

BIOTECHNOLOGIES (PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE). — *Survie et prolifération d'embryons somatiques de Palmier à huile (Elaeis guineensis Jacq.) après congélation dans l'azote liquide.* Note de Florent Engelmann, Yves Duval et Jean Dereuddre, présentée par Alexis Moyse.

Des massifs de jeunes embryons somatiques de Palmier à huile, obtenus après 2 mois de culture sur un milieu contenant 0,3 M de saccharose, survivent à une congélation à -196°C. Dans les essais réalisés ici, ils sont placés pendant 7 jours sur un milieu enrichi en saccharose, avant d'être plongés directement dans l'azote liquide. Après un réchauffement de 1 mn dans un bain-marie à 40°C, ils sont transférés pendant 3 semaines sur des milieux progressivement appauvris en saccharose. La reprise de leur prolifération n'est observée qu'en présence de l'acide 2,4 dichlorophénoxyacétique (2,4-D). Une cinquantaine de pousses feuillées d'apparence normale ont déjà été obtenues.

BIOTECHNOLOGIES (PLANT PHYSIOLOGY). — *Survival and proliferation of oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) somatic embryos after freezing in liquid nitrogen.*

The process of in vitro vegetative propagation of the oil palm, developed by O.R.S.T.O.M./I.R.H.O., presently being applied on an industrial scale, uses somatic embryogenesis from leaf callus. The mass production of plantlets is ensured by somatic embryogenesis. Since genetic stability cannot be guaranteed for long periods of in vitro culture, we have sought a method of cryopreservation which ensures the survival of the embryos and the recovery of somatic embryogenesis.

According to the observations of different authors, only embryos at early stages of their development are able to survive freezing. With oil palm, young embryos were obtained after a 2 month culture period on a medium containing saccharose 0.3 M. These embryos were then pretreated for 7 days on a medium enriched with saccharose 0.75 M, cooled rapidly in sterile ampoules by direct immersion in liquid nitrogen. After 1 hr. stay in liquid nitrogen, the embryos were thawed rapidly by immersion of the ampoules in a warm water-bath (40°C) during 1 min. and then transferred for 1 week on a medium containing saccharose 0.3 M and 2 weeks on the standard medium.

Although this method gave satisfactory survival rates, the number of plantlets obtained remained very low. The recovery of adventive embryogenesis and the production of numerous shoots with embryos stored in liquid nitrogen were observed only if 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (5×10^{-7} to 10^{-5} M) was added after thawing to the culture medium during 1 to 3 weeks.

This preliminary work represents a first success in the application of cryopreservation to embryos originating from a tropical crop.

INTRODUCTION. — La multiplication végétative *in vitro* du Palmier à huile a été réalisée par plusieurs équipes à partir d'explants racinaires [1] ou foliaires [2]; elle met en jeu des phénomènes de callogenèse puis d'embryogenèse somatique sur les cals obtenus. Les plants sont ensuite produits à grande échelle grâce au développement d'embryons somatiques adventifs apparaissant sur les embryons issus des cals. Cette embryogenèse adventive se réalise, dans certains cas, de manière continue et permet le maintien en culture *in vitro* de lignées d'embryons pendant plusieurs années. Cependant, cette façon de procéder présente des risques pour la stabilité génétique des cultures [3]. Une méthode de conservation à très basse température, *a priori* susceptible d'assurer le maintien des caractéristiques des différents clones disponibles, a donc été recherchée.

La cryoconservation de matériel végétal cultivé *in vitro* [4] comporte généralement plusieurs étapes successives : un prétraitement qui consiste en une culture du matériel en présence de substances cryoprotectrices, la congélation, le réchauffement, puis un post-traitement au cours duquel le matériel est cultivé dans des conditions favorisant la reprise de sa croissance.

Pour leur cryoconservation, les embryons doivent être utilisés aux premiers stades de leur développement, comme l'ont montré Withers [5] et Henshaw [6]. De plus, il a été rapporté sur différents matériels, comme les embryons somatiques de *Daucus carota* [7] ou les embryons zygotiques de *Capsella bursa pastoris* [8] et d'*Elaeis guineensis* [9], qu'une déshydratation partielle était nécessaire avant la congélation. Ces deux conditions ont

O.R.S.T.O.M.

Fonds Documentaire

N° : 23056 ex. 1

Cote : B 23056

Date : 86/12/15 75 M

été adoptées pour mettre au point une méthode de congélation d'embryons somatiques de Palmier à huile utilisant un refroidissement très rapide, comme dans le cas des embryons zygotiques [9].

MATÉRIEL ET MÉTHODE. — La culture d'embryons somatiques adventifs utilisée (fig. 1) a été produite par l'équipe O.R.S.T.O.M./I.R.H.O. de Bondy en 1980 par une méthode décrite précédemment [10]. La culture est repiquée tous les mois sur un milieu de Murashige et Skoog modifié [11] et dépourvu de régulateurs de croissance (milieu standard), contenant 0,1 M de saccharose. Les cultures sont placées à 27°C sous un éclairage de 20 W.m⁻² (tubes fluorescents Durotest type True Lite) avec une photopériode de 12 h sur 24. Ces conditions d'environnement sont utilisées lors du prétraitement et du post-traitement.

Des essais préliminaires ont montré qu'une culture de 2 mois sur le milieu standard contenant 0,3 M de saccharose permet d'obtenir avec une fréquence élevée de jeunes embryons non chlorophylliens, d'une taille de 1 à 3 mm (fig. 2), qui sont seuls capables de supporter la congélation.

Ces jeunes embryons sont ensuite isolés par massifs (fig. 3) et subissent le traitement suivant :

(a) *Prétraitement.* — Les massifs d'embryons sont placés dans des boîtes de Petri pendant 7 jours, sur un milieu standard gélosé (8⁰/₁₀₀) contenant 0,75 M de saccharose, ce qui a pour effet d'abaisser leur teneur en eau de 80 à 60% environ par rapport à la matière fraîche.

(b) *Congélation.* — Les massifs d'embryons sont introduits à sec dans des ampoules stériles de 2 ml en polypropylène et celles-ci sont immergées directement dans l'azote liquide. La température de -196°C est atteinte en 1 mn environ. Dans les expériences décrites ici, le temps de conservation à -196°C a été limité à 1 h.

(c) *Réchauffement.* — Les échantillons sont décongelés en plongeant les ampoules dans un bain-marie à 40°C pendant 1 mn.

(d) *Post-traitement.* — Les embryons sont cultivés sur le milieu standard additionné de 0,3 M de saccharose pendant 1 semaine, puis sur le milieu standard additionné de 0,1 M de saccharose pendant 2 semaines, ou bien sur les mêmes milieux contenant du 2.4-D (de 5.10⁻⁷ à 10⁻⁵ M), pendant 1, 2 ou 3 semaines. Les résultats sont exprimés par le taux de survie, c'est-à-dire le pourcentage d'embryons ayant présenté une croissance pendant le post-traitement. La reprise de l'embryogenèse adventive est considérée comme effective lorsque la culture d'embryons issus d'un massif présente un taux de multiplication des embryons comparable à celui du témoin. Les témoins correspondent à des massifs d'embryons ayant subi tous les traitements sauf la congélation.

RÉSULTATS. — Les différents résultats obtenus ont montré que le taux de survie des embryons n'était pas lié à la durée de contact avec le 2.4-D. Dans le tableau, il n'a donc

EXPLICATIONS DE LA PLANCHE

Fig. 1. — Embryons obtenus sur le milieu standard contenant du saccharose 0,1 M.

Fig. 1. — *Embryos obtained on standard medium containing 0.1 M saccharose.*

Fig. 2. — Massifs de jeunes embryons (flèche) obtenus après 2 mois de culture sur le milieu standard contenant du saccharose 0,3 M.

Fig. 2. — *Clumps of young embryos (arrow) obtained after a 2 month culture on standard medium containing 0.3 M saccharose.*

Fig. 3. — Massifs d'embryons en cours de prétraitement sur le milieu standard contenant du saccharose 0,75 M.

Fig. 3. — *Clumps of embryos during pretreatment on standard medium containing 0.75 M saccharose.*

Fig. 4. — Reprise de l'embryogenèse adventive après apport de 2.4-D pendant le post-traitement.

Fig. 4. — *Recovery of adventive embryogenesis after addition of 2,4-D during post-treatment.*

Fig. 5. — Obtention de pousses feuillées après apport de 2.4-D pendant le post-traitement.

Fig. 5. — *Production of shoots after addition of 2,4-D during post-treatment.*

Les traits représentés sur les figures 1 à 5 correspondent à 1 cm.

Magnification bars represent 1 cm.

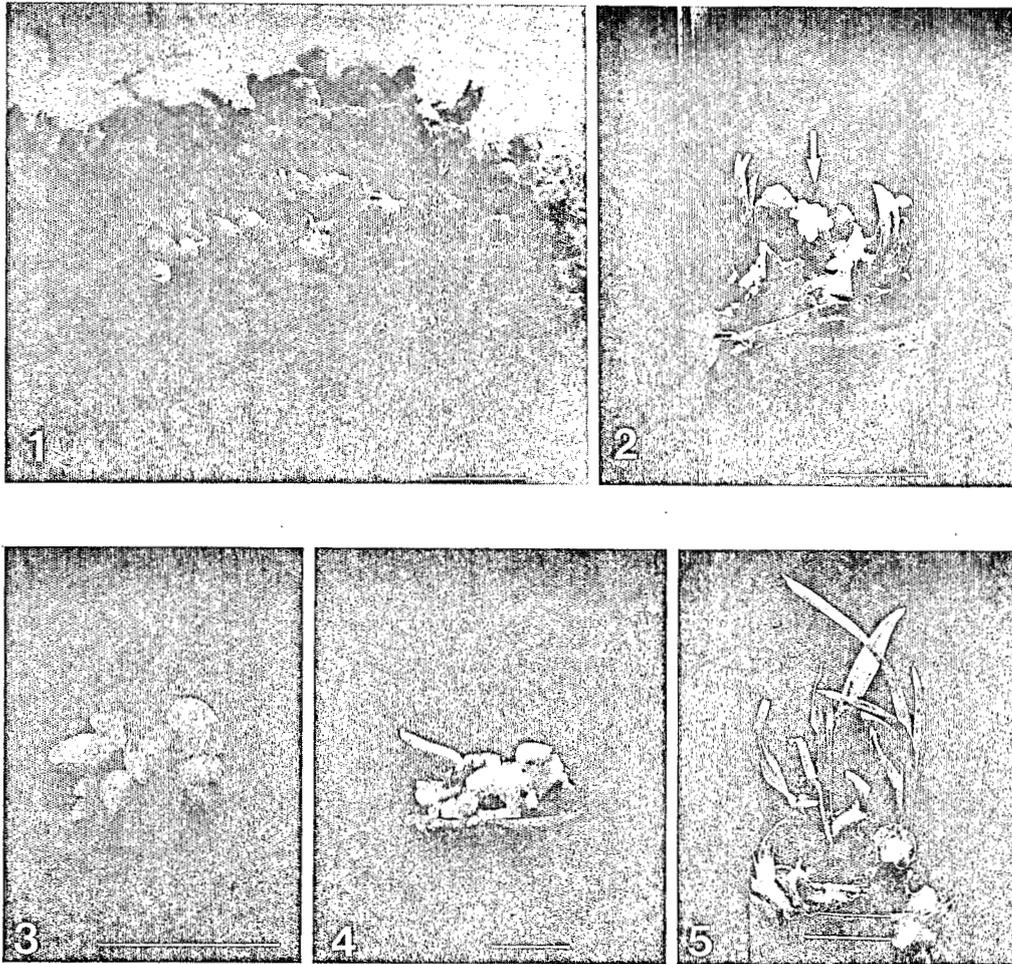


TABLEAU
 Effet de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D)
 sur le taux de survie des embryons témoins ou congelés dans l'azote liquide.
*Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)
 on the survival rate of unfrozen and frozen embryos.*

Concentration en 2,4-D . . .	Conditions de post-traitement											
	Matériel témoin (90 massifs)					Matériel congelé (97 massifs)						
	0	$5 \cdot 10^{-7} M$	$10^{-6} M$	$2,5 \cdot 10^{-6} M$	$5 \cdot 10^{-6} M$	$10^{-5} M$	0	$5 \cdot 10^{-7} M$	$10^{-6} M$	$2,5 \cdot 10^{-6} M$	$5 \cdot 10^{-6} M$	$10^{-5} M$
Matériel traité :												
Nombre de massifs	15	15	15	15	15	15	17	15	16	16	17	16
Nombre d'embryons	74	96	77	70	95	93	66	79	87	75	86	68
Survie en fin de post-traitement :												
Nombre de massifs	12	11	10	5	11	8	7	8	7	5	6	4
Nombre d'embryons	63	74	52	35	65	50	36	38	29	23	28	25
% de survie des embryons	85	77	67	50	61	54	55	48	33	31	33	37

p. 114

été tenu compte que de la concentration en 2.4-D et les résultats ont fait l'objet d'une étude statistique (test de χ^2).

(a) *Survie des embryons.* — Tous les embryons témoins ne survivent pas en fin de post-traitement. Ce phénomène peut résulter d'un effet de blessure lors de la dissection ou d'une toxicité des fortes teneurs en saccharose [8] utilisées pendant le prétraitement. Dans tous les cas, le taux de survie des embryons congelés est significativement inférieur à celui des embryons non congelés ($\alpha < 0,001$). L'utilisation de 2.4-D lors du post-traitement est défavorable à la survie des embryons témoins ($\alpha < 0,01$) ou congelés ($\alpha < 0,02$).

(b) *Reprise de l'embryogenèse adventive.* — La reprise de l'embryogenèse adventive des massifs témoins, traités ou non par le 2.4-D, peut être obtenue dans toutes les conditions utilisées. Au contraire, pour le matériel congelé, elle n'a été observée (fig. 4) que dans deux cas sur un total de 97 massifs congelés, correspondant à des post-traitements en présence de $2,5 \cdot 10^{-6}$ M et 10^{-5} M de 2.4-D. Les cultures d'embryons obtenues à partir de ces deux massifs présentaient un taux de multiplication (3 environ) comparable à celui du témoin non congelé. Une cinquantaine de pousses feuillées d'apparence normale (fig. 5) ont été produites à partir de ces deux massifs, 8 mois après leur congélation. Bien qu'aucune reprise de l'embryogenèse adventive des massifs congelés non traités par le 2.4-D n'ait été observée, ce résultat qui porte sur un effectif relativement faible (17 massifs) ne permet pas de conclure que l'utilisation de cette auxine est nécessaire à la reprise de l'embryogenèse adventive.

CONCLUSION. — Cette première recherche d'une méthode de congélation d'embryons somatiques de Palmier à huile, a conduit à des résultats qui permettent sans doute d'envisager leur cryoconservation. En effet, des taux de survie importants ont été obtenus avec les structures massives et complexes que représentent les groupes d'embryons. Une telle méthode, caractérisée par l'emploi d'un seul agent cryoprotecteur (saccharose) et d'un refroidissement très rapide, est d'une mise en œuvre simple. Toutefois, l'hétérogénéité du matériel utilisé entraîne des taux de survie irréguliers, comme dans le cas, par exemple, de méristèmes de manioc [12]. En outre, l'emploi de 2.4-D pendant le post-traitement ne permet de résoudre que partiellement le problème de la reprise de la prolifération des embryons.

Une amélioration de la méthode devra être recherchée en définissant de façon plus précise les embryons susceptibles de résister à la congélation, en employant d'autres cryoprotecteurs ou en utilisant des vitesses de refroidissement plus lentes et programmées. Néanmoins, ces premiers résultats ouvrent des perspectives dans le domaine des applications. Ainsi, la possibilité de faire résister des embryons somatiques de Palmier à huile à la température de l'azote liquide permet d'envisager la mise en place ultérieure d'une collection d'embryons issus d'individus sélectionnés. En particulier, ce mode de conservation devrait faciliter la gestion du matériel végétal *in vitro* utilisé dans les laboratoires produisant des plantules de Palmier à huile à l'échelle industrielle.

Remise le 29 avril 1985.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] R. H. V. CORLEY, J. H. BARRETT et L. H. JONES, in *Int. dev. oil palm, Proc. malays. int. agric. oil palm conf.*, 1976, p. 1-7.
- [2] H. RABEAULT et J. P. MARTIN, *Comptes rendus*, 283, série D, 1976, p. 1735-1737.
- [3] M. W. BAYLISS, *Int. Rev. Cytol.*, 11A, 1980, p. 113-144.

- [4] K. K. KARTHA, in *Applications of plant cell and tissue culture to agriculture and industry*, D. T. TOMES et coll. éd., University of Guelph, Ontario, Canada, 1982, p. 139-161.
- [5] L. A. WITHERS, *Tissue culture storage for genetic conservation*, I.B.P.G.R. Technical Report, Rome, 1980, 91 p.
- [6] G. G. HENSHAW, *Proc. 5th intl. cong. plant tissue and cell culture*, Tokyo, 1982, p. 789-792.
- [7] L. A. WITHERS, *Plant Physiol.*, 63, 1979, p. 460-467.
- [8] M. MONNIER et C. LEDDET, *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 127, *Actual. Bot.*, 1980, p. 71-77.
- [9] B. W. W. GROUT, K. SHELTON et H. W. PRITCHARD, *Ann. Bot.*, 52, 1983, p. 381-384.
- [10] C. PANNETIER, P. ARTHUIS et D. LIEVOUX, *Oléagineux*, 36, n° 3, 1981, p. 119-122.
- [11] J. HANOVER et C. PANNETIER, *Proc. 5th intl. cong. plant tissue and cell culture*, Tokyo, 1982, p. 745-746.
- [12] K. K. KARTHA, N. L. LEUNG et L. A. MROGINSKI, *Z. Pflanzenphysiol.*, 107, 1982, p. 133-140.

E. F. et D. J. : C.N.R.S., *Laboratoire de Physiologie des Organes végétaux après Récolte*,
4 ter, route des Gardes, 92190 Meudon;

D. Y. : C.I.R.A.D./I.R.H.O., *Laboratoire de Physiologie végétale*,
Services scientifiques centraux de l'O.R.S.T.O.M.,
72-74, route d'Aulnay, 93140 Bondy.