

Néof ormation de jeunes plantes d'*Elaeis guineensis* à partir de cals primaires obtenus sur fragments foliaires cultivés *in vitro* ⁽¹⁾

C. PANNETIER (2), P. ARTHUIS (2) et D. LIEVOUX (3)

Résumé. — Une méthode rapide de multiplication végétative du palmier à huile a été obtenue par la voie d'une embryogenèse somatique sur cals primaires. Ces cals sont obtenus à partir de tissus foliaires, dans un délai de 2 à 3 mois après la mise en culture. Les embryoides apparaissent sur cals isolés environ 2 mois après leur isolement et leur repiquage en conditions « organogènes ».

INTRODUCTION

Dans le cadre des études sur la multiplication végétative *in vitro* du palmier à huile, à partir de tissus foliaires, on a exploré une nouvelle voie susceptible de conduire à une méthode rapide et présentant un maximum de garanties quant à la conformité [Nozeran et Bancilhon, 1972].

Pour cela, on a étudié les conditions permettant la néof ormation de jeunes plantes à partir de cals primaires sans qu'il soit nécessaire d'obtenir des cultures de tissu à croissance rapide telles qu'elles sont définies par Rabéchault et Martin [1976] puis Ahée *et al.* [1981].

MÉTHODE ET RÉSULTATS

Le matériel végétal est constitué d'une ou deux feuilles prélevées sur des plants âgés de 2 ans (âge compté à partir de la germination) sans affecter la survie du plant donneur. Les explantats mis en culture sont de petits fragments de ces feuilles et leur nombre peut être d'environ 400 par individu d'origine.

Les cals primaires sont obtenus comme il est mentionné dans l'article précédent [Ahée *et al.*, 1981]. Un soin particulier a été apporté à la concentration en substances de croissance, ce facteur influençant non seulement la production de cals mais également leur devenir en culture.

Les premiers cals apparaissent environ 60 jours après la mise en culture des explantats foliaires, ensuite ils pour-

suivent leur croissance sur les fragments de feuilles (Fig. 1). Une centaine de jours après la mise en culture, lorsqu'ils ont atteint une taille suffisante, ils sont isolés sur de nouveaux milieux de culture (Fig. 2) dans lesquels les substances de croissance et divers compléments diffèrent dans leur nature et leur concentration par rapport au milieu utilisé dans l'étape précédente de production de cals primaires.

Environ 2 à 3 mois après cet isolement, soit 5 à 6 mois après la mise en culture des explantats foliaires, on observe l'apparition de structures d'un type nouveau. Il s'agit de formations opaques, de couleur blanche, aux contours bien délimités, alors que le cal d'origine est relativement diffus et de couleur beige (Fig. 3). Elles se détachent spontanément du tissu-mère, et des coupes réalisées dans des cals primaires portant ces jeunes néof ormations montrent qu'elles sont autonomes par rapport au tissu d'origine; la coupe d'une jeune néof ormation isolée est représentée sur la figure 4. Par ailleurs, leur aspect morphologique et leur développement ultérieur sont tout à fait comparables à ceux d'embryons de graines tels qu'ils sont décrits par Vallade [1965]. L'ensemble de ces observations permet de conclure que l'on est en présence d'un phénomène d'embryogenèse somatique.

Les embryoides obtenus sont isolés et repiqués. Ils deviennent rapidement chlorophylliens, se polarisent et poursuivent leur développement (Fig. 5). Cette croissance s'accompagne, dans un certain nombre de cas, d'un phénomène de multiplication (Fig. 6); un embryoïde isolé pouvant donner naissance à plusieurs jeunes plantes.

Les premières feuilles apparaissent environ 2 mois après l'isolement de l'embryoïde de son tissu d'origine (Fig. 7). Les résultats étant récents, on ne connaît pas encore le devenir des jeunes plantes, mais elles sont semblables à celles obtenues suivant le procédé décrit par Ahée *et al.* [1981].

Un phénomène d'organogenèse a été également obtenu à partir de cals primaires en culture depuis deux ans. A partir d'un seul cal, il a été possible d'obtenir, grâce à un pro-

(1) Les travaux qui font l'objet de cette note ont été réalisés dans le cadre d'une convention ORSTOM-I.R.H.O. sous la direction de M. le Professeur C. Lioret dans les laboratoires de physiologie végétale de l'ORSTOM.

(2) Chercheur I.R.H.O. (*).

(3) Technicienne ORSTOM (*).

(*) Adresse : Laboratoire de Physiologie végétale, Services scientifiques centraux de l'ORSTOM. 72-74, route d'Aulnay, 93140 Bondy (France).

ORSTOM
Fonds Documentaire

N° : 82/84/01378 M

Cote : B ex 1

Date : 18 MAI 1982

mène de multiplication du premier bourgeon régénéré, plus de 200 bourgeons-fils (une centaine étant déjà au stade plante feuillée) dans un délai de 6 mois après le passage du cal en conditions « organogènes ». Lorsque la culture est bien établie, on peut estimer le taux de multiplication à un facteur 5 tous les mois (Fig. 8).

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'ensemble de ces résultats met en évidence les possibilités d'expression, dans certaines conditions (tant en ce qui concerne l'état physiologique des tissus que les conditions de milieu de culture et d'environnement) des potentialités d'organogenèse d'un certain nombre des cals primaires. La présence de telles potentialités est très probablement liée au traitement d'obtention de ces cals et à leur origine tissulaire sur la feuille.

Le nombre de cals primaires ayant produit des embryoides est actuellement faible (4 p. 100), mais sera certainement amélioré. Le nombre d'embryoides produits par cal est souvent élevé (plus de 30 dans certains cas), et il semble aisé de les multiplier. En effet, des structures organisées obtenues *in vitro* présentent généralement des capa-

cités organogènes supérieures à celles d'organes prélevés dans la nature (problème de rajeunissement lié aux conditions de culture axénique).

L'obtention d'embryoides à partir de tissu foliaire de palmier à huile a donc pu être réalisée dans un délai très court (6 mois), ce qui présente l'avantage de maintenir les cultures sur des milieux complexes beaucoup moins longtemps que par la méthode utilisant le passage par des cultures de tissu à croissance rapide. En outre, l'étape où la culture est sous forme de tissu « dédifférencié » est très limitée dans le temps et les risques d'obtention de « mutants » ou de « variants » sont donc moindres.

Une fois la néoformation d'un bourgeon obtenue, il reste à améliorer les conditions et les modalités de sa multiplication, l'idéal étant de maîtriser l'activité des territoires méristématiques axillaires, et ce avec un taux de multiplication important.

Remerciements. — *Nous remercions la plantation expérimentale Robert-Michaux de Dabou (Côte-d'Ivoire) pour la fourniture des plants ainsi que MM. Schwendiman et Pallares qui nous ont accueilli et aidé pour la réalisation des examens histologiques dans le laboratoire de cytogénétique du GERDAT à Montpellier.*

BIBLIOGRAPHIE

- [1] AHÉE J. *et al.* (1981). — La multiplication végétative *in vitro* du palmier à huile par embryogenèse somatique. *Oléagineux*, 36, N° 3, p. 113-118.
- [2] NOZERAN R. et BANCILHON L. (1972). — Les cultures *in vitro* en tant que technique pour l'approche de problèmes posés par l'amélioration des plantes. *Ann. Amélior. Plantes*, 22, N° 2, p. 167-185.
- [3] RABÉCHAULT H. et MARTIN J. P. (1976). — Multiplication végétative du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) à l'aide de cultures de tissus foliaires. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 283, Sér. D., p. 1735-1737.
- [4] VALLADE J. (1965). — Recherches morphologique et cytologique sur l'embryon d'*Elaeis guineensis* Jacq. quiescent et en cours de germination. *Dipl. Et. sup., Univ. Dijon, Fac. Sci., Fr.*, 71 p.

SUMMARY:

Neoformation of young *E. guineensis* plants from primary calluses obtained on leaf fragments cultured *in vitro*.

C. PANNETIER, P. ARTHUIS and D. LIEVOUX, *Oléagineux*, 1981, 36, N° 3, p. 119-122.

A rapid method of oil palm vegetative propagation has been created by somatic embryogenesis on primary calluses. These were obtained from leaf tissues in 2-3 months after culturing began. The embryoids appear on isolated calluses about 2 months after isolation and seeding in « organogenetic » conditions.

RESUMEN

Neoformación de jóvenes plantas de *Elaeis guineensis* a partir de callos primarios logrados en pedazos de hojas cultivados *in vitro*.

C. PANNETIER, P. ARTHUIS y D. LIEVOUX, *Oléagineux*, 1981, 36, N° 3, p. 119-122.

Se encontró un método rápido de propagación vegetativa de la palma africana mediante una embriogénesis somática en callos primarios. Tales callos se obtienen a partir de tejidos de hojas en un plazo de 2 a 3 meses después de la puesta en cultivo. Los embrioides aparecen en callos aislados unos 2 meses después de su aislamiento y de su trasplante en condiciones « organógenas ».



FIG. 1. — Cal sur explantat foliaire, environ 100 jours après la mise en culture (Callus on leaf explant, about 100 days after start of culturing — Callo en explante foliar-aproximadamente a los 100 días después de la puesta en cultivo) — (× 3,4).

FIG. 2. — Cal isolé (Isolated callus — Callo aislado) — (× 3,4).



FIG. 3. — Embryoïdes sur cal (Embryoids on callus — Embrioides en callo) — (× 3,4).

FIG. 4. — Coupe dans un très jeune embryoïde (Section of very young embryoïd — Corte en un embrioides muy joven) — (× 73,4).



FIG. 5. — Embryoïdes isolés (Isolated embryoïds — Embrioides aislados) — (× 3,4).

FIG. 6. — Phase de multiplication des embryoïdes (Phase of multiplication of embryoïds — Fase de multiplicación de embrioides) — (× 3,4).



FIG. 7. — Apparition de la 1^{re} feuille (Appearance of 1st leaf — Aparición de la 1^a hoja) — (× 4).

FIG. 8. — Groupe de bourgeons en multiplication (Group of buds multiplying — Grupo de yemas en multiplicación) — (× 3).

Neof ormation of young *Elaeis guineensis* plants from primary calluses obtained on leaf fragments cultured in vitro (1)

C. PANNETIER (2), P. ARTHUIS (2) and D. LIEVOUX (3)

INTRODUCTION

In the framework of studies of *in vitro* vegetative propagation of the oil palm from leaf tissues, a new direction was explored likely to lead to a method both rapid and giving the maximum guarantee of conformity [Nozeran and Bancelhon, 1972].

To do this, we studied the conditions which would allow neof ormation of young plants from primary calluses, without it being necessary to obtain fast-growing tissue cultures as defined by Rabéchaux and Martin [1976] then Ahée et al. [1981].

METHODS AND RESULTS

The plant material is composed of one or two leaves taken from 2-year-old plants (age counted from germination) without affecting the survival of the donor plant. The explants cultured are small fragments of these leaves and there can be about 400 per original individual.

The primary calluses are obtained as described in the preceding article [Ahée et al. 1981]. Special care was given to the concentration of growth substances, as this factor influences not only callus production but also their future in culture.

The first calluses appear about 60 days after the culture of leaf explants starts, then they continue to grow on leaf fragments (Fig. 1). About 100 days after being placed in culture, once they are large enough they are isolated on new culture media (Fig. 2), in which the growth substances and various additives differ in their nature and concentration from those used in the previous stage of primary callus production.

About 2-3 months after this isolation, i.e. 5-6 months after culture of the leaf explants begins, a new type of structures appears. These are opaque, white formations of clearly-defined outline, whereas the original callus is beige and relatively diffuse (Fig. 3). They separate spontaneously from the mother-tissue, and sections of the primary calluses bearing these young neof ormations show they are autonomous in relation to the original tissue. The section of an isolated young neof ormation is shown in figure 4. Furthermore, their morphological appearance and later development are quite comparable to those of seed embryos as described by Vallade [1965]. The sum of these observations leads to the conclusion that we are dealing with a somatic embryogenesis phenomenon.

The embryoids obtained are isolated and reseeded. They become

chlorophyllian rapidly, polarise and continue to develop (Fig. 5). This growth is accompanied, in some cases, by a propagation phenomenon (Fig. 6); an isolated embryo can give rise to several young plants.

The first leaves appear about 2 months after isolation of the « embryoid » from its original tissue (Fig. 7). The results are recent, so we do not yet know what will become of the plantlets, but they are similar to those obtained by the procedure described by Ahée et al. [1981].

An organogenesis phenomenon was also observed in primary calluses cultured for 2 years. From one single callus, thanks to propagation of the first regenerated bud, it was possible to obtain more than 200 daughterbuds (about 100 being already at the leafed plant stage) within 6 months of the passage of the callus into organogenetic conditions. Once the culture is well-established, the propagation rate can be estimated at a factor of 5 every month (Fig. 8).

DISCUSSION AND CONCLUSION

This body of results shows the possibilities for the expression, in given conditions (as regards both the physiological state of tissues and the conditions of culture medium and environment) of the potential for organogenesis of a certain number of primary calluses.

The presence of such potential is very probably related to the treatment by which the calluses are obtained and their tissual origin on the leaf.

The number of primary calluses having produced embryoids is low at present (4 p. 100) but will undoubtedly improve. The number of embryoids produced per callus is often high (more than 30 in some cases), and it seems easy to propagate them. In effect, organised structures obtained *in vitro* generally have organogenetic capacities superior to those of organs sampled in nature (problem of rejuvenation linked to axenic culture conditions).

It has therefore been possible to obtain embryoids from leaf tissue in a very short period (6 months); this has the advantage of maintaining the cultures on complex media for a much shorter time than with the method passing through fast-growing tissue cultures. Furthermore, the stage where the culture is in the form of « dedifferentiated » tissue is very brief, lessening the risk of getting « mutants » or « variants ».

Once the neof ormation of a bud is achieved, the conditions and mode of its propagation must be improved. Ideally, the activity of meristematic axillary territories should be mastered, and this with a high propagation rate.

Acknowledgements. — We wish to thank the Robert Michaux experimental plantation at Dabou (Ivory Coast) for supplying the plants, as well as Messrs. Schwendiman and Pallares who welcomed us and helped us carry out histological examinations in the GERDAT's cytogenetics laboratory at Montpellier.

(1) The research dealt with in this note was carried out under the terms of an ORSTOM-I.R.H.O. agreement; it was directed by Prof. C. Lioret in the plant physiology laboratories of ORSTOM.

(2) I.R.H.O. Research Worker (*).

(3) ORSTOM Technician (*).

(*) Adresse : Laboratoire de Physiologie végétale, Services Scientifiques Centraux de l'ORSTOM, 72-74 route d'Aulnay, 93140 Bondy (France).

Neoformación de jóvenes plantas de *Elaeis guineensis* a partir de callos primarios obtenidos en pedazos de hojas cultivados *in vitro* (1)

C. PANNETIER (2), P. ARTHUIS (2) y D. LIEVOUX (3)

INTRODUCCIÓN

Dentro de los estudios sobre la propagación vegetativa *in vitro* de la palma africana a partir de tejidos de hojas, se exploró una vía nueva capaz de conducir a un método rápido y que presente las mayores garantías posibles en cuanto a conformidad [Nozeran y Bancelhon, 1972].

A tal efecto se estudió las condiciones que permitan la neoformación de plantas jóvenes a partir de callos primarios sin pasar necesariamente por los cultivos de tejido de crecimiento rápido según los definen Rabéchaux y Martin [1976] y luego Ahée *et al.* [1981].

MÉTODO Y RESULTADOS

El material vegetal lo constituyen una o dos hojas tomadas en plantones de 2 años de edad (contándose la edad a partir de la germinación) sin afectar la supervivencia del plantón donador. Los explantes puestos en cultivo son pequeños pedazos de estas hojas, y el número de los mismos puede alcanzar unos 400 por cada individuo de origen.

Se obtienen los callos primarios según lo mencionado en el artículo anterior [Ahée *et al.*, 1981]. Se dedica un cuidado especial a la concentración en substancias de crecimiento, por influir este factor no sólo en la producción de callos sino también en el futuro de los mismos como cultivo.

Los primeros callos aparecen unos 60 días después de la puesta en cultivo de explantes foliares, prosiguiéndose luego su crecimiento en los fragmentos de hojas (Fig. 1). A los 100 días después de la puesta en cultivo, cuando han alcanzado un tamaño suficiente, se los aísla en nuevos medios de cultivo (Fig. 2) en los que las substancias de crecimiento y varios complementos se diferencian por su índole y concentración con relación al medio utilizado en la etapa anterior de producción de callos primarios.

Unos 2 a 3 meses después de este aislamiento, o sea 5 a 6 meses después de la puesta en cultivo de explantes foliares, se observa la aparición de estructuras de un tipo nuevo. Se trata de formaciones opacas, de color blanco, de contornos bien delimitados, cuando el callo de origen es relativamente difuso y de un color amarillento (Fig. 3). Se desprenden espontáneamente del tejido madre y unos cortes realizados en callos primarios que llevan estas jóvenes neoformaciones muestran que son autónomas con relación al tejido de origen; el corte de una joven neoformación aislada se representa en la figura 4. De otra parte, su aspecto morfológico y su desarrollo ulterior son muy comparables a los de embriones de semillas según los describe Vallade [1965]. El conjunto de estas observaciones permite deducir que estamos ante un fenómeno de embriogénesis somática.

Se aísla y trasplanta los embrioides obtenidos. Se hacen rápidamente clorofílicos, polarizándose y prosiguiéndose su desarrollo (Fig. 5). En cierto número de casos este crecimiento viene junto con un fenómeno de multiplicación (Fig. 6); un embriode aislado puede dar origen a varios plantones jóvenes.

Las primeras hojas aparecen unos 2 meses después del aislamiento del embriode del tejido de origen (Fig. 7). Por ser los resultados recientes, aún no se conoce el futuro de los plantones jóvenes, pero se parecen a los que se obtuvo con el procedimiento descrito por Ahée *et al.* [1981].

También se logró un fenómeno de organogénesis a partir de callos primarios en cultivo desde hace dos años. A partir de un solo callo ha sido posible conseguir, mediante un fenómeno de multiplicación de la primera yema regenerada, más de 200 yemas hijas (encontrándose ya en el estado de planta con hojas un centenar de las mismas) en un plazo de 6 meses después del paso del callo en condiciones « organógenas ». Cuando el cultivo está bien establecido, se puede estimar el porcentaje de multiplicación de las yemas en un factor 5 cada mes (Fig. 8).

DISCUSION Y CONCLUSIÓN

El conjunto de estos resultados evidencia las posibilidades de expresión, en ciertas condiciones (tanto en lo que respecta al estado fisiológico de tejidos como a las condiciones del medio de cultivo y del medio ambiente), de las potencialidades de organogénesis de cierto número de callos primarios. La presencia de tales potencialidades queda vinculada con toda probabilidad al tratamiento de obtención de tales callos y a su origen desde el punto de vista de los tejidos en las hojas.

El número de callos primarios que produjeron embrioides es escaso ahora (4 p. 100) pero probablemente subirá. El número de embriones producidos por callo es alto muchas veces (más de 30 en ciertos casos) y parece fácil multiplicarlo. En efecto, estructuras organizadas obtenidas *in vitro* suelen presentar capacidades de organogénesis mayores que las de órganos tomados en la naturaleza (problema de rejuvenecimiento relacionado con las condiciones de cultivo axénico).

O sea que ha sido posible conseguir embrioides a partir de tejido foliar de palma africana en un plazo muy corto (6 meses), lo cual ofrece la ventaja de mantener los cultivos en medios complejos durante un período mucho más breve que en el método que utiliza el paso por cultivos de tejido de crecimiento rápido. Además, la etapa en que el cultivo se encuentra bajo la forma de tejido « desdiferenciado » es muy breve, por lo que no hay tanto riesgo de obtener « mutantes » o « variantes ».

Después de obtenida la neoformación de una yema, quedan por mejorar las condiciones y las modalidades de su multiplicación, siendo lo ideal el dominio de la actividad de los territorios meristemáticos axilares, esto con un alto porcentaje de multiplicación.

Agradecimientos. — *Le agradecemos a la plantación experimental Robert-Michaux de Dabou (Costa de Marfil) el suministro de plantones, y a los Sres Schwendiman y Pallares su acogida en la realización de exámenes histológicos en el laboratorio de citogenética del GERDAT en Montpellier.*

Extrait de *Oléagineux*, 36^e année, n° 3, Mars 1981, p. 119-122.

(1) Los trabajos que han sido objeto de la presente nota se efectuaron dentro de un convenio ORSTOM-I.R.H.O. bajo el mando del Profesor C. Lioret en los laboratorios de Fisiología vegetal del ORSTOM.

(2) Investigador I.R.H.O. (*).

(3) Técnica ORSTOM (*).

(*) Dirección: Laboratoire de Physiologie végétale, Services Scientifiques Centraux de l'ORSTOM, 72-74, route d'Aulnay, 93140 Bondy (France).