

Méthode simple d'échange de germoplasme de cocotier (*Cocos nucifera* L.) par l'utilisation d'embryons zygotiques.

Koffi YOBOUE^{1*2}, Oulo ALLA-N'NAN^{3*}, Jean Louis Konan KONAN², Raoul Sylvère SIE¹, Modeste KOUASSI⁴, Saraka Didier Martial YAO¹, Blanchard-Eric Zadjéhi KOFFI¹

(1) UFR Sciences de la Nature, Université Nangui Abrogoua, 02 BP 801 Abidjan 02 Côte d'Ivoire, Tél (225) 203042 00

(2) Centre National de Recherche Agronomique (CNRA), Programme cocotier, Station de Recherche Marc Delorme, Port Bouët, 07 BP 13 Abidjan 07. Côte d'Ivoire, Tél/ Fax : 21 24 88 72, E-mail : konankonanjuanlouis@yahoo.fr

(3) UFR Biosciences, Laboratoire de Génétique, Université Félix Houphouët Boigny, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire, Tel / Fax : 22 44 03 07 / 22 44 37 24

(4) Centre Nationale de Recherche Agronomique (CNRA), Laboratoire Centrale de Biotechnologie (LCB), Km 17 route de Dabou, 01 BP 1740 Abidjan 01, Côte d'Ivoire

Auteur correspondant : Oulo ALLA-N'NAN, 22 BP 582 Abidjan 22 Côte d'Ivoire, E-mail : nanoulo@yahoo.fr , Tel : (225) 07 16 43 27, Fax : 22 44 03 07

Original submitted in on 9th May 2014. Published online at www.m.elewa.org on 31st August 2014. <http://dx.doi.org/10.4314/jab.v80i1.4>

RESUME.

Objectif : Chez le cocotier, les transferts de matériels effectués sous forme de cylindres d'albumen contenant l'embryon, compte du poids et du volume de la graine, se heurtent à plusieurs difficultés notamment les problèmes phytosanitaires et les nombreuses contaminations. Ce présent travail vise à déterminer les meilleures conditions de transfert permettant une meilleur régénération des embryons dans les laboratoires d'accueil.

Méthodologie et résultats : Pour cela les embryons issus de noix matures (10 à 12 mois) ont été conditionnés sur deux milieux. Un milieu de régénération contenant du sucre (culture direct) et un milieu de maintien en vie ralentie sans sucre (conservation préalable avant la mise en culture). Le taux de germination des embryons extraits de noix matures sur les deux milieux ont été évalués. Les résultats ont montré que les taux de germination des embryons sont similaires après leur transfert sur le milieu de germination pour les deux milieux utilisés. Il varie entre 74 % et 84 % comparativement aux noix entières utilisées comme témoin qui ont un taux de 58 %.

Conclusion et application des résultats : Cette étude a montré qu'il est possible d'utiliser directement les embryons zygotiques pour les échanges de matériel chez le cocotier en les maintenant en vie ralentie sur un milieu de culture sans sucre. Le maintien des embryons en vie ralentie et leur transfert sur le milieu dépourvu de sucre n'affecte pas leur régénération ultérieure. Ce mode de transfert permettrait de réduire le taux de contamination élevé lors du transfert de matériel sous forme de cylindres d'albumen. La priorité des pays producteurs de cocotier étant la création de nouvelles collections et l'enrichissement des collections existantes, la disponibilité d'une méthode fiable de transfert de matériel constitue un avancé majeur.

L'utilisation du milieu de régénération peut conduire à un épuisement des constituants minéraux et entraîner le mort d'embryons ou des malformations au cours de la croissance.

Mots clés: Cocotier, cylindres d'endosperme, embryon, culture *in vitro*, échange de matériel

Simple method for germplasm exchange in coconut (*Cocos nucifera* L.) by using zygotic embryo.

SUMMARY:

Objective: The exchange of material made in the form of endosperms cylinders containing the embryo, encounters a number of difficulties including phytosanitary problems and many contaminations. The present work aims to determine the best conditions of material transfer for a better regeneration of embryos in host laboratories.

Methodology et results: Embryos, extracted from mature nuts (10-12 months), were conditioned on two media. Regeneration medium containing sugar (live culture) and slowly growth medium without sugar (prior conservation prior to culture). The germination rates of embryos extracted from mature nuts on both media were evaluated. The results showed germination rates are similar after embryo transfer on the regeneration medium for both media used. It varies between 74% and 84% compared with whole nuts used as control with a rate of 58%.

Conclusion and application of results: This study showed that it is possible to use the embryos directly for the exchange of material by using a slowly regrowth media during the transfer medium without sugar. The maintenance of embryos in slowly alive and their transfer to the medium without sugar does not affect their regeneration after their transfer on regeneration medium. This type of transfer would reduce the high levels of contamination during the transfer of materials in the form of endosperm cylinders. The priority of coconut producing countries is the creating of new collections and the enrichment of existing collections so the availability of a reliable method of transferring coconut material represents a major progress. The use of the regeneration medium for the transfer can lead to a depletion of mineral and cause embryo death and malformations during their growth.

Key words: coconut, endosperms cylinders, embryo, *in vitro* culture, transfer of material

INTRODUCTION

La stratégie globale de conservation des ressources génétiques du cocotier développé par le COGENT (réseau international des ressources génétiques du cocotier), est principalement basée sur la conservation *ex situ* des accessions de cocotier (Batugal et Jayashree, 2005). Cinq collections régionales ont ainsi été créées dont la plus diversifiée est localisée en Côte d'Ivoire. (Batugal et Jayashree, 2005). Par ailleurs, la création de nouvelles collections ainsi que l'enrichissement des collections existantes pour atteindre au moins 200 accessions constitue une des priorités du COGENT. Il s'agit de disposer d'une part, d'un pool génétique pour les besoins de recherche et d'autre part de préserver la diversité existante contre les maladies et les aléas climatiques (Batugal, 2004, Dulloo *et al.*, 2005). Les échanges internationaux de matériel végétal sont rendus difficiles ou limités par l'absence de

propagation végétative ainsi que par les caractéristiques de la noix de cocotier. En effet, la noix, organe généralement utilisé pour les échanges et pour la constitution des collections est l'une des plus volumineuses et lourdes du règne végétal (Orozco-Segovia *et al.*, 2003). Mille noix occupent environ 4 m³ (Le Saint *et al.*, 1989). Son important volume limite le nombre de génotypes à collecter et augmente par conséquent les coûts des transferts. A cela s'ajoutent les problèmes phytosanitaires (Frison *et al.*, 1993). La seule option reste le transfert de matériel par l'utilisation de matériel de petite taille et indemne de maladie. Des protocoles de collecte et de transfert de matériel de cocotier sous forme d'embryons ou de cylindres d'endosperme pour une régénération *in vitro* ont été réalisés dans plusieurs laboratoires (Assy-Bah *et al.*, 1989, Danso *et al.*, 2009 ; Rillo et Paloma, 1991; CA Cueto *et al.*, 2012). Il s'agit de

l'inoculation directe des embryons au champ, de l'extraction et l'immersion des cylindres d'endosperme dans une solution de KCl et de leur transfert dans des sachets en plastique avant l'isolement de l'embryon. Malheureusement, ces modes de transfert rencontrent souvent certaines difficultés. La contamination d'un seul cylindre d'endosperme pendant le transfert peut occasionner la perte d'une grande quantité de matériel, les cylindres étant conditionnés en nombre de 25 ou plus. Une désinfection mal maîtrisée des cylindres d'albumen dans le laboratoire d'accueil peut entraîner la contamination d'un grand nombre de matériel ou de la totalité du matériel. La solution envisagée

pour les échanges internationaux de cocotier reste le conditionnement des embryons excisés des zones de collecte sur un milieu gélosé permettant leur régénération dans le laboratoire d'accueil. La réussite d'un tel protocole dépend de plusieurs paramètres à savoir la technique de collecte, de désinfection, la conservation du matériel pendant les échanges ou avant la mise en culture. Le présent travail vise à déterminer les meilleures conditions du transfert de matériel sous la forme d'embryons zygotiques et à évaluer les paramètres susceptibles de permettre une meilleure régénération de ceux-ci dans les laboratoires d'accueil.

MATERIEL ET METHODES

Matériel végétal : Le matériel végétal est constitué d'embryons issus de semences immatures (8 mois) et matures de cocotier de (10, 11 et 12 mois) de trois (3) accessions grands et de huit (8) accessions nains de la Station Marc Delorme du Centre Nationale de Recherche Agronomique (CNRA) de la Côte d'Ivoire. Il s'agit du Grand Ouest Africain (GOA), Grand Bay-Bay (GBB), le Grand Rennell (GRL), Nain Vert Brésil (NVB), le Nain Jaune Malais (NJM), Nain Vert Guinée Equatoriale (NVE), Nain Niu Leka (NNL), Nain Vert Sri Lanka (NVS), Nain Rouge Malais (NRM), Nain Vert Catigan (NVC) et Nain Rouge Cameroun (NRC). Cinquante (50) noix ont été utilisées pour les taux d'extraction quand ce sont 40 embryons qui sont traités pour la germination.

METHODES

Après la récolte, les méthodes d'extraction et de désinfection des cylindres d'endosperme sont celles décrites par N'Nan *et al.* (2012).

Isolement, conditionnement des embryons : Après la désinfection des cylindres d'endosperme, l'isolement et la désinfection des embryons sont effectués dans des conditions aseptiques sous hotte à flux laminaire (ASSY-Bah *et al.*, 1989). Les embryons sont transférés sur le milieu sans sucre contenu dans des cryotubes pendant une semaine en raison d'une unité par cryotube avant leur transfert sur le milieu de régénération (Figure 1). Les embryons sont mis directement en culture sur le milieu de régénération contenu dans les tubes à essai en raison d'un embryon par tube.

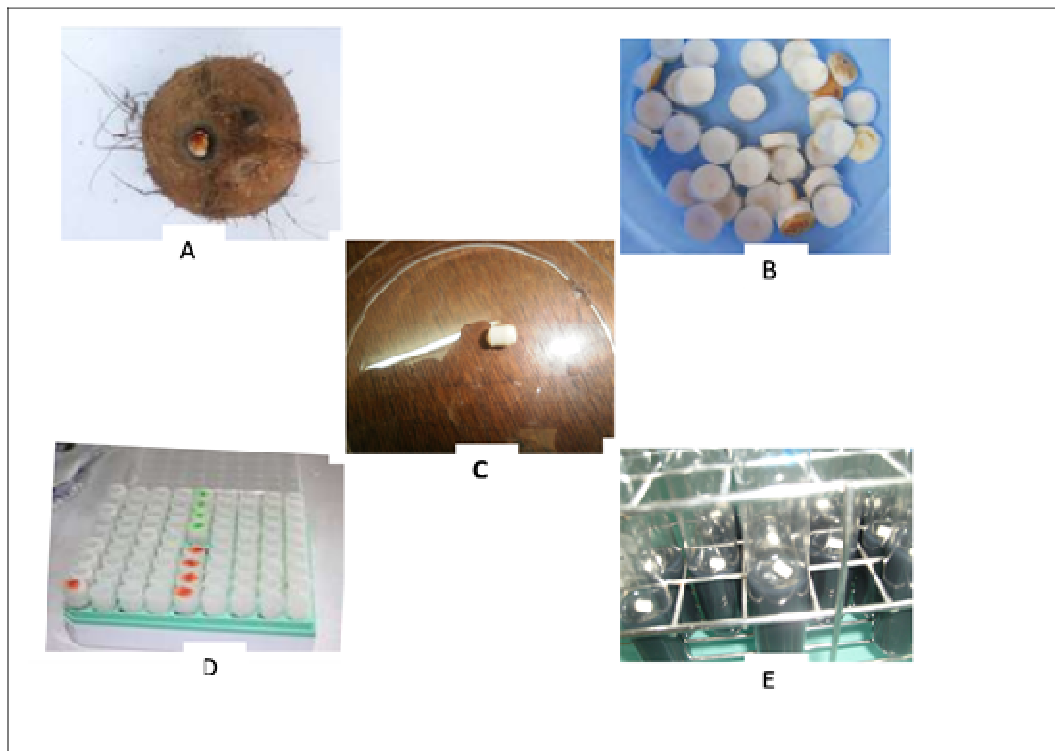


Figure 1 : Différentes étapes de conditionnement de l'embryon zygotique de cocotier

A : noix débourrée ; B : cylindres d'endospermes, C : embryon, D : cryobague contenant des embryons, E : Embryons repiqués sur le milieu de régénération

Milieu de conservation des embryons ou milieu de transfert.

Le milieu de conservation des embryons pour les maintenir en vie ralentie est constitué des macros et micro-éléments de Eeuwens (1978), des vitamines de Morel et Wetmore (1951), de 41 mg/l du complexe Fe-EDTA, de 100 mg/l de myo-inositol, 100 mg/l d'acide ascorbique, de 8 g/l d'agar. Le pH du milieu a été ajusté à 5,5 avant autoclavage. Le milieu est stérilisé par autoclavage pendant 20 min à 110°C avant d'être distribué à raison de 1 ml par cryotube (2 ml) sous une haute à flux laminaire. Les embryons sont maintenus sur ce milieu pendant une semaine avant leur transfert sur le milieu de régénération.

Milieu de germination des embryons : Il est celui mis au point par Assy Bah *et al.* (1989). Il est constitué des macros et micro éléments de Murashige et Skoog (1962), des vitamines de Morel et Wetmore (1951), de 41 mg/l du complexe Fe-EDTA, 100 mg/l de myo-inositol, 100 mg/l de d'acide ascorbique, 8 g/l d'agar et 2g/l de charbon actif. Le pH du milieu a été ajusté à 5,5 avant autoclavage. Il a été reparti à raison de 20 ml par tube à essai de 24 x 150 mm. Ils sont stérilisés par autoclavage pendant 20 min à 110°C.

Conditions de culture au laboratoire et à la pépinière

Les embryons en culture sont maintenus à 27°C à l'obscurité jusqu'à la sortie de la gemmule. Les subcultures sont faites tous les mois. Les embryons germés sont transférés à la lumière à partir de 3 mois de culture avec une photopériode de 16/24. Les noix matures, présentant un épiderme brun et/ou l'eau libre clapote sont récoltées. Elles sont ensuite stockées pendant 21 jours à l'air libre pour homogénéiser leur maturation avant leur mise en germoir. Les noix sèches sont entaillées à la machette légèrement sur le côté plus bombé sur lequel se trouve la pièce florale. Les noix disposées en quinconce sont enfouies en terre et recouvertes au 2/3. La partie entaillée est orientée vers le haut (Wuidart, 1981). Les semences sont arrosées quotidiennement. Quarante (40) noix par accession ont été mises en germoir avec trois répétitions, soit un total de 1320 noix traitées.

Paramètres évalués : Les évaluations ont concernés les taux d'extraction des cylindres d'endosperme et des embryons à partir des noix. Le taux de germination des embryons au laboratoire et des noix à la pépinière a été également évalué. Les temps mis pour l'émission de racines et de feuilles chlorophylliennes ont été

évalués sur les embryons mis en culture *in vitro*. Les périodes pour atteindre 25%, 50%, 75 % et 100 % de germination a été déterminée au niveau des embryons et des noix entières. Pour les taux d'extraction, les noix ont été classées en fonction de l'âge à la récolte (8, 10, 11 et 12 mois).

Analyse des données : Les logiciels SPSS version 16.0 et STATISTICA version 7.1 ont été utilisés pour

réaliser les analyses statistiques. L'analyse de variance incluant la comparaison des moyennes selon le test de Newman et Keuls au seuil 5 % et un test T ont été utilisés pour comparer les modes de conditionnement. Avant les analyses, la normalité des distributions des variables mesurées ainsi que l'égalité des variances a été vérifiée.

RESULTATS.

Les résultats sont présentés en prenant non pas individuellement les cultivars, mais l'ensemble.

Taux d'extraction des cylindres d'endosperme et des embryons : Le taux d'extraction des cylindres d'endosperme croît en fonction de l'augmentation de l'âge des noix. Il est plus faible pour les noix âgées de 8 mois (77,92 %) et plus élevé pour les noix de 11 à 12 mois (95,08 %). Les noix âgées de 10 mois constituent

le groupe intermédiaire avec un taux d'extraction de 87,70 %. Quant aux taux d'extraction des embryons à partir des endospermes, il est statistiquement identique pour les noix de 10 et de 11 à 12 mois (95 %) Le taux d'extraction des embryons à partir des cylindres d'endosperme des noix de moins de 10 mois est de 92,92 % (Tableau 1).

Tableau 1 : Taux d'extraction des cylindres d'endosperme et des embryons zygotiques selon le stade de maturité des noix des cocotiers étudiés

Stade de maturité de la noix (mois)	Taux d'extraction des cylindres d'endosperme (%)	Taux d'extraction des embryons (%)	Taux de conversion des noix en embryon (%)
8	77,92 ± 18,99 a	92,92 ± 11,12 b	72,62 ± 20,70 a
10	87,70 ± 15,04 b	95,34 ± 8,71 b	83,72 ± 16,78 b
11 à 12	95,09 ± 10,60 c	96,75 ± 7,09 b	92,15 ± 13,13 c
P	< 0,001	0,06	<0,001

Les moyennes suivies de la même lettre dans une colonne sont statistiquement identiques au seuil de 5 %.

Effet du mode de conditionnement sur la germination, la formation de feuilles et de racines : Le pourcentage de germination est de 58,75 % et 84,50 % respectivement pour les noix issues de semis direct en pépinière et les embryons excisés quel que soit le mode de conditionnement (Figure 2). Les embryons

zygotiques ont un taux de germination statistiquement plus élevé que les noix mises en germe. Par ailleurs, les embryons conditionnés sur un milieu de transfert ont un taux de germination (74,56 %) statistiquement identique (P= 0,080) à celui de ceux qui ne l'ont pas été (84,50 %).

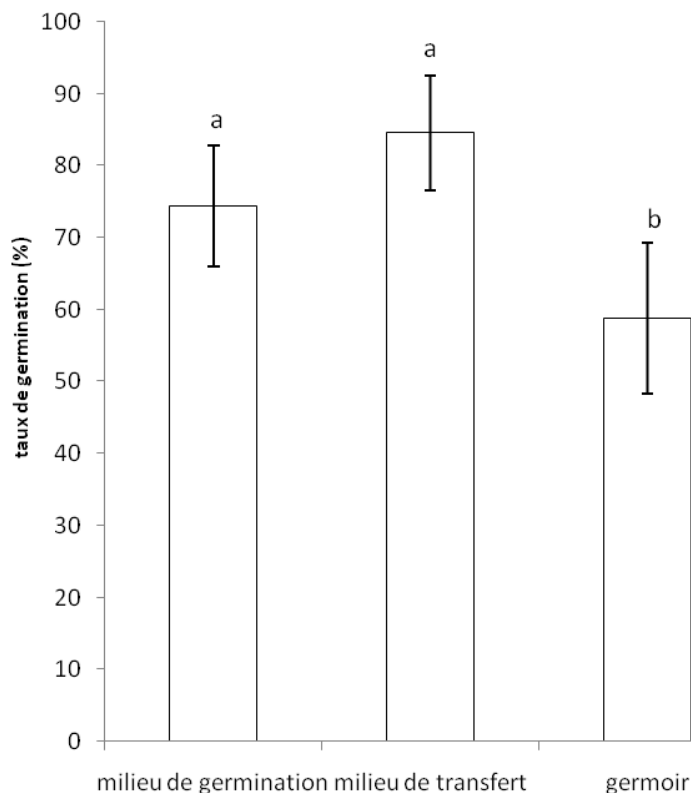


Figure 2 : Effet du mode de conditionnement sur le taux de germination des noix et des embryons zygotiques de cocotier

Quel que soit le mode de conditionnement utilisé (la mise en culture directe ou maintien en vie ralentie (milieu gélosé) avant transfert sur milieu de régénération), les taux d'émission des racines et des feuilles sont statistiquement identiques. En effet, pour toutes les accessions considérées, ces taux moyens sont respectivement de 91,36 % et 45,59 %. (Figure 3). Pour les embryons issus de culture directe sur le milieu de régénération, les taux de formation de racines et de feuilles sont respectivement de 76,67 % et 61,67 %

quelque soit le milieu utilisé. Chez les embryons conservés sur le milieu gélosé sans sucre, la radicule et la gemmule apparaissent le même jour dans 58,64 % des cas. Ces taux sont de 16,88 % pour les embryons mis directement à germer sur le milieu de culture. En considérant le mode de conditionnement, les taux de production de racines et de feuilles sont statistiquement identiques pour les embryons conservés sur le milieu de transfert et ceux cultivés directement sur le milieu de régénération.

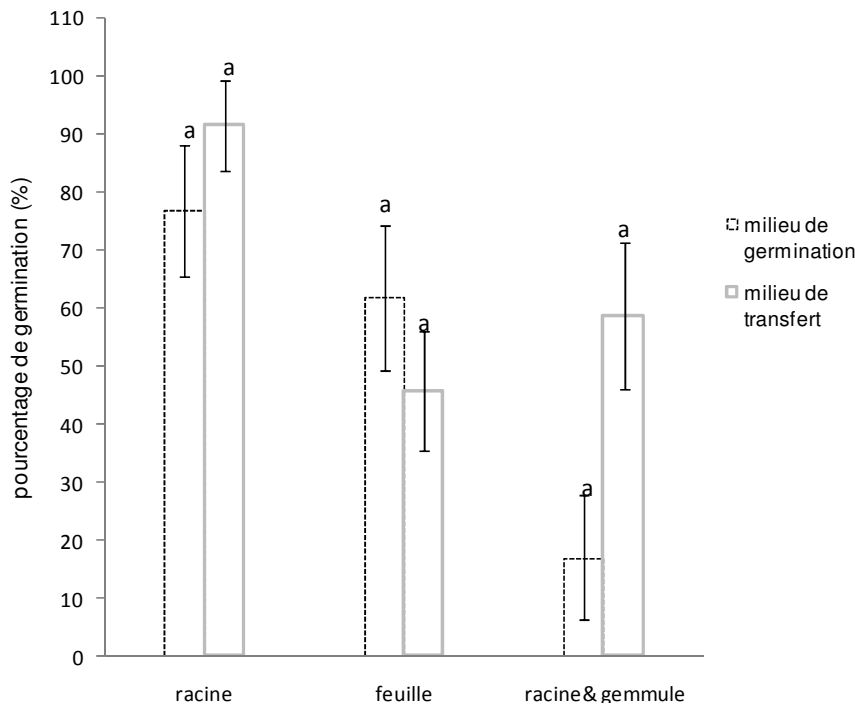


Figure 3 : Effet du mode de conditionnement sur la formation des organes des embryons zygotiques de cocotier

Effet du conditionnement sur les durées d'initiation de la germination :

Le temps qui sépare la mise en culture et la germination dépend du type de milieu utilisé (Tableau 2). Les embryons excisés et mis directement en culture sur le milieu de régénération mettent en moyenne 40,35 jours avant de germer. Ceux conservés sur le milieu de transfert, germent après 46,30 jours quand ils sont transférés sur le milieu de culture. Chez les noix issues de semis direct en germe, les germes apparaissent en moyenne 73,71 jours après la mise en germe. Les noix mises en germe germent statistiquement plus lentement que les

embryons. Le temps qu'il faut pour obtenir 25 % de germination est de 3 semaines pour les embryons mis directement en culture sur le milieu de régénération et de 6 à 7 semaines pour ceux conservés sur le milieu gélosé et les noix entières en germe. Pour atteindre 50 % de germination les embryons excisés et les noix entières mettent respectivement 6 et 13 semaines après la mise en culture ou la mise en germe. Six semaines après la mise en culture, 70 % des embryons mis directement sur le milieu de culture et sur le milieu de transfert germent (Figure 4).

Tableau 2 : Temps de germination des embryons zygotiques et des noix de cocotier

mode de conditionnement	temps de germination (jours)		
	minimum	moyenne	maximum
-milieu de germination	17	40,35 ± 24,12 a	140
milieu de transfert	29	46,30 ± 15,74 b	114
germe	5	73,71 ± 49,76 c	202
P		< 0,001	

Les moyennes suivies de la même lettre dans une même colonne sont statistiquement identiques

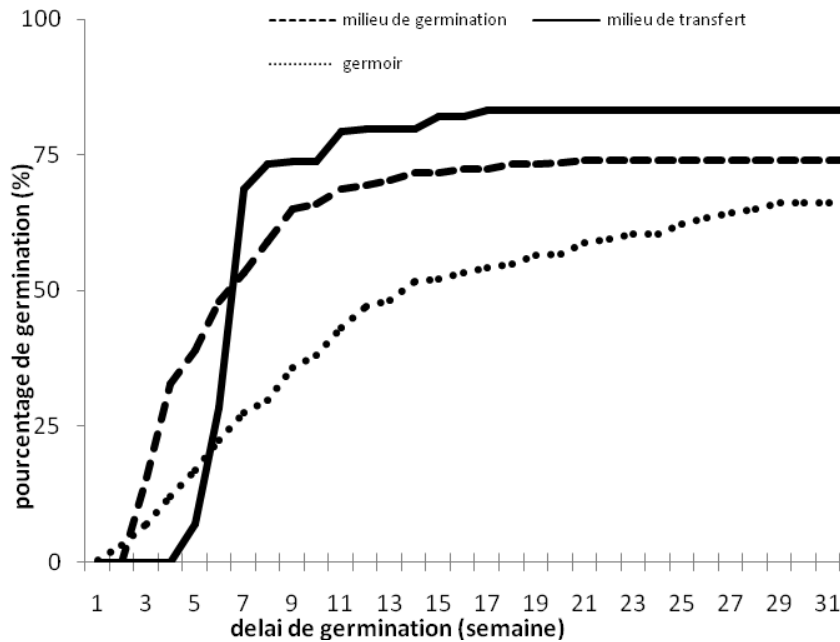


Figure 4 : Évolution du taux de germination des embryons zygotiques et des noix de cocotier en fonction du temps

Le mode de conditionnement n'a aucune influence sur la durée de l'initiation de la racine et de la feuille. Le temps mis pour l'initiation de la racine est de 43,91 jours en moyenne pour les embryons conservés en vie ralentie avant la mise en culture et de 53,56 jours pour les embryons mis directement en culture. Les feuilles chlorophylliennes apparaissent à partir des 163 et

130,75 jours respectivement pour chacun des modes de conditionnement après la mise en culture des embryons sur le milieu de régénération. Le temps qui sépare l'initiation de la racine et celle de la feuille est de 115 jours (Tableau 3).

Tableau 3 : Temps d'émergence des racines et feuilles après l'inoculation et la germination des embryons zygotiques de cocotier

Période (jours)	Milieu de germination	milieu de transfert	P
Semis germination	40,35 ± 24,11a	46,30 ± 15,74b	<0,001
Semis apparition de racine	53,36 ± 31,59a	43,76 ± 18,75b	<0,001
Semis-première feuille	164,66 ± 15,52a	163,01 ± 21,64a	0,749
Germination- feuille	130,75 ± 22,26a	130,75 ± 20,53a	0,950
Germination- racine	18,82 ± 23,85 a	7,56 ± 25,15b	<0,000
Racine - feuille	115,09 ± 26,49a	118,35 ± 27,05a	0,419

Les moyennes suivies de la même lettre sur une ligne sont statistiquement identiques au seuil de 5% test-T.

Trois à quatre semaines après la mise en culture, 25 % des embryons germés émettent au moins une racine et 50 % à la 6^{ème} semaine. L'initiation d'une racine a été réalisée à 75 % dès la 6^{ème} semaine pour les embryons conservés sur le milieu de transfert et la 10^{ème} semaine pour ceux cultivés directement sur le milieu de

germination (figure 5). La racine et la gemmule ont été induites le même jour pour 67,65 % des embryons conservés sur le milieu gélosé et 18,69 % de ceux repiqués directement sur le milieu de germination. Par ailleurs chez 6,69 % des embryons germés, la racine émerge avant la gemmule.

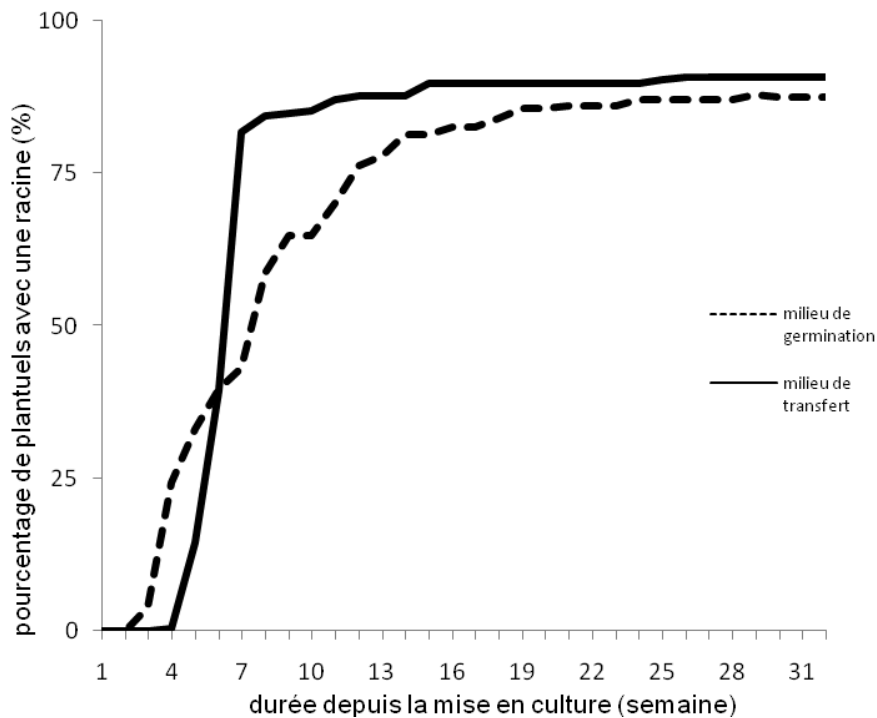


Figure 5 : Évolution du taux d'émission des racines des embryons germés de cocotier en fonction du temps

DISCUSSION

Plusieurs facteurs conditionnent la réussite de l'extraction des cylindres d'endosperme et des embryons parmi lesquels l'âge et la forme de la noix. Plus la noix est âgée (plus de 10 mois), plus son extraction est aisée et le taux d'extraction plus élevé. Cependant chez certaines noix de plus de 12 mois, l'embryon est solidement accolé à la coque, ce qui rend difficile son extraction. Chez les noix matures, l'endosperme est totalement constitué et solide. Il maintient solidement l'embryon qui ne peut être perdu pendant l'extraction. Par contre, les noix âgées de moins de 10 mois possèdent un endosperme très tendre qui maintient mal l'embryon et entraîne souvent sa perte lors de l'extraction. Les embryons sont très petits et se détachent du cylindre d'endosperme. Les embryons isolés des noix germent plus vite avec un pourcentage plus élevé que les noix entières mises au germe. Cette différence pourrait s'expliquer d'abord par le tri qui s'opère de la noix jusqu'à l'obtention de l'embryon. En effet, l'excision permet de sélectionner les embryons les plus performants par la taille, l'absence de blessure et donc d'augmenter la capacité à germer. Selon Assy-Bah et al. (1987 ; 1989), les

embryons les plus gros germent plus facilement que les plus petits. Le contact de l'embryon avec le milieu nutritif faciliterait l'absorption rapide des différents éléments nutritifs (Rabechault et al., 1974). L'embryon étant hétérotrophe, le milieu lui fournit les éléments nécessaires à son métabolisme et à la différenciation des organes. Par contre, le choix des noix physiologiquement bonne ne permet pas d'avoir toutes les informations sur leur capacité à germer. Une noix apparemment bonne pourrait ne pas avoir été fécondée. Par ailleurs, la destruction des barrières physiques que constituent la coque et la bourre favorise une germination rapide des embryons par rapport aux noix entières. A cela s'ajoutent les conditions environnementales. Selon Zizumbo-villareal et Arellano-Marin (1998), le taux de germination et la capacité à germer des semences sont influencés par des facteurs environnementaux et des facteurs génétiques. Les traitements variables en germe tels que l'arrosage, la variation de la température ambiante et de l'humidité relative pourraient expliquer certaines variations obtenues dans la germination des noix. Les conditions de laboratoire diffèrent par une atmosphère

contrôlée avec un contrôle de la température et l'humidité des salles de culture. Les travaux de Koffi *et al.* (2013) ayant montré qu'après le sevrage, les plants issus de culture d'embryons avaient les mêmes caractéristiques que les plants issus de noix. L'absence de sucre dans le milieu de conservation qui a pour objectif de permettre le ralentissement de la croissance des embryons pendant le transfert n'affecte pas la viabilité de l'embryon. Les taux de germination, d'ébauche de racine et de feuille des embryons préalablement maintenus en vie ralentie sur le milieu de conservation sont élevés après leur transfert sur le milieu de germination contenant 60 g/l de saccharose. Ces résultats concordent avec ceux de Karun *et al.* (2002), qui, en étudiant l'effet de différents milieux sur le taux d'enracinement ont obtenu des variations comprises entre 60 et 81 %. Les résultats sont supérieurs à ceux de Garcia *et al.* (2008), qui ont obtenu des taux d'enracinement de 50 % sur le milieu pour des études similaires. Chez la plupart des embryons germés, les racines et la gemmule sont ébauchés la même semaine. Ce milieu permet de ralentir la croissance sans affecter le pouvoir germinatif des embryons. Les sucres participent au développement normal de l'embryon excisé comme source de carbones. Ils fournissent de l'énergie aux cellules et jouent un important rôle dans la régulation osmotique des cellules durant la germination (Bolarin *et al.*, 1995 ; Soni *et al.*, 2010 ; Saldanha et Martins-Corder, 2012). L'absence de sucres dans le milieu de transfert réduit le potentiel osmotique de ce dernier. Les embryons conservés sur ce milieu ne recevraient pas l'énergie et les matériaux élémentaires nécessaires à leur métabolisme, à la croissance et à la différenciation des organes. Il y aurait donc une réduction des divisions cellulaires pour se maintenir viable. La lente germination des embryons conservés sur le milieu de transfert après leur repiquage sur le milieu de régénération pourrait être due au temps qu'il faut pour augmenter le potentiel osmotique et

CONCLUSION

Les études réalisées sur l'extraction des cylindres d'endosperme et la germination des embryons du cocotier montrent que le taux d'extraction des cylindres d'endosperme est statistiquement plus élevé (95,05 %) chez les noix âgées de 11 à 12 mois que chez celles de 8 mois (77,92 %). Le taux d'extraction des embryons à partir des cylindres d'endosperme est statistiquement identique pour les différents types de matériels. Par ailleurs, le taux de germination est de

énergétique de l'embryon. Cette augmentation pourrait permettre la reprise des activités métaboliques induisant l'émission de la racine ou la gemmule (Rabechault *et al.*, 1974). Par ailleurs, les échanges sous forme d'embryons zygotiques sur le milieu de transfert permet de sélectionner au niveau de la zone de collecte les embryons les plus performants par simple tri après l'excision. En effet, lors de la stérilisation et du conditionnement, les embryons de petite taille qui germent difficilement (Assy-Bah, 1992) et ceux blessés sont éliminés. Pour un échange sous forme de cylindres d'endospermes conditionnés dans des sachets plastiques, des précautions relatives à la conservation en présence de glace, dans des glacières doivent être prises jusqu'au jour de l'expédition (Rillo et Paloma, 1991). Par ailleurs, la glace et les liquides sont interdits dans les avions. Les cylindres d'endospermes doivent être ré-désinfectés dans le laboratoire d'accueil avant l'excision des embryons. Durant ces opérations, des pertes de matériels peuvent survenir par une désinfection et un isolement des embryons mal maîtrisés occasionnant des contaminations et des blessures. A cela s'ajoute l'absence d'embryon dans certains cylindres d'endosperme. Une conservation trop longue de plus de deux semaines des cylindres d'endospermes exposant l'embryon, associée à une longue période séparant la collecte de la mise en culture pourrait favoriser la prolifération de bactéries (Ledo *et al.*, 2010). L'échange de matériel sous forme d'embryons maintenus en vie ralentie permet un transfert sans difficulté, réduit la taille du matériel à transférer, garantit la qualité du matériel. Après réception du matériel dans les laboratoires d'accueil, un simple repiquage permet le transfert du matériel sur un milieu de régénération. Cependant compte tenu de quantité de milieu, un transfert rapide sur le milieu de régénération est nécessaire pour éviter la perte de matériel, la durée maximum de conservation étant de 2 semaines.

84,50 % pour les embryons et de 56 % pour les noix entières. Il n'y a pas de différence significative entre le taux de germination des embryons conservés sur le milieu de transfert (84,50 %) et ceux qui ne l'ont pas été (74,37%). En moyenne, la durée de germination d'un embryon est de 40 jours tandis que celle d'une noix entière est d'environ 73 jours. Il faut 3 semaines pour obtenir 25 % de germination et 6 semaines pour avoir 50 %, et 75 % de germination des embryons.

Cette étude a permis de montrer que la mise en culture des embryons sur un milieu de transfert qui les maintient en vie ralentie peut être utilisée pour l'échange de matériel entre les différents pays aussi bien pour des études de laboratoire que pour

l'enrichissement et la création de collection. L'utilisation du milieu de régénération peut conduire à un épuisement des constituants minéraux et entraîner le mort d'embryons ou des malformations au cours de la croissance.

REMERCIEMENTS

Les auteurs expriment leur reconnaissance au Laboratoire Centrale de Biotechnologie du Centre Nationale de Recherche Agronomique (CNRA) de Côte d'Ivoire et le COGENT qui ont permis que ce travail puisse se faire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Assy-Bah B, 1992. Utilisation de la culture d'embryons zygotiques pour la collecte et la conservation des ressources génétiques de cocotier (*Cocos nucifera* L.). Thèse de doctorat 3^{ème} cycle, Université Pierre Marie-Curie Paris VI. P 159.
- Assy-Bah B, Durand-Gasselien T, Engelmann F, Pannetier C, 1989. Culture *in vitro* d'embryons zygotiques de cocotiers (*Cocos nucifera* L.) : Méthode révisée et simplifiée d'obtention de plants de cocotiers transférables au champ. *Oléagineux* 44 (11): 515-523.
- Assy-Bah B, Durand-Gasselien T, Pannetier C, 1987. Use of zygotic embryo culture to collect germplasm of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Genetic Resources Newsletter* 71: 4-10.
- Batugal P, 2004. COGENT's multi-site International Coconut Genebank. In *Germplasm Health Management for COGENT's multi-site international coconut genebank*. Robert Ikin and Pons Batugal (ed). 3-9.
- Batugal P et Jayashree K, 2005. COGENT's multi-site International Coconut Genebank. In *Coconut Genetic Resources*. Pons Batugal, Ramanatha Rao V and Jeffrey Olivier, (ed). 106-114.
- Bolarin MC, Santa-Cruz A, Cayuela E, Perez-Alfo CF, 1995. Short-term solute changes in leaves and roots of cultivated and wild tomato seedlings under salinity. *Journal of Plant Physiology* 147: 463-468.
- Cueto CA, Johnson VB, Bourdeix R, Engelmann F, Kembu A, Konan JL, Kouassi Kan M, Rivera RL, Vidhanaarachchi V, wWise SF. 2012. Technical guidelines for the safe movement and duplication of coconut (*cocos nucifera* L.) germplasm using embryo culture transfer protocols. COGENT; Bioversity International, Montpellier, France
- Danso K, Quaicoe R, Oduro V, Dery S, Owusu-Nipah J, Amiteye S, Malaurie B, 2009. *In vitro* germination response and plantlets development of healthy and diseased zygotic embryo of coconut. *International Journal of Integrative Biology*: 7 (1): 26-31.
- Dulloo ME, Ramanatha Rao V, Engelmann F, Engels J, 2005. Complementary conservation of coconuts.). In *Coconut Genetic Resources*. Pons Batugal, Ramanatha Rao V and Jeffrey Olivier, (ed 75-90.
- Eeuwens CJ, 1976. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palm (*Cocos nucifera*) and date (*Phoenix dactylifera*) palms cultured *in vitro*. *Physiology Plantarum* 36: 23-28.
- Garcia BM, Malaurie B, Viltres PS, Campos CD, 2008. Efecto de distintas concentraciones de sacarosa en la conservación *in vitro* de coco (*Cocos nucifera* L.). *Colombiana de Biotecnología* 2: 111-119.
- Frison EA, Putter CAJ, Diekmann (1993). FAO/IBPGR Technical Guidelines for the Safe Movement of Coconut Germplasm. Food and Agriculture of the United Nations, Rome/International Board for Plant Genetic Resources, Rome, p 48.
- Karun A, Sajini KK, Parthasarathy VA, 2002. Increasing the efficiency of embryo culture to promote germplasm collecting in India. In *Coconut embryo in vitro culture: part II* Engelmann F., Batugal P. and Oliver J. (ed): 7-26.
- Koffi Y, N'Nan O, Konan J-L, Malaurie B, Engelmann F, 2013. Morphological and agronomical characteristics of coconut (*Cocos nucifera*) palms from *in vitro* culture zygotic embryo. In *Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 49 (5): 599-604
- Ledo AS, Ramos SRR, Diniz LEC, Konan J-LK, 2010. Performance of coconut Embryo Culture accessions introduced at International Coconut Genebank for Latin America and Caribbean (ICG-LAC). Résumé de

- communication N° S12. 203 in IHC Lisboa 2010, p 548.
- Le Saint J-P, De Taffin G, Bénard G, 1989. Conservation des semences de cocotier en emballage étanche. *Oléagineux*. 44 (1): 15 - 25.
- Morel G, Wetmore RM (1951). Fern callus tissue culture. *American Journal of Botany* 38: 141-143.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- N'Nan O, Borges M, Konan Konan J-L, Hoher V, Verdeil J-L, Tregear J, N'guetta ASP, Engelmann F, Malaurie B, 2012. A simple protocol for cryopreservation of zygotic embryos of ten accessions of coconut (*Cocos nucifera* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 48: 160-166
- Orozco-Segovia A, Batis Ana I, Rojas-Arechiga M, Mendoza A, 2003. Seed biology of palms: a review. *Palm* 45 (2): 79-94.
- Rabechault H, Buffard-Morel J, Varechon C, 1974. Recherches sur la culture *in vitro* des embryons de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.). XI. Effet de la pression osmotique sur la croissance et le développement et sur l'absorption des sucres. *Oléagineux* 29 (7): 351-356.
- Rillo EP et Paloma MBF, 1991. Storage and transport of zygotic embryos of *Cocos nucifera* L. for *in vitro* culture. *Plant Genetic Resource Newsletter*. 86: 1-4.
- Saldanha CW, Martins-Corder MP, 2012. *In vitro* germination and embryogenic competence acquisition of *Euterpe edulis* martius immature zygotic embryos. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 12: 171-178.
- Soni JN, Patel MN, Jha CV, 2010. Effect of different concentration of sucrose during *in vitro* pollen germination and pollen tube growth in *Cleome gynandra* L. *Life sciences leaflets* 8: 222-225
- Wuidart W, 1981. Production de matériel végétal cocotier. Tenue d'un germe. Conseil de l'IRHO N°215. *Oléagineux*. 36 (6): 305-309.
- Zizumbo-Villarreal D, Arellano J, 1998. Germination patterns in coconut populations (*Cocos nucifera* L.) in Mexico. *Genetic Resource and Crop Evolution*. 45: 465-473.