

Embryogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir d'explants foliaires : étude histologique

J. BUFFARD-MOREL

Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération, Laboratoire de ressources génétiques et d'amélioration des plantes tropicales, 911, avenue d'Agropolis, B. P. 5045, 34032 Montpellier, France

J.-L. VERDEIL

Institut de recherche pour les huiles et oléagineux - Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développements (IRHO-CIRAD) Laboratoire de ressources génétiques et d'amélioration des plantes tropicales, 911, avenue d'Agropolis, B. P. 5045, 34032 Montpellier, France

ET

C. PANNETIER

IRHO-CIRAD, Laboratoire de biologie cellulaire, Institut national de la recherche agronomique, Centre de Versailles, 78026 Versailles CEDEX, France

Reçu le 28 janvier 1991

BUFFARD-MOREL, J., VERDEIL, J.-L., et PANNETIER, C. 1992. Embryogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir d'explants foliaires : étude histologique. *Can. J. Bot.* 70 : 735-741.

Une étude histologique a été réalisée aux différentes étapes de l'embryogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir d'explants foliaires. Elle a permis de localiser les premières divisions cellulaires au niveau des cellules périvasculaires des explants. La croissance des cals nodulaires obtenus est assurée par la mise en place d'une assise méristématique à fonctionnement de type cambial. La nature racinaire de certaines formations a été observée. Des structures embryogènes peuvent apparaître sur les cals nodulaires; entièrement méristématiques au départ, elles s'épidermisent et se multiplient pour la plupart. Leur évolution peut conduire à des structures de type embryon après fragmentation et contagion mitotique au niveau de l'assise de type cambial. Ce schéma général d'obtention de structures embryonnaires peut cependant varier : (i) Soit il y a obtention rapide d'embryons à partir des cals nodulaires primaires. Cette voie a permis la régénération, par embryogenèse secondaire, d'un massif d'embryons (bourgeonnement au pôle racinaire). L'un d'entre eux a développé une pousse feuillée et des racines. La plante régénérée a été transférée en champ. (ii) Soit il y a formation de cals granuleux secondaires et production de façon plus systématique de structures embryogènes. Ces derniers devraient permettre une meilleure maîtrise du développement des structures embryonnaires.

Mots clés : *Cocos nucifera* L., histologie, embryogenèse somatique, explants foliaires.

BUFFARD-MOREL, J., VERDEIL, J.-L., and PANNETIER, C. 1992. Embryogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir d'explants foliaires : étude histologique. *Can. J. Bot.* 70: 735-741.

Histological studies were carried out at different stages of somatic embryogenesis of coconut (*Cocos nucifera* L.) from leaf explants. The primary formations resulted from mitotic divisions of perivascular cells. Differentiation of a cambium-like layer insured the growth of nodular calluses. The root origin of some formations was observed. Embryogenic structures appeared on some nodular calluses maintained in culture; initially they were highly meristematic and often developed an epidermis and divided. Then embryo-like formations could be obtained after fragmentation of the cambium-like layer producing meristematic areas. However, modifications of this scheme could be observed: (i) Embryos rapidly developed from a primary callus, and from these embryos, a secondary embryogenesis was induced leading, at the root pole, to a clump of somatic embryos. One of the latter developed a shoot and roots; the regenerated plant was then transferred to the field. (ii) Secondary granulous calluses producing larger quantities of embryogenic structures were formed. This material should prove useful for mastering the technique of developing embryogenic structures.

Key words: *Cocos nucifera* L., histology, somatic embryogenesis, foliar explants.

Introduction

Le cocotier (*Cocos nucifera* L.), plante oléagineuse pérenne le plus souvent allogame, est uniquement propagé par graine. La nécessité de disposer d'un matériel homogène hautement producteur pour la réalisation de plantations a conduit au développement de techniques de multiplication végétative *in vitro* par embryogenèse somatique. Différentes sources de matériel végétal ont été travaillées et ont permis l'obtention de structures de type embryons : les embryons zygotiques (2, 8, 11), les feuilles (7, 15, 17, 20) et les inflorescences (5, 6, 7, 20).

Dans des articles précédents (7, 15, 16, 20), nous avons montré la possibilité d'induire une embryogenèse somatique à partir de tissus de jeunes feuilles et de jeunes inflorescences de cocotier. La régénération de plantes entières a été également rapportée par différentes équipes (6, 7, 17); elle a été obtenue, semble-t-il, à partir d'un petit nombre de cultures et de

manière non répétitive. À l'heure actuelle, aucune méthode n'est maîtrisée.

Dans cet article, les observations histologiques réalisées aux différentes étapes de la culture à partir d'explants foliaires sont décrites; elles permettent l'interprétation des phénomènes observés sur le cocotier. Le contrôle rigoureux de l'état tissulaire, et particulièrement de son potentiel méristématique en callogenèse et en embryogenèse, révèle les limites des observations macroscopiques et la nécessité d'un appui histologique pour la conduite des cultures.

Matériel et méthodes

Des feuilles jeunes, non chlorophylliennes, sont utilisées sans désinfection préalable puisque protégées par les gaines foliaires des feuilles plus âgées. Elles sont prélevées sur des individus adultes (20-25 ans) de la variété Nain Jaune Malais et sur l'hybride Nain

Jaune Malais \times Grand Ouest Africain (hybride PB 121) créé par l'IRHO-CIRAD; ce matériel nous est fourni par la station Marc-Delorme en Côte-d'Ivoire.

Des fragments de folioles de 1 cm de large (comprenant les deux parties du limbe séparées par la nervure principale) sont placés, côté abaxial, sur un milieu composé de la solution minérale de Eeuwens (9), des vitamines de Morel et Wetmore (14), de saccharose à 87 mmol/L et d'agar (Sigma, n° A-7002) à 7,5 g/L. De l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) et du charbon activé et neutralisé (Sigma) sont ajoutés à des concentrations respectives de $1,35 \times 10^{-4}$ mol/L à $2,70 \times 10^{-4}$ mol/L et de 2 à 3 g/L (7), afin de tenir compte des différences de réactivité entre les individus de même origine génétique ou d'origines différentes. Le pH est ajusté à 4,5. Le milieu est distribué à raison de 20 mL par tube (24 mm \times 160 mm) et stérilisé par autoclavage pendant 20 min à 110°C. Après ensemencement, les cultures sont placées à l'obscurité à $27 \pm 1^\circ\text{C}$.

Les néoformations isolées des explants sont maintenues en culture par des repiquages successifs, sur des milieux appauvris progressivement en 2,4-D. Cette technique a été retenue après la mise en place de plusieurs essais (diminution de la concentration de $0,22 \times 10^{-4}$ à $0,45 \times 10^{-4}$ mol/L tous les quatre mois).

Aux différentes étapes de la culture, une dizaine d'échantillons sont prélevés et fixés (i) soit dans le fixateur de Bouin (4) ou dans un mélange à parties égales de solution A (acide chromique, 0,4 g; acide acétique, 1,5 mL; eau distillée, 98,5 mL) et de solution B (10% de solution de Formol du commerce) pour les inclusions en paraffine; (ii) soit dans une solution renfermant, pour 100 mL, 4 mL d'une solution de glutaraldéhyde à 25%, 50 mL de tampon phosphate à pH 7,2, 20 mL de paraformaldéhyde à 10%, 1 g de caféine et 26 mL d'eau distillée pour les inclusions en résine.

Les échantillons destinés à l'inclusion en paraffine sont déshydratés à l'éthanol puis au butanol (13) avant d'être placés dans un mélange de butanol, d'huile de paraffine et de Paraplast (1 : 1 : 4, v/v/v) porté à 56°C. Ils sont inclus après imprégnation dans trois bains de Paraplast pur, puis coupés entre 5 et 10 μm d'épaisseur. Pour les inclusions en résine, le matériel, après déshydratation à l'éthanol, imprégnation et inclusion en résine (Leica Instruments), a été coupé entre 3 et 4 μm . Les coupes sont colorées par la réaction à l'acide periodique - Schiff associée à l'hématoxyline de Regaud ou au Naphthol Blue Black (10).

Résultats et discussion

Origine, localisation et structure des formations nodulaires obtenues sur explants

Les tissus néoformés prennent naissance au niveau des cellules périvasculaires, origine identique à celle décrite sur le palmier à huile (18); ces cellules présentent (fig. 1) un noyau et un cytoplasme dense colorés par le Naphthol Blue Black, coloration qui confirme leur activation en présence de 2,4-D. Les divisions cellulaires se traduisent tout d'abord par un gonflement des nervures et par la formation d'îlots méristématiques constitués de quelques cellules accolées aux vaisseaux (fig. 2) puis d'amas méristématiques encore localisés à l'intérieur de l'explant (fig. 3). Le stade ultérieur conduit à la formation de cals nodulaires dont la croissance est assurée par la mise en place d'une assise méristématique à fonctionnement de type cambial (fig. 4). L'augmentation de taille de ces cals nodulaires provoque la déchirure de l'épiderme inférieur du foliole (côté abaxial); ils apparaissent alors le long des nervures ou au niveau de leur section, en bordure de l'explant (fig. 6). À ce stade, la zone de type cambial tend à se désorganiser au profit d'une zone méristématique plus diffuse (fig. 5) dans laquelle on note la présence d'amidon en quantité importante (fig. 7).

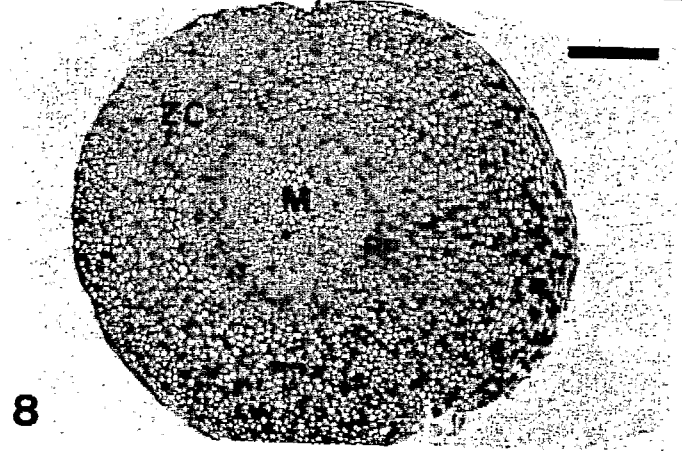
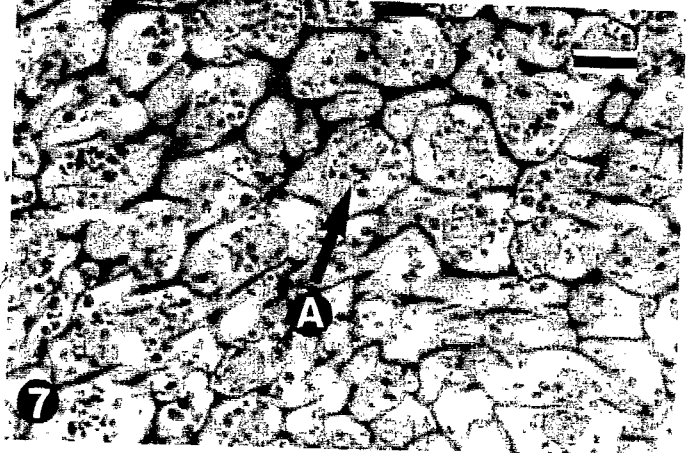
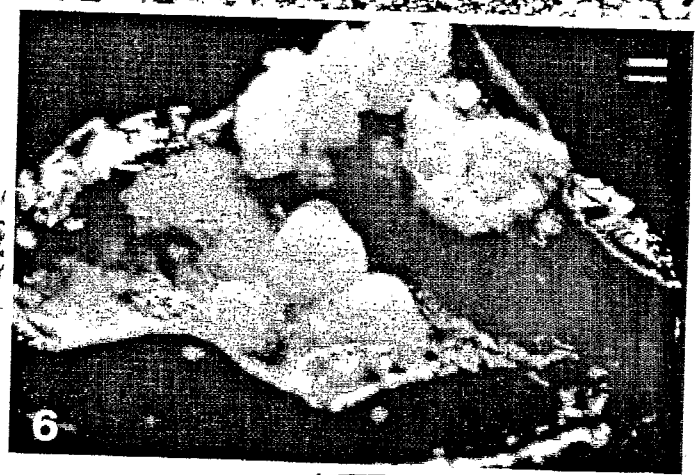
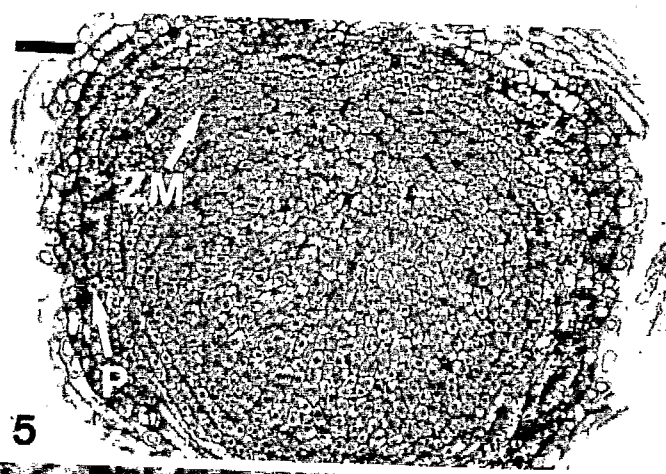
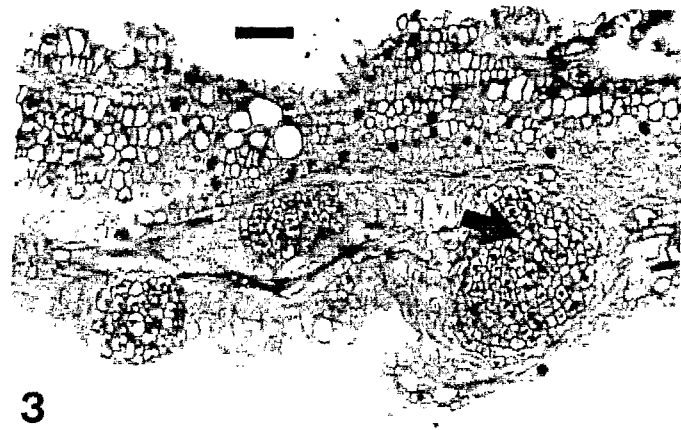
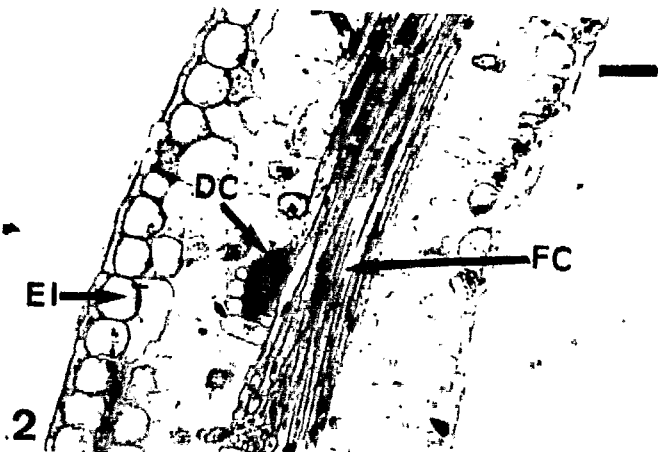
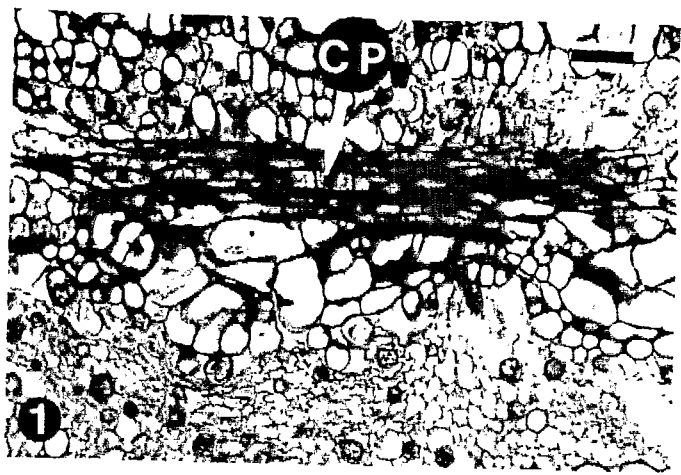
Sur les explants foliaires de cocotier, nous avons localisé une seule origine, au niveau des faisceaux conducteurs, contrairement à d'autres monocotylédones où différents tissus peuvent être à l'origine des néoformations. Chez la canne à sucre notamment, Bonnel *et al.* (3) ont montré la diversité tissulaire à l'origine de la formation des cals : épiderme, fibres sous-épidermiques, gaine périvasculaire et tissu vasculaire.

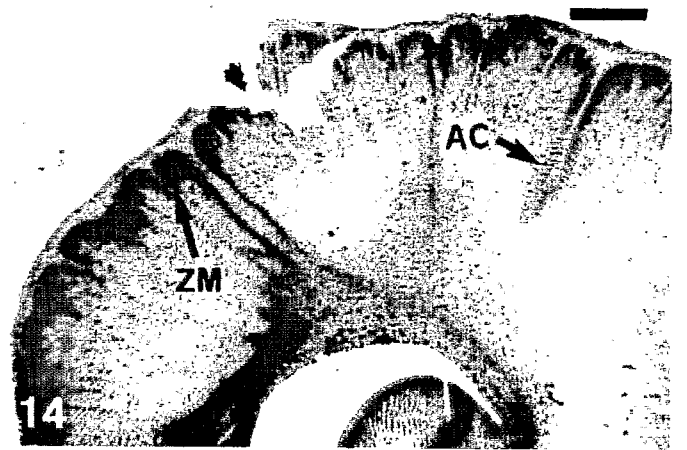
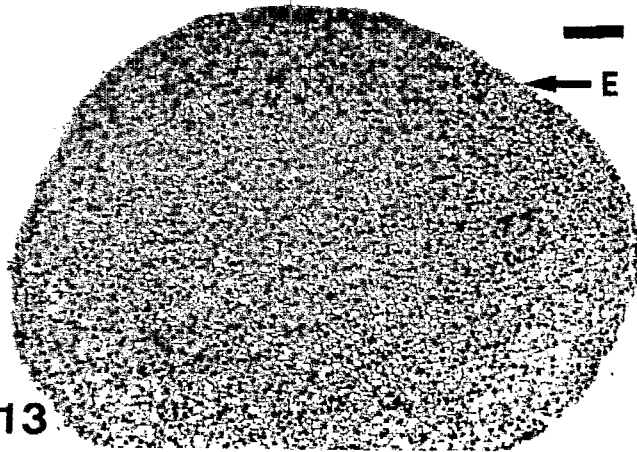
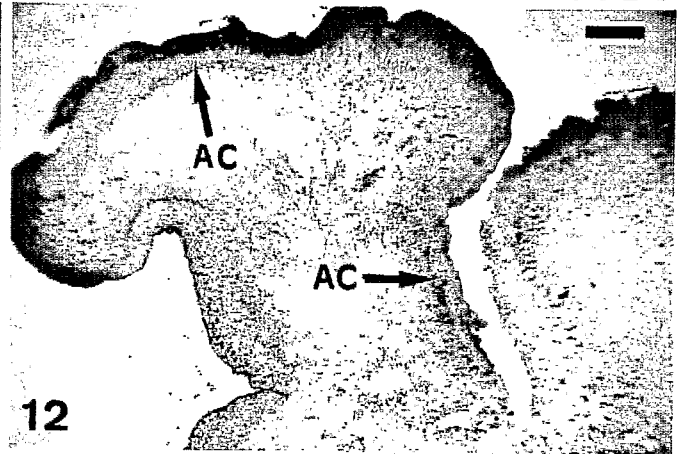
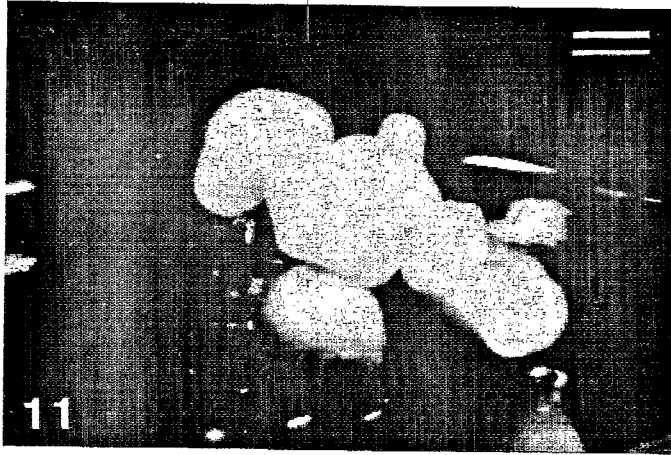
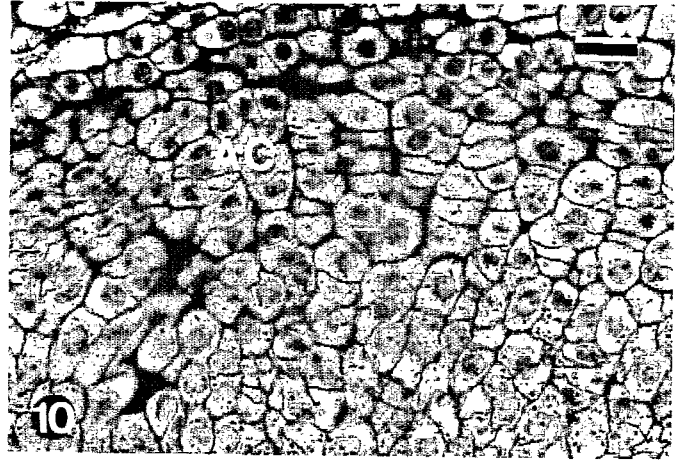
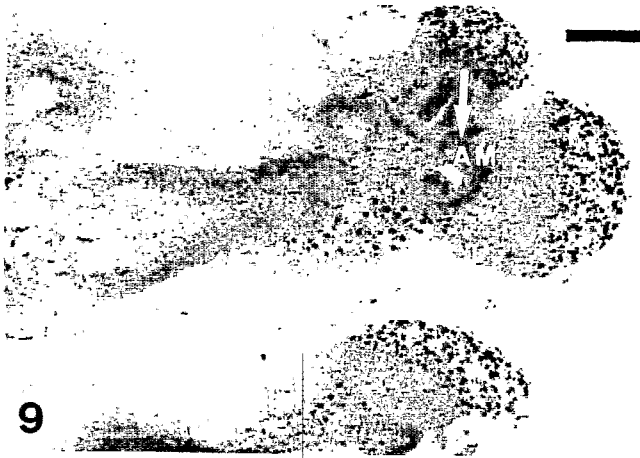
Cinq mois après la mise en culture, les formations sont identifiées macroscopiquement. L'examen histologique montre différents stades d'évolution : (i) néoformations encore très jeunes constituées uniquement de cellules méristématiques; (ii) nodules de couleur ocre, à surface brillante, formés d'une zone centrale méristématique et d'un parenchyme périphé-

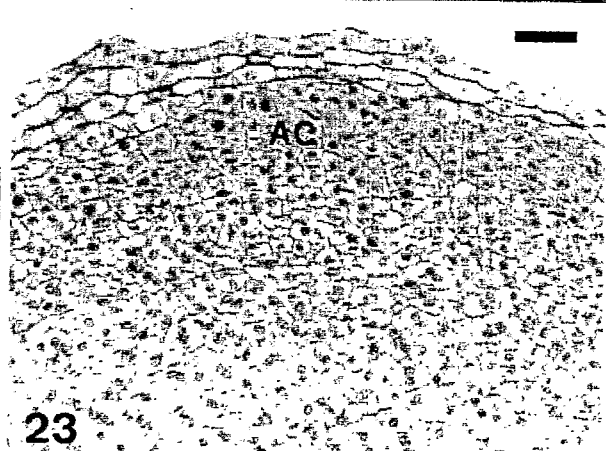
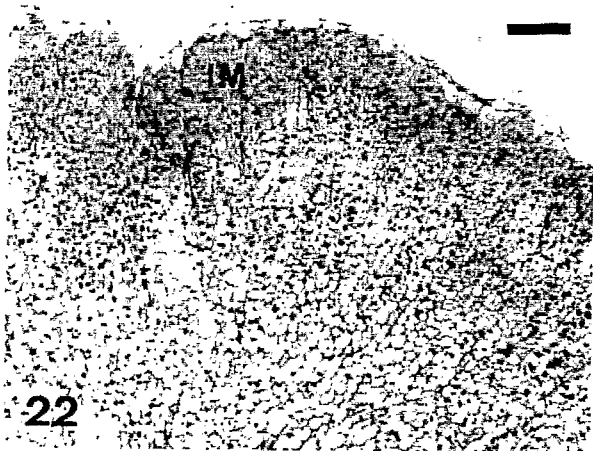
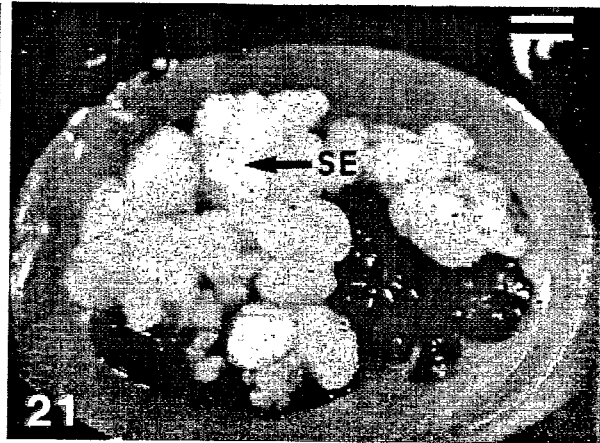
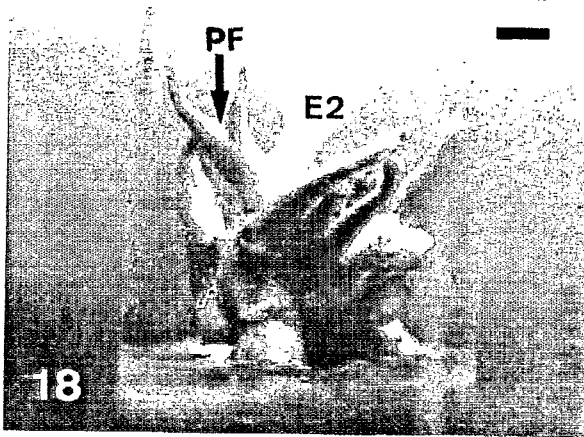
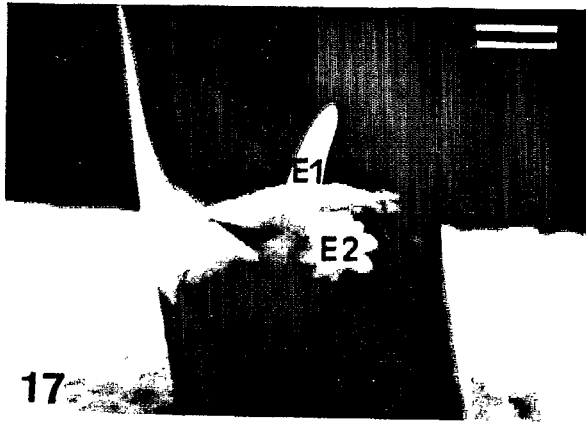
FIG. 1. Activation des cellules périvasculaires (CP) au sein d'un explant foliaire. Échelle graphique : 59 μm . FIG. 2. Premières divisions cellulaires (DC) au niveau des faisceaux conducteurs (FC) deux mois après la mise en culture. EI, épiderme inférieur. Échelle graphique : 110 μm . FIG. 3. Îlots méristématiques (IM) à l'intérieur de l'explant foliaire après trois mois de culture. Échelle graphique : 100 μm . FIG. 4. Formation de l'assise de type cambial (AC) dans la partie interne d'un cal nodulaire. P, parenchyme. Échelle graphique : 76 μm . FIG. 5. Cal nodulaire plus âgé montrant l'assise de type cambial en voie de désorganisation au profit d'une zone méristématique plus diffuse (ZM). Parenchyme périphérique avec cellules qui s'exfolient (P). Échelle graphique : 95 μm . FIG. 6. Cals nodulaires à la surface inférieure d'un foliole après quatre mois de culture. Échelle graphique : 2,5 mm. FIG. 7. Accumulation d'amidon (A) dans la couche méristématique du même nodule. Échelle graphique : 12,5 μm . FIG. 8. Cal nodulaire de type racinaire avec zone corticale (ZC), péricycle (PE) et moëlle (M). Échelle graphique : 280 μm .

FIG. 9. Cals nodulaires secondaires formés à partir de l'assise méristématique (AM). Échelle graphique : 950 μm . FIG. 10. Zone méristématique à fonctionnement radial de type cambial (AC) à la périphérie d'un nodule secondaire. Échelle graphique : 42 μm . FIG. 11. Structures embryogènes à la surface de cals nodulaires secondaires. Échelle graphique : 2,4 mm. FIG. 12. Développement des structures embryogènes à partir de l'assise de type cambial (AC). Échelle graphique : 250 μm . FIG. 13. Structure embryogène méristématique et épidermée (E). Échelle graphique : 100 μm . FIG. 14. Fragmentation de l'assise méristématique de type cambial (AC) et formations de zones à activité mitotique élevée (ZM). Échelle graphique : 500 μm . FIG. 15. Structures de type embryon formées à partir des zones méristématiques précédentes. Échelle graphique : 5 mm. FIG. 16. Coupe dans une structure de type embryon somatique avec vascularisation (V) et zone méristématique (M) à partir de laquelle la racine est initiée. Échelle graphique : 1000 μm .

FIG. 17. Embryon somatique (E1) initié sur cal nodulaire primaire et formation d'embryons secondaires (E2) au niveau du pôle racinaire. Échelle graphique : 6 mm. FIG. 18. Même culture quatre mois plus tard. Présence d'une pousse feuillée (PF) sur l'un des embryons secondaires (E2). Échelle graphique : 5 mm. FIG. 19. Plant de cocotier obtenu après son transfert en sol. Échelle graphique : 4,5 cm. FIG. 20. Cals granuleux d'origine secondaire. Échelle graphique : 2,5 mm. FIG. 21. Structures embryogènes (SE) à la surface d'un cal granuleux d'origine secondaire. Échelle graphique : 2,3 mm. FIG. 22. Coupe de cal granuleux d'origine secondaire; présence d'îlots méristématiques (IM) protégés par une assise épidermique. Échelle graphique : 80 μm . FIG. 23. Coupe dans une structure embryogène obtenue sur cal granuleux d'origine secondaire. AC, assise méristématique de type cambial. Échelle graphique : 50 μm .







rique riche en composés phénoliques et en amidon (fig. 5 et 7); (iii) formes plus âgées, avec une zone centrale présentant de nombreux éléments vasculaires et une couche superficielle de parenchyme en dégénérescence; (iv) formations opaques possédant des caractéristiques racinaires : zone corticale épaisse, péricycle, cylindre central et moelle (fig. 8).

Chez la plupart des monocotylédones (3, 12), les explants montrent une grande aptitude à former des méristèmes primaires organogènes en présence d'une substance auxinique comme le 2,4-D. Chez le cocotier, les méristèmes primaires néoformés sont de type méristèmes racinaires. C'est ainsi que certains nodules peuvent évoluer en racines lorsque le 2,4-D est supprimé. Par contre, le maintien du 2,4-D à des concentrations élevées inhibe les phénomènes d'expression racinaire (12).

Évolution des cals nodulaires primaires

Dans le processus le plus fréquemment observé, la mise en place d'une organogenèse à partir des cals nodulaires apparaît 3 à 18 mois après isolement de l'explant. Elle nécessite généralement le passage par des cals nodulaires secondaires, qui prennent naissance à partir de la zone méristématique interne (fig. 9). Ces cals nodulaires secondaires deviennent complexes lors de leur maintien en culture; ils se présentent alors sous la forme de nodules groupés, aux contours diffus et desquamant en surface par dégénérescence du parenchyme externe. Ils peuvent, plus rarement, être constitués de quelques nodules coalescents à surface lisse, d'un blanc opaque. Quel que soit leur aspect, ils renferment toujours, vers l'extérieur, une zone méristématique à fonctionnement radial de type cambial (fig. 10), la partie interne étant constituée par du parenchyme.

Deux évolutions sont alors possible: (i) soit la croissance et la multiplication des cals nodulaires secondaires se poursuivent pendant des mois et même des années sans changement notable; (ii) soit des structures globulaires blanches à aspect opalescent et de nature embryogène (fig. 11) apparaissent et se détachent du reste de la culture. Ces dernières formations se développent à partir de l'assise de type cambial (fig. 12). Elles sont entièrement méristématiques dès leur formation, puis un épiderme se différencie rapidement ce qui donne leur brillance (fig. 13).

L'évolution de ces structures embryogènes est différente selon que celles-ci sont isolées ou maintenues sur la culture mère.

Le plus souvent, leur isolement précoce conduit à la dégénérescence ou à un gonflement anormal des tissus constitués alors d'un parenchyme riche en amidon. Ces formations avec ou sans racines sont comparables au cotylédon (ou haustorium) de l'embryon zygotique, tissu riche en réserves amyliques.

Lorsqu'elles sont maintenues sur les cals d'origine, elles se multiplient et conduisent à l'obtention de massifs d'embryons soudés le plus souvent par leur partie haustoriale. On constate l'absence de fente cotylédonnaire et parfois de pétiole cotylédonnaire. Les observations histologiques aux différentes étapes de l'évolution de ces structures embryogènes ont permis d'identifier les événements suivants :

(i) Une assise méristématique de type cambial se forme dans la partie superficielle.

(ii) Des invaginations et un fractionnement de cette assise délimitent, vers l'intérieur, des zones à activité mitotique élevée constituant des massifs méristématiques (fig. 14).

(iii) Il y a croissance de ces massifs et formations d'avancées plus ou moins soudées entre elles (fig. 15). Certaines possè-

dent les caractéristiques d'embryons avec un pôle méristématique identique à la zone M décrite chez le palmier à huile (19) et une disposition des faisceaux vasculaires semblable à celle trouvée dans l'embryon zygotique (fig. 16). Aucun apex caulinaire n'a cependant été mis en évidence. La plupart de ces embryons restent bloqués à ce stade et n'évoluent plus. Ils présentent généralement une vascularisation importante qui conduit à la dégénérescence de la zone interne et à la disparition plus ou moins rapide du pôle méristématique.

À partir des mêmes traitements, conduisant au schéma général d'obtention des structures embryonnaires, deux autres voies ont été mises en évidence :

La première consiste en l'apparition rapide d'embryons somatiques sur cals nodulaires primaires. Cette voie a permis, à partir d'un embryon, un bourgeonnement adventif au pôle renfermant la zone méristématique M (fig. 17) déjà signalée. Les embryons secondaires regroupés en massif (fig. 18) présentaient les caractéristiques d'embryons zygotiques de cocotier : présence d'un haustorium, d'un pétiole et d'une fente cotylédonnaire. L'un d'eux a développé une pousse feuillée qui après isolement a subi un traitement d'enracinement (1). La plante régénérée a été sevrée avec succès; elle poursuit actuellement sa croissance en champ en Côte-d'Ivoire (fig. 19).

La seconde voie d'obtention de structures embryonnaires fait intervenir des cals secondaires granuleux apparaissant sur les cals nodulaires primaires (fig. 20 et 22). Ces cals secondaires permettent de disposer de lignées tissulaires homogènes à l'origine de structures embryogènes (globules opalescents) (fig. 21 et 23). Les formations embryonnaires obtenues sont comparables à celles décrites dans le schéma général. Les cals secondaires constituent un matériel de choix pour mieux appréhender les causes de blocages de l'embryogenèse. La difficulté de formation d'un méristème caulinaire et d'obtention de pousse feuillée pourrait résulter d'un mauvais équilibre hormonal; ce problème est actuellement étudié à partir de ce type de cals.

Conclusion

Les études histologiques permettent de s'assurer du maintien du potentiel méristématique des tissus en culture. Ce contrôle est particulièrement important sur le cocotier. En effet, la durée de culture des cals et des structures embryogènes est longue et les premiers embryons sont obtenus 2 ans en moyenne après l'ensemencement des explants primaires.

D'un point de vue fondamental, ce travail a permis de situer l'origine des cals primaires au niveau des cellules périvasculaires des explants foliaires (origine profonde).

Chez le cocotier comme chez la plupart des monocotylédones, l'apparition des cals nodulaires résulte de la néoformation, en présence d'auxine, de méristèmes primaires organogènes de nature racinaire (12). L'ontogenèse de ces cals peut être rapprochée de celle des racines adventives observées *in vivo*; elles ont une origine profonde, au niveau des faisceaux conducteurs. Sur plantes comme sur explants foliaires *in vitro*, les premières divisions cellulaires conduisent à la formation d'îlots méristématiques dont la croissance s'accompagne d'une digestion de proche en proche des tissus, favorisant la sortie des racines chez les plantes ou l'émergence de cals nodulaires à la surface de l'explant foliaire. Dans le cas du cocotier, l'expression racinaire est le plus souvent inhibée par des concentrations élevées en 2,4-D qui permettent le maintien du

potentiel méristématique et favorisent la formation de structures embryogènes.

Remerciements

Nous remercions, pour son précieux concours, la station Marc Delorme (IRHO-CIRAD) de Côte-d'Ivoire qui nous a fourni le matériel végétal, B. Bardin pour sa collaboration technique et le laboratoire de cytogénétique du CIRAD (Montpellier) pour ses conseils techniques en histologie.

1. Assy Bah, B., Durand-Gassel, T., et Pannetier, C. 1987. Use of zygotic embryo culture to collect germplasm of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Genet. Resour. Newsl.* **71** : 4-10.
2. Bhalla-Sarin, N., Bagga, S., Sopory, S. K., et Guha-Mukherjee, S. 1986. Induction and differentiation of callus from embryos of *Cocos nucifera* L. by IAA-conjugates. *Plant Cell Rep.* **5** : 322-324.
3. Bonnel, E., Demarly, Y., et Essad, S. 1983. Évolution anatomique des tissus foliaires de canne à sucre (*Saccharum* sp.) cultivés *in vitro*. *Can. J. Bot.* **61** : 830-836.
4. Bouin, P. 1897. Études sur l'évolution normale et l'involution du tube séminifère. *Arch. Anat. Microsc.* **1** : 225-263.
5. Branton, R. L., et Blake, J. 1983. Development of organized structures in callus derived from explants of *Cocos nucifera* L. *Ann. Bot. (Lond.)*, **52** : 673-678.
6. Branton, R. L., et Blake, J. 1986. Clonal propagation of coconut. *Dans* Cocoa and coconuts: progress and outlook. *Éditeurs* : E. Pushparajoh et Poh Soon Chew. Incorporated society of planters, Kuala Lumpur. pp. 771-780.
7. Buffard-Morel, J., Verdeil, J.-L., et Pannetier, C. 1988. Vegetative propagation of Coconut palm (*Cocos nucifera* L.) through somatic embryogenesis. *Proceedings of the International Biotechnology Symposium*, 8^e. Paris. *Éditeurs* : G. Durand, L. Bobichon et J. Florent. Société française de microbiologie. p. 117.
8. De Gusman, E. V., Del Rosario, A. G., et Ubalde, E. M. 1978. Proliferative growths and organogenesis in coconut embryo and tissue cultures. *Philipp. J. Coconut Stud.* **3** : 1-10.
9. Eeuwens, C. J. 1976. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palm (*Cocos nucifera*) and date palm (*Phoenix dactylifera*) cultured *in vitro*. *Physiol. Plant.* **36** : 23-28.
10. Fisher, D. B. 1968. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie*, **16** : 92-96.
11. Gupta, P. K., Kendurkar, S. V., Kulkarni, V. M., et al. 1984. Somatic embryogenesis and plants from zygotic embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro*. *Plant Cell Rep.* **3** : 222-225.
12. Hunault, G. 1979. Recherche sur le comportement de fragments d'organes et des tissus de Monocotylédones cultivés *in vitro*. V. Discussion. *Rev. Cytol. Biol. Vég. Bot.* **2** : 259-287.
13. Langeron, M. 1949. Précis de microscopie. Masson et C^{ie}, Paris.
14. Morel, G., et Wetmore, R. M. 1951. Fern callus tissue culture. *Am. J. Bot.* **38** : 141-143.
15. Pannetier, C., et Buffard-Morel, J. 1982. Production of somatic embryos from leaf tissues of coconut, *Cocos nucifera* L. *Proceedings of the International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*, 5^e. Tokyo, 11 au 16 juillet 1982. *Éditeur* : A. Fujiwara. Japanese Association for Plant Tissue Culture, Tokyo. pp. 755-756.
16. Pannetier, C., et Buffard-Morel, J. 1986. Coconut Palm (*Cocos nucifera* L.). *Dans* Biotechnology in agriculture and forestry. 1. Trees I. *Éditeur* : Y. P. S. Bajaj. Springer-Verlag, Berlin. pp. 430-450.
17. Raju, C. R., Prakash Kumar, P., Chandramohan, M., et Iyer, R. D. 1984. Coconut plantlets from leaf tissue cultures. *J. Plant. Crops*, **12** : 75-81.
18. Schwendiman, J., Pannetier, C., et Michaux-Ferrière, N. 1988. Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil Palm (*Elaeis guineensis*). *Ann. Bot. (Lond.)*, **62** : 43-52.
19. Vallade, J. 1966. Aspect morphologique et cytologique de l'embryon quiescent d'*Elaeis guineensis* jacq. *C. R. Séances Acad. Sci. Sér. D*, **280** : 829-832.
20. Verdeil, J. L., Buffard-Morel, J., et Pannetier, C. 1989. Embryogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir de tissus foliaires et inflorescenciels. Bilan des recherches et perspectives. *Oléagineux*, **44** : 403-411.