiques avant d'être ensemencés sur les milieux de culture.

### Milieux de culture.

Les embryons ont été placés sur différents milieux, contenant chacun un milieu nutritif de base constitué par les

(1) Ingénieur agronome, Station IRHO-CIRAD de La Mé (Côte d'Ivoire).

éléments de la formule de Murashige et Skoog [1962], additionné des vitamines de Morel et Wetmore [1951], de 41 mg.l<sup>-1</sup> de complexe Fe-EDTA, de 100 mg.l<sup>-1</sup> d'ascorbate de sodium et de 20 g.l<sup>-1</sup> de saccharose. Selon les besoins, le milieu est additionné d'agar (Sigma, réf. : A 7002) à la concentration de 8 g.l<sup>-1</sup> et de charbon actif (Sigma réf. : C 5386) à la concentration de 2 g.l<sup>-1</sup>.

### Milieux utilisés

Traitements Composants	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>
Milieu de base	+	+	+
Agar (8 g.l <sup>-1</sup> )	-	+	+
Charbon actif (2 g.l <sup>-1</sup> )	-	-	+

Les pH des milieux ont été ajustés à 5,5 avant autoclavage. Les milieux de culture ont été coulés dans des tubes de 24 × 150 mm à raison de 20 ml par tube ou dans des tubes de 35 × 240 mm à raison de 60 ml par tube, selon les stades de développement atteints par les embryons. Ils ont été stérilisés par autoclavage pendant 20 min à 110 °C.

### Conditions physiques.

Les cultures ont été placées à 27 °C et maintenues dans l'obscurité jusqu'à la sortie de la gemmule, elles ont été ensuite éclairées 12 heures par 24 heures (3 000 lux). Les tubes de culture contenant le milieu liquide (A1), ont été agités par rotation sur des clinostats tournant à 10 tr/min.

### Observations.

Les observations ont porté sur la croissance en poids de matière fraîche (estimée par pesée tous les 15 jours jusqu'à

l'apparition de la gemmule). Le taux de croissance a été calculé après 45 jours de culture. Le pourcentage d'embryons présentant le développement d'une gemmule a été noté pour chaque traitement et pour chaque type d'embryons.

Les embryons excisés de noix de 7 et 8 mois ayant un comportement analogue ont été regroupés dans la présentation des résultats, ainsi que ceux issus de semences de 11 à 12 mois.

## RÉSULTATS

### Taux de croissance en poids de matière fraîche.

La croissance en poids de matière fraîche des embryons cultivés sur milieu liquide a été très forte. Le poids des embryons double tous les 12/13 jours environ, et cela quel que soit le stade de maturité (Tabl. I).

Sur milieu gélosé, la croissance en poids a été plus faible. Les embryons issus de noix immatures (7 et 8 mois) se développaient extrêmement lentement. Il faut plus de 2 mois de culture pour obtenir le doublement du poids de matière fraîche. Pour les embryons excisés de noix à 11 et 12 mois, le temps de doublement du poids frais était de 1 mois.

Par adjonction au milieu gélosé de charbon actif, on a observé une amélioration très nette de la croissance en poids. La présence de charbon a permis de tripler le taux de croissance ; il restait cependant inférieur à celui obtenu sur milieu liquide (Tabl. I).

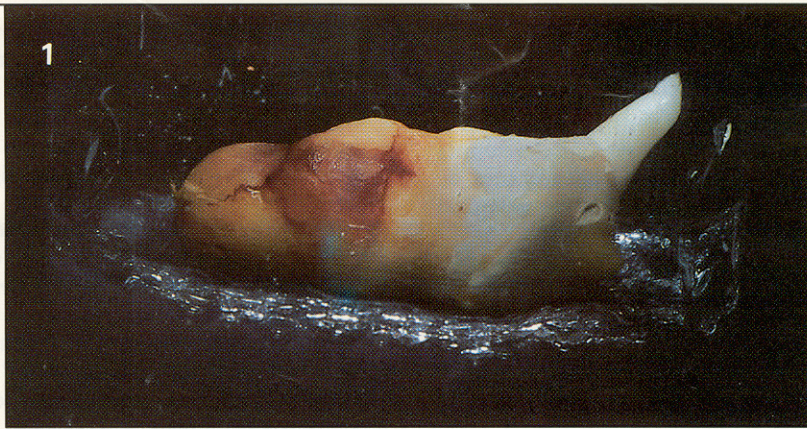
Le temps de doublement du poids de matière fraîche était de 23 jours et 17 jours pour les embryons issus de noix, respectivement prélevés 7 ou 8 mois et 11 ou 12 mois après la fécondation.

### Développement des embryons en plantules (Tabl. I).

En milieu liquide (A1) aucune gemmule n'est visible après trois mois de culture. On a constaté par ailleurs que

TABLEAU I. — Taux de croissance et développement des embryons (*Embryo growth and development rate*)

		Embryons issus de noix ( <i>Embryos from nuts</i> ) :						
		immatures			matures			
		Traitements ( <i>Treatments</i> )						
		A1	A2	A3	A1	A2	A3	
Nombre d'embryons non contaminés à 45 jours de culture ( <i>Number of uncontaminated embryos at 45 days of culturing</i> )		17	14	13	22	34	29	
Croissance en poids de matière fraîche ( <i>Fresh matter weight increase</i> )	Poids au prélèvement ( <i>Weight on sampling</i> ) (mg)	47,6	12,8	12	103	113,4	113	
	Résultats à 45 jours de culture ( <i>Results at 45 days of culturing</i> )	Poids ( <i>Weight</i> ) mg	555,8	20,93	47,4	1 254,95	311,7	742,7
		Taux de multiplication ( <i>Rate</i> )	11,67	1,63	3,95	12,2	2,7	6,57
		Temps de doublement ( <i>Doubling time</i> ) - jours ( <i>days</i> )	13	64	23	12	31	17
Développement des embryons à 4 mois ( <i>Embryo development at 4 months</i> )	Embryons contaminés ( <i>Contaminated embryos</i> )	2	2	2	2	4	6	
	Embryon présentant une gemmule visible à l'œil nu ( <i>Embryo with gemmule visible to the naked eye</i> )	Nombre ( <i>Number</i> )	0	0	6	0	0	21
		P. 100	0	0	54,5	0	0	91



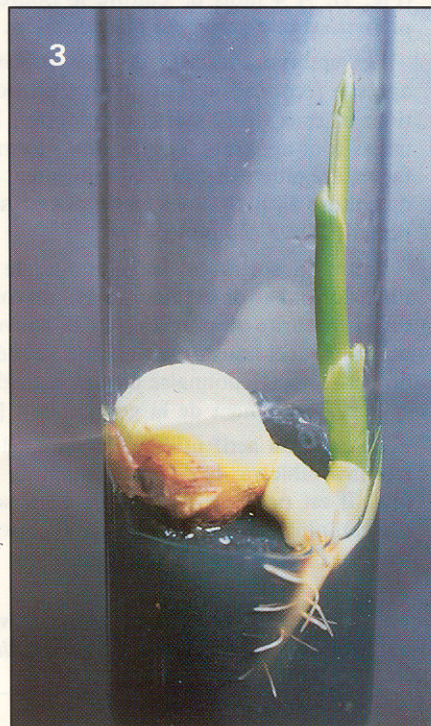
1

▲ FIG. 1. — Apparition de la gemmule sur un embryon prélevé sur une noix à maturité après 2 mois de culture (*Appearance of gemmule on an embryo taken from a mature nut, after 2 months of culturing*).



2

▲ FIG. 2. — Evolution d'un embryon prélevé sur une noix immature, après 3 mois de culture (*Development of embryo taken from an immature nut, after 3 months of culturing*).



3

▲ FIG. 3. — Evolution d'un embryon prélevé sur une noix à maturité, après 3 mois de culture (*Development of embryo taken from a mature nut, after 3 months of culturing*).



4

▲ FIG. 4. — Plantule avant le passage en serre, 5 mois de culture (*Plantlet before transfer to hot-house, 5 months of culturing*).

▼ FIG. 5. — Plantules en sol, en serre, après 3 semaines (*Plantlets in soil in the hot-house after 3 weeks*).



5

l'allongement des embryons issus de noix de 11 et 12 mois était plus important que celui des embryons excisés de noix immatures (7 à 8 mois). Ces derniers présentaient souvent des déformations.

En milieu gélosé (A2) les embryons se sont développés lentement et on a observé d'importants phénomènes de brunissement. Après 3 mois de culture, aucune gemmule n'est apparue sur l'ensemble des embryons traités.

Dans le cas du milieu gélosé additionné de charbon actif (A3), on a observé, dès les premières semaines de culture, pour les embryons issus de noix de 11 et 12 mois, un allongement plus rapide que pour les embryons de noix immatures. Après une phase d'allongement et d'augmentation de poids de 2 mois, les premières gemmules sont apparues (Fig. 1). A 4 mois de culture le pourcentage d'embryons présentant une gemmule était de 91 p. 100.

Les embryons excisés de noix prélevées à 7 et 8 mois après la fécondation, ont présenté de nombreuses déformations et sont restés moins développés. Les premières gemmules sont apparues à partir de 45 jours de culture mais de façon irrégulière et leur développement était lent. A 4 mois de culture 54 p. 100 des embryons présentaient le développement d'une gemmule.

Après la sortie de la gemmule, le développement de l'haustorium est le même, que l'embryon ait été mis en culture à maturité ou non (Fig. 2, 3), souvent chlorophyllien à la lumière, cet haustorium est très renflé et se trouve séparé du pétiole cotylédonnaire par un étranglement comme dans la noix au moment de la germination [Henry, 1957].

Le charbon actif utilisé en milieu gélosé a donc un effet très favorable sur le développement de l'embryon en plante. Il est possible qu'il agisse en adsorbant soit les substances inhibitrices produites par l'embryon, soit celles contenues dans l'agar [Kohlenbach et Wernicke, 1977 ;

Johansson, 1983], de même il pourrait apporter certains éléments favorables au développement de l'embryon.

Sur le milieu gélosé additionné de charbon actif on a obtenu après 5 à 6 mois de culture une partie aérienne bien développée (Fig. 4) ; 80 p. 100 des pousses de ce type présentaient une racine principale vigoureuse ainsi que des racines secondaires.

Des essais sur l'influence de différents milieux de culture ont été réalisés afin d'améliorer la qualité du système racinaire ainsi que le pourcentage de plants bien racinés. Le pourcentage d'enracinement a été de 100 p. 100 pour les plantules placées sur un milieu constitué du milieu de base décrit plus haut et contenant de l'agar à la concentration 8 g.l<sup>-1</sup>, du charbon actif 2 g.l<sup>-1</sup> et enrichi en ANA à la concentration 2 mg.l<sup>-1</sup>.

Après 6 à 7 mois de culture, les plantules ainsi traitées ont été transférées en sol (Fig. 5). Les plants ont poursuivi leur développement dans les conditions naturelles et nous disposons actuellement de plantules, issues d'embryons excisés, qui ont été transférées en sol depuis plus de 2 ans.

#### Application à différentes variétés.

L'ensemble des embryons a été ensemencé sur milieu gélosé additionné de charbon actif. Il s'agit d'embryons issus de noix à maturité. Leur comportement en culture a été identique à celui des embryons issus de semences de l'hybride PB-121. On a observé cependant que l'apparition de la gemmule était plus précoce pour les variétés de Nains que pour les variétés de Grands (Tabl. II et III). Les résultats des variétés de Nains ont été voisins de ceux obtenus avec l'hybride PB-121. A trois mois de culture le pourcentage d'embryons présentant une gemmule développée a été de 91 p. 100 pour les variétés de Nains (Tabl. II) et de 50 p. 100 en moyenne pour les variétés de Grands (Tabl. III).

TABLEAU II. — Développement *in vitro* des embryons de différentes variétés de Nains  
(*In vitro development of embryos from different Dwarf varieties*)

Variété (Variety)	Embryons en culture non contaminée ( <i>Untaminated embryos under culturing conditions</i> )	Embryons présentant une gemmule à : ( <i>Embryos with gemmule at</i> :		P. 100	
		mois (months) 3	4	mois (months) 3	4
Semences ( <i>Seeds</i> ) PB-121	19	19	19	100	100
Nain Vert Thaïlande - NVT ( <i>Thailand Green Dwarf - TGD</i> )	24	24	24	100	100
Nain Vert Guinée Equatoriale - NVE = NVB ( <i>Equatorial Guinea Green Dwarf - EGD = BGD</i> )	27	27	27	100	100
Nain Vert Sri Lanka - NVS ( <i>Sri Lanka Green Dwarf - SGD</i> )	24	24	24	100	100
Nain Jaune Malaisie - NJM ( <i>Malayan Yellow Dwarf - MYD</i> )	20	20	20	100	100
Nain Rouge Cameroun - NRC ( <i>Cameroon Red Dwarf - CRD</i> )	16	16	16	100	100
Nain Brun Nouvelle Guinée - NBN ( <i>New Guinea Brown Dwarf - NBD</i> )	21	20	21	95	100
Nain Vert Philippines - NVP ( <i>Philippine Green Dwarf - PGD</i> )	20	17	19	85	95
Nain Vert Malaisie - NVM ( <i>Malayan Green Dwarf - MGD</i> )	26	22	24	84	92,3
Nain Rouge Malaisie - NRM ( <i>Malayan Red Dwarf - MRD</i> )	19	14	17	73,7	89,5
Nain Niu Leka - NNL ( <i>Niu Leka Dwarf - NLD</i> )	17	11	14	64,7	82,4
Moyenne ( <i>Mean</i> )	21,4	19,5	20,6	91,1	96,3

TABLEAU III. — Développement *in vitro* des embryons de différentes variétés de Grands  
(*In vitro development of embryos from different Tall varieties*)

Variété (Variety)	Embryons en culture non contaminés (Uncontaminated embryos under culturing conditions)	Embryons présentant une gemmule à : (Embryos with gemmule at) :					
		P. 100			P. 100		
		mois (months)			mois (months)		
		3	4	5	3	4	5
Grand Rennell - GRL ( <i>Rennell Tall - RLT</i> )	15	12	13	14	80	86,6	93,3
Grand Vanuatu - GVT ( <i>Vanuatu Tall - VTT</i> )	15	11	12	13	73,33	80	86,6
Grand Salomon - GSN ( <i>Solomon Tall - SNT</i> )	11	7	8	9	63,6	72,7	81,8
Grand Tonga - GTG ( <i>Tonga Tall - TGT</i> )	16	9	10	11	56,2	62,5	68,75
Grand Comores - GCO ( <i>Comoro Tall - COT</i> )	16	8	10	12	50	62,5	75
Grand Polynésie - GPY ( <i>Polynesia Tall - PYT</i> )	12	6	6	6	50	50	50
Grand Nouvelle Guinée - GNG ( <i>New Guinea Tall - NGT</i> )	13	6	6	6	46,1	46,1	46,1
Grand des Indes - GND ( <i>India Tall - NDT</i> )	16	6	8	11	37,5	50	68,75
Grand Thaïlande - GTH ( <i>Thailand Tall - THT</i> )	14	3	4	5	21,4	28,6	35,7
Grand Ouest Africain - GOA ( <i>West African Tall - WAT</i> )	15	4	5	5	26,7	33,3	33,3
Moyennes (Means)	14,3	7,2	8,2	9,2	50,34	57,34	64,3

## CONCLUSION

Il a été possible d'obtenir, sur un milieu solide de composition simple, le développement d'embryons excisés de cocotier. Les plantules obtenues ont été transférées avec succès aux conditions naturelles de culture.

L'adjonction de charbon actif s'est avérée un facteur indispensable, dans nos conditions de culture, à une organogénèse correcte et rapide. La gemmule apparaît après 2 mois de culture et une plantule présentant plusieurs feuilles bien développées a été obtenue après 5 à 6 mois de culture.

De plus, le milieu et les conditions de culture mis au point pour obtenir le développement d'embryons issus de semences hybrides Nain × Grand ont permis d'obtenir des résultats identiques pour des embryons issus de 10 variétés de Nains différentes. Ces conditions de culture sont également utilisables pour les embryons de variétés de Grands mais, dans ce cas, le développement de la gemmule est plus lent.

Ces résultats permettent dès maintenant d'envisager l'utilisation de la culture *in vitro* d'embryons zygotiques pour faciliter le transport des semences de cocotier et pour résoudre les problèmes de quarantaine. De plus, ils offrent la possibilité d'une nouvelle méthode de collecte de matériel végétal dans les conditions de prospection. Dans cette optique, nous orientons actuellement nos travaux sur l'amélioration des conditions de développement des embryons et nous étudions les conditions de prélèvement et de stockage des embryons en conditions non aseptiques.

**Remerciements.** — Nos travaux ont été entrepris au laboratoire de physiologie végétale de l'ORSTOM sous la direction de Mme BUFFARD-MOREL ; ils ont été poursuivis au laboratoire de culture *in vitro* de la station IRHO/CIRAD de La Mé en Côte d'Ivoire. Nous remercions Mme AHÉE et Monsieur GUÉNIN pour leurs précieux conseils ainsi que la station Marc-Delorme pour la fourniture du matériel végétal.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] ABRAHAM A. et THOMAS K. J. (1962). — A note on the *in vitro* culture of excised coconut embryos. *Indian Coconut J.*, **12**, 2, p. 84-87.
- [2] BALAGA H. Y. et De GUZMAN E. V. (1971). — The growth and development of coconut « Makapuno » embryos *in vitro*. II. Increased root incidence and growth in response to media composition and to sequential culture from liquid to solid medium. *Philip. Agric.*, **53**, 10, p. 551-565.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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 the medium during the liquid and solid cultures. *Philip. J. Sci.*, **105**, p. 215-222.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] FRIDBERG G., PEDERSON P., LANDSTROM L. E., ERIKSSON T. (1978). — The effect of activated charcoal on tissue culture ; adsorption of metabolite inhibiting morphogenesis. *Physiol. Plant.*, **43**, p. 104-106.

- [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 Repts.*, **3**, p. 222-225.
- [10] HENRY P. (1957). — Recherches sur la croissance et le développement chez *Elaeis guineensis* Jacq. et chez *Cocos nucifera* L. — Comparaison avec quelques autres palmiers. *Thèse*, Faculté des Sciences, Université de Paris, 154 p.
- [11] 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.
- [12] JOHANSSON L. (1983). — Effects of activated charcoal in anther culture. *Physiol. Plant.*, **59**, p. 397-403.
- [13] KOHLENBACH H. W. et WERNICKE W. (1977). — Investigation on the inhibitory effect of agar and the function of active carbon in anther culture. *Physiol. Plant.*, **86**, p. 463-472.
- [14] MOREL G. et WETMORE R. M. (1951). — Fern callus tissue culture. *Am. J. Bot.*, **38**, p. 141-143.
- [15] MURASHIGE T. & SKOOG F. (1962). — A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, **15**, p. 473-497.
- [16] VENTURA F., ZUNIGA L. C., FIGUERA J. E. (1966). — A progress report on the development of coconut embryo in artificial media. *Philip. J. Plant. Ind.*, **31**, 2, p. 81-87.

## SUMMARY

*In vitro* culture of coconut zygotic embryos.

B. ASSY BAH, *Oléagineux*, 1986, **41**, N° 7, p. 321-328.

The development of embryos excised from nuts of the WAT × MYD (PB-121) coconut hybrid was obtained on a single agar agar culture medium in the presence of active carbon. Auxin treatment enabled induction of a well formed root system. After 5 to 6 months of culturing, it was possible to transfer plantlets successfully to the soil. The method thus developed has been applied to 20 varieties of coconut; the results are given in this article.

## RESUMEN

Cultivo *in vitro* de embriones zigóticos de cocoteros.

B. ASSY BAH, *Oléagineux*, 1986, **41**, N° 7, p. 321-328.

Se logró desarrollar embriones sacados de nueces de cocotero procedentes del híbrido GOA × NJM (PB-121) en un medio de cultivo sencillo, con gelosa en presencia de carbón activo. Un tratamiento con auxina indujo la formación de un sistema radicular bien desarrollado. A los 5 a 6 meses de cultivo se acertó a trasplantar las plántulas del tubo de ensayo a la tierra, tratamiento éste que tuvo éxito. El método así desarrollado se aplicó a 20 variedades de cocotero, presentándose los resultados en el presente artículo.

***In vitro* culture of coconut zygotic embryos**

B. ASSY BAH (1)

## INTRODUCTION

In terms of problems posed by coconut improvement, the *in vitro* culture of zygotic embryos opens up interesting prospects.

In effect, coconut seeds are typically heavy and large; they are not dormant and germinate quite quickly. Moreover, the husk complicates phytosanitary treatments. These characteristics render storage and seed exchanges difficult and costly, notably when prospecting.

The *in vitro* culture of zygotic embryos represents an apt and economic solution to these problems; a certain amount of research has already been carried out in this field.

The first published research was that of Cutter and Wilson [1954], followed by Abrahams and Thomas [1962], and Ventura *et al.* [1966].

Numerous studies were then carried out by Dr. De Guzman's team on the culturing of Macapuno nut embryos, the semi-liquid endosperm of these nuts is of great value, though they do not germinate under natural conditions [De Guzman, 1970; Balaga and De Guzman, 1971; Del Rosario and De Guzman, 1976, 1981]. Fisher and Tsai [1978] obtained developing young plants from Jamaican Tall and Green Dwarf embryos; likewise, Iyer [1981], reports obtained plantlets after 4 1/2 months of culturing, though transfers to the soil were unsuccessful. Ahée and Guénin (*unpublished*) studied the *in vitro* culture of embryos from a Yellow Malayan Dwarf × West African Tall hybrid (PB-121 created by the IRHO); after 4-6 months of culturing, 30 p. 100 of the embryos had a well developed aerial part, whilst an auxin

(1) Agronomist, IRHO-CIRAD La Mé Station (Côte d'Ivoire).

treatment ensured a satisfactory root system and plantlets transferred to the soil continued their development.

The percentage of plantlets obtained according to embryo size (age) was studied by Gupta *et al.* [1984] on the Indian West Coast Tall, but the transfer to natural growing conditions was not mentioned by the authors.

The objective of the research presented in this article was to perfect a simple and efficient method for the *in vitro* germination of excised embryos and for the transfer of plantlets to natural growing conditions, applicable to all varieties.

Initial research was undertaken in France at the Plant Physiology Laboratory, ORSTOM Central Scientific Services, then continued in the Côte d'Ivoire in the *in vitro* culture laboratory at the La Mé Research Station.

## MATERIALS AND METHODS

### Planting material.

The nuts were supplied by the Marc-Delorme Research Station in the Côte d'Ivoire. For work carried out in France, PB-121 seednuts (YMD × WAT) were sent by air. Mature or almost mature nuts (11 and 12 months after fertilization) as well as immature nuts (7 and 8 months after fertilization) were used.

In the Côte d'Ivoire, the *in vitro* culture method was tested on 20 varieties (10 Talls and 10 Dwarfs, see Table II, III under « Results »).

### Sampling of embryos.

The nuts were husked and soaked in a 3° chlorogenic sodium hypochlorite solution. They were then split in half to reach the inner parts, from which the albumen cylinder containing the embryo was removed with a punch.

This cylinder was disinfected in a calcium hypochlorite solution at 45 g/litre for 20 minutes, then rinsed three times with twice distilled sterile water. The embryos were then isolated and weighed under aseptic conditions before being cultured on media.

### Culture media.

The embryos were placed on different media, each of which contained a basic nutritive medium composed of elements from the Murashige and Skoog formula [1962], enriched with vitamins used by Morel and Wetmore [1951], 41 mg.l<sup>-1</sup> of the Fe-EDTA complex, 100 mg.l<sup>-1</sup> of sodium ascorbate and 20 g.l<sup>-1</sup> of saccharose. According to needs, the medium was enriched with agar (Sigma, ref. : A 7002) at a concentration of 8 g.l<sup>-1</sup> and active carbon (Sigma ref. : C 5386) at the concentration of 2 g.l<sup>-1</sup>.

Media used

Components	Treatments		
	A1	A2	A3
Basic medium	+	+	+
Agar (8 g.l <sup>-1</sup> )	-	+	+
Active carbon (2 g.l <sup>-1</sup> )	-	-	+

Media pH levels were adjusted to 5.5 before autoclaving. The media themselves were poured into 24 × 150 mm tubes at the rate of 20 ml per tube or into 35 × 240 mm tubes at the rate of 60 ml per tube, depending on the stages of development reached by the embryos. They were sterilized in the autoclave for 20 min. at 110 °C.

### Physical conditions.

The cultures were kept in darkness at 27 °C until gemmules appeared, then underwent 12-hour on-off light treatments (3,000 lux). Culture tubes containing the liquid medium (A1) were shaken by means of a clinostat rotating at 10 rpm.

### Observations.

Observations concerned growth expressed as the weight of fresh matter (estimated by weighing every 15 days until the gemmules

appeared). The growth rate was calculated after 45 days of culturing. The percentage of embryos with gemmules was recorded for each treatment and each type of embryo.

Embryos excised from 7 and 8-month old nuts and showing similar development were grouped together in the presentation of results, as was the case for those excised from 11 and 12-month old nuts.

## RESULTS

### Growth rate expressed as the weight of fresh matter.

The development of embryos cultured in a liquide medium, expressed as the weight of fresh matter, was considerable. Their weight doubled approximately every 12-13 days, whatever the stage of maturity (Table I).

On the agar-agar medium, growth weight increase was less considerable. The embryos from immature nuts (7 and 8 months) developed extremely slowly. More than 2 months of culturing were required to double the weight of fresh matter. For embryos excised from 11 and 12-month old nuts, 1 month of culturing was required to double the weight of fresh matter.

By adding active carbon to the agar-agar medium, a marked improvement of growth expressed as weight was observed. The presence of carbon enabled the growth weight to triple ; though this rate remained lower than that obtained on the liquid medium (Table I).

For embryos taken from nuts 7 or 8 months and 11 or 12 months after fertilization, the time, required to double the weight of fresh matter was 23 days and 17 days respectively.

### Development of embryos into plantlets (Table I).

In the liquid medium (A1), no gemmules were visible after three months of culturing. Moreover, it was seen that embryos from 11 and 12-month old nuts elongated more than those from immature nuts (7-8 months), the latter often being deformed.

On the agar-agar medium (A2), embryos developed slowly and considerable browning phenomena were observed. After three months of culturing, no gemmules were visible on any of embryos treated.

On the agar-agar medium enriched with active carbon (A3), it was observed, from the first weeks of culturing onwards, that embryos from 11 and 12-old nuts elongated faster than those from immature nuts. After a 2-month phase of elongation and increase in weight, the first gemmules appeared (Fig. 1). At 4 months of culturing, 91 p. 100 of the embryos were gemmule bearing.

The embryos excised from nuts sampled at 7 and 8 months after fertilization had numerous deformations and remained less developed. The first gemmules appeared after 45 days of culturing, though their rate of appearance was irregular and their development slow. At 4 months of culturing, 54 p. 100 of the embryos were gemmule bearing.

After the gemmule appears, haustorium development is the same, whether the embryo underwent culturing at maturity or not (Fig. 2, 3). Often chlorophyllous under light, this haustorium is very swollen and is separated from the cotyledonary petiole by a constriction much the same as occurs in the nut at the time of germination [Henry, 1957].

Hence adding active carbon to the agar-agar medium has a very favorable effect on the development of embryos into plantlets. It is possible that this effect comes about through the adsorption of either inhibiting substances produced by the embryo or those found in the agar [Kohlenbach and Wernicke, 1977 ; Johansson, 1983], likewise, it could be that it adds certain elements which favor embryo development.

On the agar-agar medium enriched with active carbon, a well developed aerial part developed after 5-6 months of culturing (Fig. 4) ; 80 p. 100 of this type of shoot had a sturdy primary root and secondary roots as well.

Trials on the influence of different culture media were carried out to improve the quality of the root system as well as the percentage of well rooted plants. 100 p. 100 of the plantlets placed on the basic medium described above, containing agar at a concentration of 8 g.l<sup>-1</sup> and active carbon at 2 g.l<sup>-1</sup>, and enriched with ANA at the concentration of 2 mg.l<sup>-1</sup> developed roots.

After 6-7 months of culturing, the plantlets thus treated were transferred to the soil (Fig. 5). They continued their development under natural growing conditions and at present there are plantlets developed from excised embryos which have been in the soil for more than 2 years.

#### Application to different varieties.

All of the embryos taken from mature nuts underwent culturing on an agar-agar medium enriched with active carbon. Their performance under culturing conditions was identical to that of embryos from the PB-121 hybrid. Nonetheless, it was observed that the gemmule appeared earlier on Dwarf varieties than on Tall varieties (Tables II and III). Dwarf variety results were similar to those obtained with the PB-121 hybrid. At 3 months of culturing 91 p. 100 of the embryos from Dwarf varieties had a developed gemmule (Table II), whilst the rate was 50 p. 100, on average, for those from Tall varieties (Table III).

#### CONCLUSION

It was possible to obtain, on a solid medium of a simple composition, the development of embryos excised from coconut. The resulting plantlets were successfully transferred to natural growing conditions.

The addition of active carbon proved, under existing cultural conditions, to be indispensable for correct and rapid organogenesis. The gemmule appeared after 2 months of culturing and the plantlet had several well developed leaves after 5-6 months of culturing.

Moreover, the medium and culturing conditions perfected to obtain developing embryos from hybrid Dwarf × Tall seeds made it possible to obtain identical results for embryos from 10 varieties of Dwarfs. These culturing conditions can also be used for Tall variety embryos, but in this case, gemmule development is slower.

As from now, these results make it possible to envisage using the *in vitro* culture of zygotic embryos to simplify coconut seed transport and solve quarantine problems. Furthermore, they offer the possibility of a new method of collecting planting material for prospection purposes. Bearing this in mind, our research is now oriented towards the improvement of embryo development conditions and studies are being carried out on the sampling and storage of embryos under non-aseptic conditions.

**Acknowledgements.** — *Our research was carried out at the Plant Physiology laboratory at ORSTOM under the direction of Mrs. BUFFARD-MOREL ; they were continued in the in vitro culture laboratory at the IRHO-CIRAD La Mé Research Station in the Côte d'Ivoire. We should like to thank Mrs. AHÉE and Mr. GUÉNIN for their valuable advice as well as the Marc-Delorme Station for the supply of planting material.*

## Bibliographie

### FLAVOR CHEMISTRY OF FATS AND OILS CHIMIE DE LA FLAVEUR DES HUILES ET GRAISSES

D.B. MIN, T.H. SMOUSE, ed.

Publ. American Oil Chemist's Society (AOCS), 508 S. Sixth St., Champaign, IL 61820, U.S.A.  
Monograph. AOCS N° 15, 1985, 309 p. (ISBN - 0-935315-12-8)

Les recherches sur la chimie de la flaveur des huiles et graisses ont remarquablement avancé au cours des 20 dernières années en raison notamment des progrès de l'analyse instrumentale. Cette nouvelle monographie de l'AOCS en apporte la preuve. Elle rassemble 14 chapitres dus à différents chercheurs et traitant de la chimie de l'oxydation et de l'autoxydation, des antioxygènes naturels

et de synthèse, des méthodes instrumentales pour l'évaluation de la flaveur, de l'isolement, de la séparation et de la caractérisation des composés de flaveur...

Les chimistes concernés par les problèmes de flaveur, comme les chercheurs et techniciens travaillant dans l'industrie alimentaire trouveront dans cet ouvrage les plus récentes informations dans un domaine d'intérêt croissant.

