

Collaboration internationale pour la maîtrise de la multiplication végétative *in vitro* du cocotier (*Cocos nucifera* L.)

Valérie Hocher, Jean-Luc Verdeil, Frédérique Grosdemange,
Christine Huet, Roland Bourdeix, Yapo N'Cho,
Alassane Sangare, Roland Hornung, Hans-Jörg Jacobsen,
Erlinda Rillo, Carlos Oropeza, Serge Hamon

Présentation de la plante

Dans la zone intertropicale humide, où il est largement réparti, le cocotier est souvent surnommé « Arbre aux cent usages » ou « Arbre de vie ». Si toutes les parties de la plante peuvent être valorisées par l'homme en fournissant des éléments essentiels à sa vie (nourriture, boisson, habitat), le cocotier demeure avant tout une plante oléagineuse, dont l'huile est extraite du coprah (albumen déshydraté). Le cocotier s'insère parfaitement dans une éco-

nomie villageoise en assurant un revenu régulier à des millions de petits producteurs. On estime en effet que la moitié de la production mondiale (environ 9,5 millions de tonnes en 1995, estimée en équivalent coprah) [1] est consommée localement [2]. Le cocotier a également une vocation de plante de grande culture. Son huile, riche en acide laurique, est très recherchée par l'industrie des cosmétiques, et n'est alors en concurrence qu'avec l'huile de palmiste. Jusque dans les années 50, le cocotier occupait la première place parmi les plantes oléagineuses ; aujourd'hui il n'arrive qu'au septième rang mondial. On observe un déclin important de la productivité, lié au vieillissement des plantations et à l'existence de maladies. Il ne pourra être enravé que grâce à des programmes de replantation, ce qui nécessite de disposer d'un matériel végétal très productif. Des schémas de sélection ont donc été mis en place dans différents pays producteurs (Côte d'Ivoire, Philippines, Sri Lanka, Inde...) et des hybrides ayant un potentiel de production double de celui des variétés traditionnelles ont été obtenus [2]. Cependant, la sélection classique se heurte à un certain nombre de contraintes liées à la biologie particulière de cette plante : une forte hétérozygotie, un faible coefficient de multiplication, un cycle de sélection long et une graine récalcitrante ayant un volume important, ce qui rend difficiles la conservation et la diffusion du matériel. De plus, le cocotier ne présente pas de multiplication végétative naturelle.

Choix de l'embryogenèse somatique

Le cocotier n'est actuellement propagé que par voie sexuée ; les seuls espoirs de multiplication végétative reposent sur les techniques de culture *in vitro*. La présence d'un seul bourgeon végétatif assurant la croissance de l'appareil aérien et la nécessité de maintenir la plante mère au champ éliminent toute possibilité de micropropagation par culture du méristème végétatif. La réversion de méristèmes floraux vers un fonctionnement végétatif [3, 4] et la néoformation de méristèmes caulinaires par culture de fragments d'organes [5] ont été envisagées ; elles sont abandonnées aujourd'hui en raison du peu de résultats positifs obtenus. Les différentes équipes qui travaillent sur le clonage du cocotier concentrent actuellement leurs efforts sur l'embryogenèse somatique, dont la mise au point permettrait d'obtenir un matériel homogène par clonage d'individus hautement performants, ce qui conduirait à une amélioration sensible de la productivité et de l'homogénéité des plantations. Une valorisation plus rapide des résultats de la sélection serait obtenue avec la diffusion rapide de clones dans des programmes d'amélioration. En outre, cette méthode permettrait un clonage et donc une diffusion rapide et large d'individus sélectionnés pour leur résistance aux maladies et/ou à des conditions climatiques difficiles telles que la sécheresse.

V. Hocher, J.-L. Verdeil, F. Grosdemange, C. Huet, Serge Hamon : ORSTOM/CIRAD-CP, Laboratoire GeneTrop, Unité de génétique et amélioration des plantes, BP 5045, 34032 Montpellier cedex 01, France.

R. Bourdeix, Y. N'Cho, A. Sangare : IDEFOR/DPO, Station Marc-Delorme, Port-Bouët, BP 13, Abidjan 07, Côte d'Ivoire.

R. Hornung : Université de Londres, Wye College, Wye, Ashford, TN25 5AH, Royaume-Uni.

H.J. Jacobsen : Université de Hanovre, Herrenhauser str 2, Hannover D-3000, Allemagne.

E. Rillo : PCA, Albay Research Center, Banao, 4503 Guinobatan, Albay, Philippines.

C. Oropeza : CICY, 7 Antigua carretera A Progreso, Ex-Hacienda Xcumpich, 97310 Cordemex, Mérida, Mexique.

Tirés à part : V. Hocher

Pourquoi une association ?

Les premiers résultats sur l'embryogenèse somatique furent prometteurs, avec l'obtention dès 1982 de formations de type embryon [6]. Entre 1985 et 1990, plusieurs équipes ont pu obtenir la régénération de plantules à partir de tissus somatiques [7-9], mais seul un nombre réduit de vitroplants fut obtenu, et ce de manière erratique. L'embryogenèse somatique du cocotier demeure mal maîtrisée car, si la famille des Arécacées est considérée comme peu réactive *in vitro* (elle cumulerait la difficulté de régénération des monocotylédones et celle des plantes ligneuses [10]), le cocotier est certainement le palmier le plus récalcitrant *in vitro* [11]. En outre, la compétition entre les différentes équipes, motivée par l'obtention des premiers plants régénérés, a longtemps constitué un obstacle à la diffusion des connaissances sur le comportement *in vitro* des tissus de cocotier. La prise de conscience de cette lacune majeure [12, 13] a récemment conduit plusieurs laboratoires à envisager une association qui pourrait permettre de répondre à un tel défi.

Vers une collaboration internationale

Trois équipes européennes, le Wye College (Royaume-Uni), l'Université de Hanovre (Allemagne) et l'ORSTOM/CIRAD-CP (France) en association avec trois partenaires du Sud, l'IDEFOR/DPO (Côte d'Ivoire), le PCA (Philippines) et le CICY (Mexique) ont proposé une collaboration. Ensemble ils ont identifié les problèmes majeurs rencontrés en culture *in vitro* du cocotier et un programme de recherche a été soumis à la Communauté Européenne qui en a accepté le financement. Ce projet STD3 (Sciences et technologies du vivant pour les pays en développement) N°ERBTS3*CT940298, intitulé *Coconut : development of methods for the clonal propagation of elite, disease resistant palms by somatic embryogenesis*, a débuté en 1995 pour 3 ans.

Association STD3 : stratégie de recherche

La gestion de ce type de programme est bien réglementée par l'Union européenne

(UE), qui s'assure de son bon fonctionnement au travers d'un des instituts participants désigné comme coordinateur du projet (ici, l'ORSTOM). Le rôle du coordinateur est multiple : il assure le lien entre les partenaires du projet et l'UE, au travers des rapports d'activités (bisannuels), qu'il est chargé de collecter et de diffuser, et des comptes rendus qui suivent les réunions annuelles des partenaires ; il assure aussi le bon déroulement du projet ainsi que sa gestion financière. Il faut également signaler que chaque partenaire bénéficie d'une protection juridique grâce à un Contrat de Consortium, qui a été établi dès le début du projet (S. Hamon et J.-L. Verdeil, comm. pers.). Lors de la première réunion STD3 (Montpellier, mars 1995), les différents partenaires ont présenté chacun un bilan de leurs travaux et ont défini clairement les difficultés rencontrées communément en culture *in vitro* du cocotier.

Parmi les difficultés majeures identifiées on peut citer : un brunissement intense des tissus maintenus *in vitro*, une forte hétérogénéité dans le comportement de ces tissus, un temps de réponse *in vitro* extrêmement long, la difficulté d'obtention d'embryons somatiques capables de germer et la faible vigueur des vitroplants.

L'identification de ces problèmes a ensuite permis aux partenaires d'élaborer de façon précise un programme de recherche pour chaque équipe. Un des points essentiels a été de planifier des échanges importants aussi bien en matière d'information que de compétence. Ainsi la création d'une *Coconut Newsletter* permet la diffusion d'idées et d'informations diverses (en dehors des réunions annuelles) et l'organisation de stages de formation dans chaque laboratoire a permis d'échanger et de comparer techniques et protocoles de culture, base essentielle d'une collaboration fructueuse.

Principaux résultats obtenus dans le cadre du programme STD3

Amélioration du protocole de régénération

Culture *in vitro*

Le procédé de culture *in vitro* développé par les différentes équipes comporte quatre phases : callogenèse, induction de l'embryogenèse, maturation et germination des embryons. Un des enjeux de ce projet était

d'améliorer de façon sensible les pourcentages de callogenèse, d'embryogenèse et d'obtention d'embryons complets capables de germer. À cet effet, les nombreux échanges et notamment la publication interne au STD3 d'une « Compilation des Protocoles » ont permis de tester en parallèle les protocoles des différentes équipes. Cette comparaison a permis l'identification des facteurs clés de la culture *in vitro* du cocotier pour chacune des étapes du protocole de régénération. L'utilisation d'explants immatures – feuilles, inflorescences (photo 1A) ou tissus embryonnaires – formés en partie de cellules méristématiques indifférenciées, est essentielle, comme chez la plupart des monocotylédones pour l'obtention de cals (photo 1B). Le second facteur qui conditionne le succès de la callogenèse est la présence d'un régulateur de croissance à forte activité auxinique : le 2,4-D en association avec le charbon actif. L'acquisition de la compétence à l'embryogenèse par les cals est dépendante du niveau de 2,4-D en présence de charbon actif (photo 1C). La maturation des embryons somatiques (photo 1D) est obtenue en réduisant progressivement la concentration en 2,4-D et par l'addition d'une cytokinine (2iP, TDZ ou BAP) qui est indispensable à la différenciation du méristème caulinaire au sein de l'axe embryonnaire. Enfin les facteurs essentiels à la germination sont la suppression du 2,4-D et la présence de BAP (photo 1E, F G).

Grâce à la comparaison des différents protocoles, l'équipe ORSTOM/CIRAD-CP a sensiblement amélioré le protocole de régénération à partir d'inflorescences immatures (figure). Ainsi, les pourcentages moyens de callogenèse, d'induction de l'embryogenèse et de maturation ont augmenté par rapport à ceux obtenus en 1995, avant le début de la collaboration. Ce constat a été fait (avec des pourcentages comparables) chez nos autres partenaires et en particulier aux Philippines, où le PCA a su rapidement tirer parti de cette collaboration, puisque des vitroplants viennent d'être obtenus après maturation et germination des embryons en présence de cytokinines (BAP), ce qui valide en retour une des avancées du protocole mis au point à Montpellier [14].

Un protocole de régénération à partir de plumule (méristème caulinaire de l'embryon zygotique entouré des ébauches foliaires) est actuellement en test sur la base des échanges avec l'équipe de Wye [15]. L'avantage est la rapidité de réaction du matériel (2 mois au lieu de 8 pour la phase de callogenèse) et l'homogénéité de cette

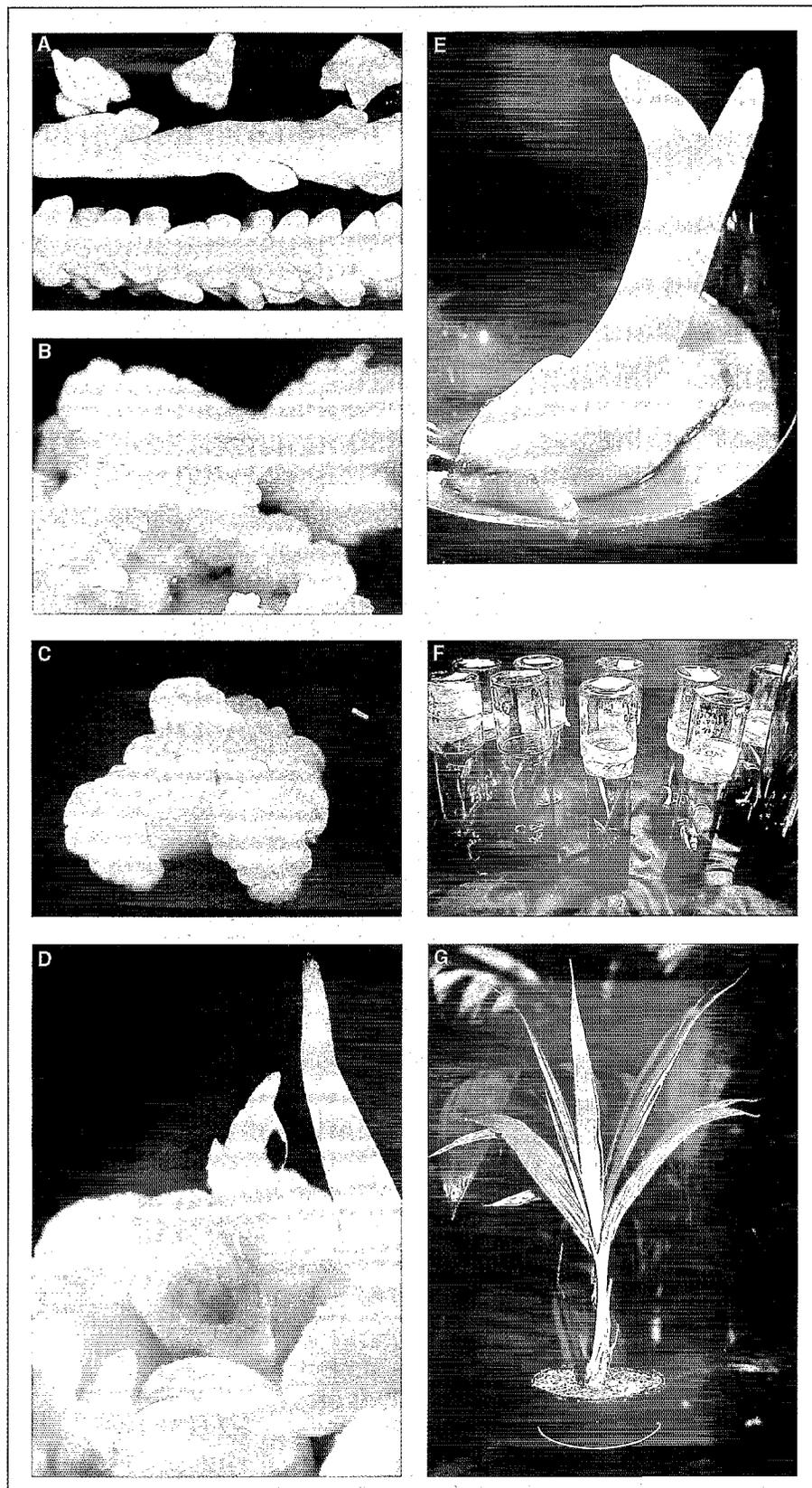


Photo 1. A : Préparation de l'explant : épi d'inflorescence immature de cocotier. **B :** Cal embryogène de cocotier. **C :** Structures embryonnaires de cocotier de type globulaire. **D :** Bouquet d'embryons somatiques de cocotier en cours de maturation. **E :** Embryon somatique de cocotier en germination. **F :** Plantules somatiques de cocotier. **G :** Plantule somatique de cocotier sevrée en serre.

Photo 1. A : Explant preparation: spike of coconut immature inflorescence. **B :** Coconut embryogenic callus. **C :** Coconut embryo structures, globular type. **D :** Clump of coconut somatic embryos during maturation phase. **E :** Coconut germinating somatic embryo. **F :** Coconut somatic plantlets. **G :** Coconut somatic plantlet after weaning in the greenhouse.

réaction (90 % de callogénèse en moyenne). Ce procédé permettrait de pouvoir travailler rapidement les phases tardives (fin de maturation et germination) qui sont les limites actuelles du protocole. Le CICY et le PCA ont aussi développé cette approche.

Analyses phytohormonales

Un des problèmes majeurs rencontré en culture *in vitro* du cocotier est le brunissement intense des tissus dû à la production de polyphénols. Ce problème a été résolu de façon identique par les différentes équipes : l'ajout au milieu de culture de charbon actif permet de piéger ces polyphénols. Cependant, ce composé est aussi capable d'adsorber certains composés du milieu de culture, dont les hormones exogènes (2,4-D, BAP), ce qui rend difficile la maîtrise de la composition des milieux. Entre 1990 et 1993, l'équipe ORSTOM/CIRAD-CP a développé une méthode de dosage des hormones de type auxines et cytokinines par HPLC dans les milieux de culture [16]. Les résultats ont révélé des taux d'adsorption importants et l'application de ces techniques sur des milieux provenant des différentes équipes a montré un comportement variable selon les lots et la provenance des charbons actifs utilisés. Un contrôle fréquent des milieux permet donc actuellement un réajustement des teneurs en hormones. Dans le cadre d'échanges, d'autres équipes (PCA et CICY) ont pu bénéficier de cette approche. En parallèle, les équipes du CICY et de Wye College ont développé une technique par radiomarquage (utilisation de 2,4-D radioactif) [17, 18] pour suivre l'incorporation de cette molécule dans les cultures et essayer d'en caractériser le métabolisme.

Histologie

La lenteur des phénomènes en culture *in vitro* du cocotier a conduit au développement d'une approche histologique décrivant

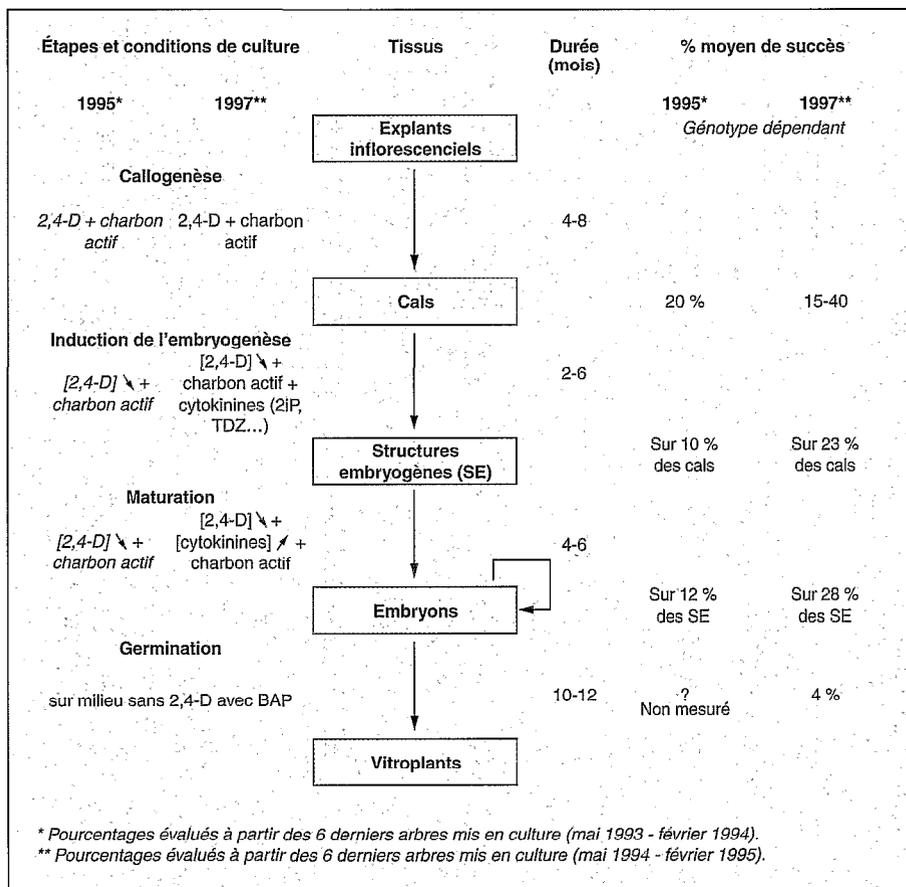


Figure. Schéma du protocole de régénération du cocotier mis au point par l'équipe mixte ORSTOM/CIRAD, à partir de tissus inflorescenciers.

Figure. Regeneration protocol developed from coconut inflorescences by the ORSTOM/CIRAD group.

chaque étape du protocole [19, 16]. Les études réalisées à Montpellier ont caractérisé les cellules embryogènes à l'origine des proembryons. Deux voies d'embryogenèse ont été mises en évidence [20].

Voie pluricellulaire (photo 2 A, B)

En présence de faibles teneurs en 2,4-D (40 à 60 mg.l⁻¹), on observe la formation de structures complexes méristématiques et épidermées. Cette voie peut conduire à l'obtention de structures embryonnaires souvent incomplètes ou déviées (haustorium seul présent avec ou sans pôle racinaire, embryons de type foliacé) si la concentration en auxine n'est pas suffisante.

Voie unicellulaire (photo 2 C, D)

Cette seconde voie est obtenue avec une forte concentration en 2,4-D (80 à 120 mg.l⁻¹). Elle conduit alors à l'apparition et à l'individualisation de cellules embry-

gènes se caractérisant par un cytoplasme dense, un rapport nucléo-cytoplasmique élevé, la présence d'un nucléole unique et volumineux et la présence de réserves amylicées et protéiques. Elles s'individualisent du reste du cal par un épaississement de la paroi pecto-cellulosique.

De par leur structure et leur ultrastructure, les cellules embryogènes présentent de nombreuses convergences avec les cellules engagées dans la voie de l'embryogenèse sexuée. C'est ainsi qu'un dépôt de callose lors de l'individualisation des cellules embryogènes a été mis en évidence (J.-L. Verdeil, comm. pers.). Nous disposons donc actuellement de repères précis pour la caractérisation de l'évolution des cultures. Nous avons appliqué cette technique à du matériel provenant des différents laboratoires (Hanovre, PCA et CICY) ; quels que soient le type d'explant de départ et le mode d'obtention des structures embryogènes, le même processus est observé.

Essais de régénération à partir d'une grande diversité de cultivars

Depuis plus de 20 ans, l'équipe ORSTOM/CIRAD-CP est associée avec la station Marc Delorme-IDEFOR, Côte d'Ivoire sur le programme d'amélioration du cocotier. Cette station possède la collection au champ la plus importante au monde. Elle réunit, depuis sa création en 1952, 37 écotypes représentés chacun par plus de 70 individus. Cette étroite collaboration nous a permis d'identifier rapidement les besoins des sélectionneurs en matière de micropropagation. Du fait des programmes de sélection mis en place très tôt dans cette station, nous avons ainsi pu tester en culture *in vitro* du matériel hautement sélectionné. Nous travaillons notamment sur trois génotypes : deux hybrides, le PB121 et le PB111 et un Nain Jaune Malais. Le maintien des relations avec la station Marc Delorme est essentiel à la poursuite de nos travaux pour tester les performances du protocole actuel à une échelle plus large. L'exemple du palmier à huile montre en effet que la production de vitroplants a progressé de façon sensible grâce à l'ouverture, en 1981, de l'unité pilote de La Mé, Côte d'Ivoire (mise en culture d'un arbre tous les 10 jours sur au moins 3 ans). Ce type d'infrastructure a permis, par des ajustements successifs du protocole mis au point en laboratoire, de faire progresser la production de vitroplants, ce qui manque aujourd'hui au cocotier. L'entrée dans le STD3 a permis de tester d'autres génotypes provenant d'Amérique Centrale et d'Asie du Sud-Est, et permet de valider le protocole. Un point important pour la vitroculture a été la rédaction par les sélectionneurs des trois pays producteurs d'une « Liste des Génotypes Utiles » identifiant précisément les génotypes les mieux adaptés à chaque pays. Ce document sert actuellement de base dans le choix des génotypes pour la réalisation des essais de régénération.

Recherche de marqueurs précoces de l'embryogenèse (marqueurs protéiques)

Les phénomènes de régénération sont très lents chez le cocotier ; la recherche de marqueurs précoces permettrait de détecter les premiers signes de l'orientation vers l'embryogenèse somatique et de faciliter le pilo-

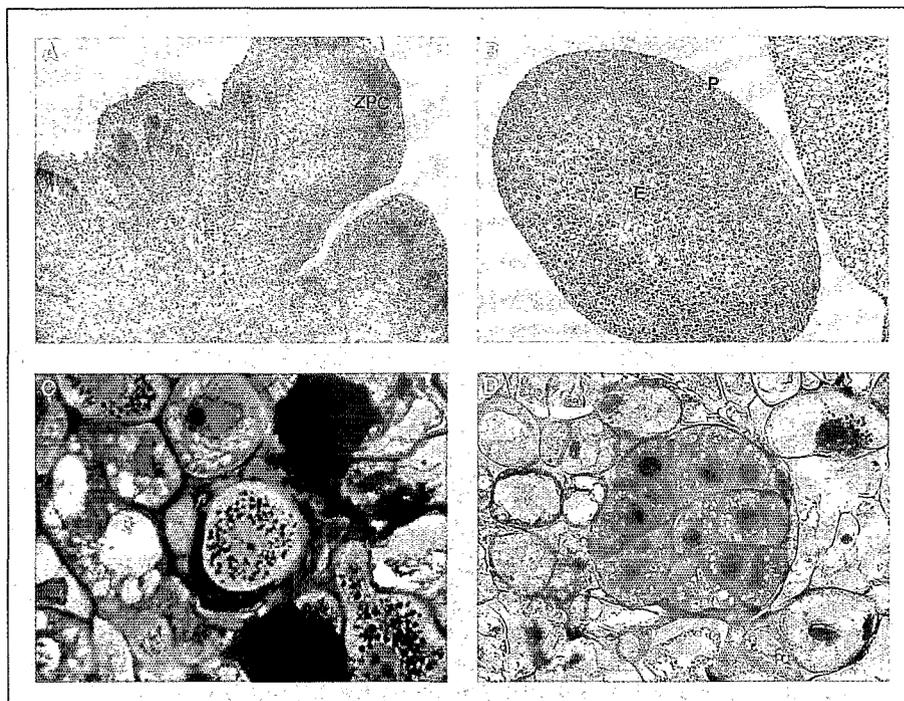


Photo 2. A : Cal embryogène de cocotier donnant naissance à des structures embryonnaires par fragmentation de la zone pseudo-cambiale (ZPC). **B :** Pro-embryon somatique de cocotier d'origine pluricellulaire. E. embryon ; P : protoderme. **C :** Cellule embryogène de cocotier, isolée par une paroi modifiée, qui sera à l'origine d'un embryon somatique. **D :** Pro-embryon somatique de cocotier d'origine unicellulaire.

Photo 2. A : Coconut embryogenic callus forming somatic structures by fragmentation of the pseudo cambial zone (ZPC). **B :** Coconut somatic proembryo from pluricellular origin. E : embryo ; P : protoderm. **C :** Coconut embryogenic cell, isolated by a specific cell wall, which will give a somatic embryo. **D :** Coconut somatic proembryo from unicellular origin.

tage des cultures. Une perspective intéressante est la recherche de marqueurs protéiques et moléculaires. Dans le cadre du projet STD3, cette approche est développée par l'équipe allemande qui possède la technologie nécessaire. Les travaux sont actuellement en cours avec notamment l'utilisation d'anticorps spécifiques de marqueurs du processus d'induction de l'embryogenèse et de la division cellulaire [21, 22]. Par ailleurs des résultats intéressants ont été obtenus par l'équipe du CICY sur la recherche de protéines phosphorylées au cours du développement embryonnaire. L'état de phosphorylation de certaines protéines pourrait varier au cours de l'embryogenèse et ainsi être utilisé comme marqueur des différents stades d'embryogenèse du cocotier.

Étude de la physiologie du vitroplant de cocotier

Au cours de la troisième réunion STD3 (mai 1997, Hanovre), les différents parte-

naires ont confirmé que des études de la physiologie du vitroplant issu de la germination des embryons somatiques étaient nécessaires en raison des problèmes posés par leur croissance lente *in vitro* et leur acclimatation difficile aux conditions naturelles. Ces problèmes constituent actuellement le principal facteur limitant pour le développement des protocoles d'embryogenèse somatique. Ces difficultés sont aussi rencontrées en culture *in vitro* des embryons zygotiques de cocotier chez lesquels un développement très lent a aussi été observé (par référence à des plantules issues de semis). Dans la majorité des espèces végétales, la réussite de l'acclimatation et, par conséquent, le développement ultérieur des vitroplants, sont liés à la capacité du plant à photosynthétiser *in vitro* [23]. L'équipe ORSTOM/CIRAD-CP s'est intéressée aux mécanismes de mise en place de la photosynthèse *in vitro* et d'accès à la photoautotrophie carbonée chez les vitroplants zygotiques de cocotier, qui constituent un modèle de choix pour des études physiologiques applicables directement aux protocoles d'em-

bryogenèse somatique. Cette étude a mis en jeu diverses approches complémentaires : dosages et quantification des carboxylases, mesures *in situ* des échanges gazeux et de la transpiration, fluorescence des chlorophylles. L'ensemble de ces résultats suggère la mise en place précoce d'un métabolisme photosynthétique actif dans les plantules obtenues à partir de cultures *in vitro* d'embryons zygotiques chez le cocotier [24, 25], mais ceci n'explique pas la lenteur du développement. L'observation des plantules issues de semis nous a permis de suggérer que le développement lent des plantules obtenues *in vitro* (zygotique et/ou somatique) pourrait être dû à une nutrition insuffisante et/ou mal adaptée. En effet, au cours de la germination de l'embryon zygotique de cocotier sur la noix, l'haustorium (partie distale du cotylédon) se développe extraordinairement : il envahit peu à peu toute la cavité de la noix et assure l'assimilation (grâce à la sécrétion de diverses enzymes) des réserves et leur transfert à la plantule. Le dosage des principaux nutriments organiques (sucres simples, acides aminés, acides gras) transmis à la plantule devrait permettre l'acquisition de données essentielles à la compréhension de la physiologie de la germination de la graine de cocotier, tout en améliorant les milieux de culture, avec à terme l'optimisation de la germination et du développement des plantules (zygotiques et somatiques), ce qui représente les limites actuelles du protocole. En parallèle, des expérimentations au champ seront menées aux Philippines pour déterminer le stade exact où la plantule zygotique peut vivre sans la noix.

Conclusion

Après analyse comparative des résultats de micropropagation de plus de 1 000 espèces, le cocotier était considéré comme faisant partie, avec le cotonnier et le soja, de l'une des trois plantes les plus difficiles à régénérer et à propager *in vitro* [26]. Ce constat est toujours valable même si aujourd'hui, grâce à ces trois années de collaboration, nous maîtrisons mieux la culture *in vitro* du cocotier. Cette association a, d'une part, permis de constater que les problèmes rencontrés en culture *in vitro* du cocotier présentaient de nombreuses similitudes dans tous les laboratoires. D'autre part, la mise en commun au travers d'échanges multiples (courrier, visites, réunions, stages...) des « données » accumulées par chacun sur la culture *in vitro* du cocotier a permis d'avancer de façon sensible dans la connaissance des phénomènes menant à l'obtention d'embryons soma-

Réseaux transnationaux

tiques chez cette espèce particulièrement récalcitrante. Nous avons levé certaines des difficultés : maîtrise des phases de callogenèse, d'induction de l'embryogenèse, obtention régulière d'embryons complets. Toutefois, d'autres obstacles demeurent, en particulier la phase de germination qui n'est pas encore maîtrisée. La réussite de ce projet cocotier fait clairement apparaître les bénéfices de telles associations et l'importance des organismes tels que l'Union européenne pour leur financement. Nous envisageons de poursuivre l'association avec nos partenaires en vue de maîtriser la micropropagation du cocotier, car seul le regroupement des efforts de recherche-développement nationaux, régionaux et internationaux assurera un meilleur avenir aux petits planteurs du XXI^e siècle [27] ■

Références

1. CIRAD. Département des Cultures Pérennes. *Rapport Annuel 1995* : 55-80.
2. Bourdeix R. *La sélection du cocotier (Cocos nucifera L.) : étude théorique et pratique, optimisation des stratégies d'amélioration génétique*. Thèse de l'Université Paris XI, Orsay, 1989 ; 194 p.
3. Blake J, Eeuwens CJ. Inflorescence tissue as source material for vegetative propagation of coconut palm. In : *Proc Int Conf Cocoa/Coconuts*, Kuala Lumpur, 1978 : 549-56.
4. Davis TA. Prospects of clonal propagation of the coconut. *Ceylan Coconut Planters Rev* 1969 ; 4 : 1-5.
5. Balaga HY. Induction of branching in coconut, *Kalikasan Philip. J Biol* 1975 ; 4 : 135-40.
6. Pannetier C, Buffard-Morel J. Premiers résultats concernant la production d'embryons somatiques à partir de tissus foliaires de cocotier, *Cocos nucifera*. *Oléagineux* 1982 ; 37 : 349-54.
7. Raju CR, Prakash Kumar P, Mini Chandramohan, Lyer RD. Coconut plantlets from leaf tissue cultures. *Plantation Crops* 1984 ; 12 : 75-81.
8. Branton RL, Blake J. Clonal propagation of coconut palm. In : *Proc Int Conf Cocoa/Coconuts*, 1984 : 1-9.
9. Buffard-Morel J, Verdeil JL, Pannetier C. Vegetative propagation of coconut palm through somatic embryogenesis, obtention of plantlet from leaf explant. In : *8th Int Symp Biotechnology*. Paris, 1988 ; 117 p.
10. Kovoov A. Palm tissue culture : state of the art and its application to the coconut. In : *FAO Plant Production and Protection*. FAO, Rome, 1981 ; Paper 30.
11. Rillo EP. A frame-work for co-ordination of application of tissue cultures techniques for a break through in vegetative propagation of coconut. *COCOTECH, XXVth Meeting, Bangkok, Thaïland, 1989*.
12. Blake J. Coconut (*Cocos nucifera* L.) micropropagation. In : Bajaj YPS, ed. *Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 10, legumes and oil seed crops*. Heidelberg : Springer Verlag, 1990 : 538-54.
13. Dublin P, Enjalric F, Lardet L, Carron MP, Trolinder N, Pannetier C. Estate crops. In : Debergh PC, Zimmerman RH, eds. *Micropropagation technology and application*. Dordrecht : Kluwer Academic Publisher, 1991 : 337-61.
14. Verdeil JL, Hoher V, Huet C, Grosdemange F, Sangaré A, Hamon S. Effect of thidiazuron and 2,4-D on the maturation of coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryos. In : *Plant Embryogenesis Workshop*. Hambourg, 12-14 sept 1996 ; abstract SVI-28.
15. Hornung R. Micropropagation of *Cocos nucifera* L. from plumular tissues excised from mature zygotic embryos. *Plantation, Recherche, Développement* 1995 ; 212 : 38-41.
16. Verdeil JL. *Étude de la régénération du cocotier (Cocos nucifera L.) par embryogenèse somatique à partir d'explants inflorescentiels*. Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI. Paris, 1993 ; 156 p.
17. Ebert A, Taylor HF. Assessment of the changes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. *Plant Cell Tissue Org Cult* 1990 ; 20 : 165-72.
18. Oropeza C, Taylor HF. Uptake of 2,4-D in coconut (*Cocos nucifera* L.) explants. In : Lumdsen PJ, Nicholas JR, Davies WJ, eds. *Physiology, growth and development of plant in culture*. The Netherlands : Kluwer Academic Publishers, 1994 : 284-8.
19. Buffard-Morel J, Verdeil JL, Pannetier C. Embryogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir de tissus foliaires : étude histologique. *Can J Bot* 1992 ; 70 : 735-41.
20. Verdeil JL, Huet C, Grosdemange F, Buffard-Morel J. Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.) : evidence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 1994 ; 13 : 218-21.
21. Altherr S, Stürm S, Jacobsen HJ. Immunochemical analysis of nuclear protein marker for regeneration potential in higher plants. *J Plant Physiol* 1993 ; 141 : 415-22.
22. Paulus C, Köllner B, Jacobsen HJ. Physiological and biochemical characterization of glyoxalase-I from soybean cell suspension, a general marker for cell proliferation. *Planta* 1993 ; 189 : 561-6.
23. Debergh PC. Acclimatization techniques of plants from *in vitro*. *Acta Hort* 1991 ; 289 : 291-300.
24. Triques K, Rival A, Beulé T, et al. Photosynthetic ability of *in vitro* grown coconut (*Cocos nucifera* L.) plantlets derived from zygotic embryos. *Plant Science* 1997 ; 127 : 39-51.
25. Triques K, Rival A, Beulé T, Dussert S, Hoher V, Verdeil JL, Hamon S. Developmental changes in carboxylase activities in *in vitro* cultured coconut zygotic embryos : comparison with corresponding activities in seedlings. *Plant Cell Tissue Org Cult* 1997 ; 49 : 227-31.
26. George EF, Sherrington PD, eds. In : *Plant propagation by tissue culture, handbook of directory and commercial laboratories*. Exetetics Eversley Ltd., Reading : Eastern Press 1984 ; 709 p.
27. Kullaya A, Sangaré A. La filière cocotier en Afrique : situation actuelle et perspectives. *OCL* 1996 ; 2 : 130-5.

Résumé

Collaboration internationale pour la maîtrise de la multiplication végétative *in vitro* du cocotier (*Cocos nucifera* L.)

V. HOCHER, ET AL.

La propagation végétative du cocotier (*Cocos nucifera* L.) par embryogenèse somatique reste une entreprise difficile, due à l'extrême récalcitrance de cette plante à la culture *in vitro*. Parmi les difficultés majeures on peut citer le brunissement intense des tissus maintenus *in vitro*, la lenteur des processus, la difficulté d'obtention d'embryons somatiques capables de germer et la faible vigueur des vitroplants. Pour tenter de comprendre et de lever ces difficultés, six équipes (l'ORSTOM/CIRAD-CP, France ; l'IDEFOR/DPO, Côte d'Ivoire ; le Wye College, Royaume-Uni ; l'Université de Hanovre, Allemagne ; PCA, Philippines et CICY, Mexique) ont initié en 1995 une collaboration sous l'égide de la Communauté Européenne. Au travers de diverses approches – la recherche de l'amélioration du procédé de culture *in vitro*, l'utilisation de différents cultivars, la recherche de marqueurs précoces de l'embryogenèse, l'étude de la physiologie du vitroplant – mais aussi grâce à de nombreux échanges d'informations et de compétences, ce projet vise à accroître les connaissances de la physiologie des tissus de cocotier *in vitro* et à améliorer le protocole de régénération de cette espèce. Le présent article fait état de la stratégie de recherche adoptée en collaboration avec divers partenaires et illustre les principaux résultats obtenus dans le cadre de la réalisation de ce projet.

Summary

International cooperation for the development of *in vitro* vegetative propagation in coconut (*Cocos nucifera* L.)

V. HOCHER, ET AL.

This paper discusses how an international collaboration was established to overcome difficulties encountered *in vitro* coconut regeneration. The main results obtained during the collabora-

tive work carried out by the different partners of this international EU-funded project are also presented. Why is coconut regeneration warranted? Coconut palm (*Cocos nucifera* L.) is a major crop in tropical areas. It is a major oil – crop on an industrial scale, and an important subsistence – and cash-crop for smallholders. However, the coconut sector is burdened with a number of problems that affect its productivity, particularly the widespread use of unimproved planting material, the old age of existing plantations and the prevalence of various pests and

diseases, for which no chemical treatment is currently available. Since coconut palm is generally crosspollinated and heterozygous, seed propagation gives rise to high variability in hybrid progeny. *In vitro* vegetative multiplication, through somatic embryogenesis, of high performance individuals thus offers the only short- and medium-term hope for the production of homogenous planting material and for substantial improvement in plantation productivity. Cloning should also allow rapid multiplication of selected individuals with resistance or

tolerance to serious diseases and harsh growing conditions. Unfortunately, coconut is a highly recalcitrant species with respect to tissue culture.

International cooperation potential. In 1993, several groups (ORSTOM/CIRAD-CP, France; IDEFOR/DPO, Côte d'Ivoire; Wye College, UK; Hanover University, Germany; PCA, Philippines; and CICY, Mexico) involved in coconut regeneration research joined forces for the first time to overcome major difficulties encountered in coconut regeneration. This collaboration was made possible by EU funding within the STD-3 programme "Coconut: development of methods for clonal propagation of elite, disease resistant palms by somatic embryogenesis" (ERBTS3*CT940298), which was initiated in January 1995. After accurately identifying the problems (intense tissue browning, heterogeneity of tissue responses, slow in vitro processes, low somatic embryo rates, weakness of somatic plantlets), the different project participants have set up a work programme for each team and many exchanges (information, protocols, material and people) have been planned.

Results obtained via the in vitro protocol. The micro-propagation process developed by the different teams includes four steps: callogenesis, embryogenesis induction, maturation and embryo germination. The ORSTOM/CIRAD protocol is presented in Photo 1 (A to G). In this project, there has been solid progress in controlling coconut regeneration in

the last 3 years. The partners have exchanged information and techniques, thus enabling them to improve their protocols (see Figure for the ORSTOM/CIRAD protocol). Clonal plantlets are now produced in most of the participating laboratories. The results of the different studies undertaken through this collaboration have considerably advanced the research.

Other strategies developed through the project. Different phytohormone analyses were developed by ORSTOM/CIRAD in media culture [16] and by Wye college and CICY in tissue culture [17, 18]. This has led to improved management of 2,4-D and activated charcoal concentrations used for coconut regeneration.

As coconut regeneration is a slow process, the use of histology is essential for controlling somatic cultures [19, 16]. The embryogenic steps were accurately defined by each team and it was found that the events were the same, irrespective of the system and/or the team involved. Two somatic embryo origins were noted: a pluricellular pathway (Photo 2A and B) and a unicellular pathway (Photo 2C and D), and we have now precise criteria for the characterization of cultures. The German team has also developed an approach for investigating early protein markers using antibodies specific to embryogenesis induction and cell division [21, 22]. Another important aspect of this project has involved application of the protocol to different cultivars. This was facilitated by IDEFOR's

participation in the project and by between-partner exchanges of different types of material.

Work is now focused on embryo germination and growing micropropagated plantlets in the greenhouse, which is still a bottleneck. The results of a study of photosynthesis during in vitro development of zygotic embryos [24, 25] suggest that a nutritional deficiency could be responsible for the slow development of somatic plantlets. A study on nutrition during coconut germination is under way at ORSTOM/CIRAD, CICY and PCA, and the role of haustorium (cotyledon) is currently being investigated.

Conclusion. We agree with Georges and Sherrington [26] that coconut is one of the most difficult species for in vitro regeneration, even though considerable progress has been made through international collaboration between many research teams in the STD3 project. Some difficulties have been overcome (callogenesis, induction of embryogenesis, development of complete embryos), but we are still cautious as coconut germination and regeneration remains a difficult challenge. Nevertheless, the promising results of this project clearly indicate that is essential to continue this type of interchange, which would not be possible without EU funding. Continued research on coconut regeneration is crucial, and the future for coconut smallholders will hopefully be enhanced through such international cooperation initiatives.

Cahiers Agricultures 1998 ; 7 : 499-505.

Le réseau *Atriplex*

Allier biotechnologies et écologie pour une sécurité alimentaire accrue en régions arides et semi-arides

Jean-Marie Kinet, Fatima Benrebaha, Sadok Bouzid, Sergio Lailhacar, Pierre Dutuit

J.-M. Kinet : Laboratoire de cytogénétique, Université catholique de Louvain, Croix-du-Sud 5, boîte 13, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique.

F. Benrebaha : Laboratoire d'amélioration végétale, Institut d'agronomie, Université de Blida, BP 270, 9000 Blida, Algérie.

S. Bouzid : Laboratoire de biologie végétale, Faculté des Sciences, Université de Tunis, Campus universitaire, 1060 Tunis, Tunisie.

S. Lailhacar : Departamento de producción animal, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad de Chile, Casilla 1004, Santiago, Chili.

P. Dutuit : Equipe d'écotechnologie, Faculté de Pharmacie, Université de Paris-Sud-XI, Tour E1 2^e, 92296 Châtenay-Malabry, France.

Tirés à part : J.-M. Kinet

La salinisation des sols, fréquemment associée à la contrainte hydrique dans les zones arides et semi-arides du Maghreb, y constitue l'un des principaux problèmes pour le développement des plantes. Elle entraîne une réduction des surfaces cultivables et, combinée à d'autres facteurs, elle représente une menace pour l'équilibre alimentaire de ces régions. L'introduction d'arbustes fourragers résistants à l'aridité est l'un des moyens utilisés pour la valorisation des sols dégradés. En raison de leur intérêt écologique et pastoral, les espèces du genre *Atriplex* ont particulièrement retenu l'attention des organismes étatiques et des ONG, dont la stratégie se

fonde essentiellement sur une espèce introduite, *Atriplex nummularia*. Nous mettons ici en lumière l'intérêt de l'espèce *Atriplex halimus*, en tant que ressource génétique indispensable pour l'ensemble des pays d'Afrique du Nord, face aux risques écosystémiques majeurs. Un projet de recherche sur cette espèce a été accepté par l'Union européenne en 1994. Son objectif était de contribuer aux efforts d'amélioration de la production des steppes fourragères à base d'*A. halimus* dans le but d'accroître la production animale des régions arides méditerranéennes. Ce projet visait également à protéger ces écosystèmes particulièrement fragiles. Des laboratoires de Tunisie,