

La production de palmier à huile par culture *in vitro* (1)

J. M. NOIRET (2), J. P. GASCON (3), C. PANNETIER (4)

Résumé. — La sélection du palmier à huile a connu différentes phases qui ont permis de passer du palmier spontané (99 p. 100 de palmiers *dura* à grosse coque) au palmier sélectionné (100 p. 100 de palmiers hybrides *tenera* à coque mince), et d'un rendement de 500-600 kg d'huile/ha à un rendement potentiel de 6 à 7 tonnes. L'application du procédé de « Multiplication végétative » *in vitro*, menée à bien grâce à une collaboration exemplaire entre l'ORSTOM et l'IRHO, doit permettre d'obtenir des plantations entièrement peuplées d'hybrides d'élite entraînant une amélioration de production avoisinant 20-25 p. 100.

INTRODUCTION

Le palmier à huile *Elaeis guineensis* est la plante oléagineuse dont le rendement est le plus élevé : 4 à 5 tonnes d'huile par hectare et par an sont couramment atteintes dans des conditions écologiques favorables où le potentiel des dernières variétés sélectionnées en cours de diffusion est estimé à 6-7 t. Il est originaire d'Afrique de l'Ouest, ses peuplements naturels sont exploités depuis très longtemps, sa culture a commencé avec ce siècle et s'est considérablement accélérée au cours des 20 dernières années en raison du déficit important en corps gras de la plupart des pays en voie de développement.

Ces progrès enregistrés en matière de productivité vont faire un nouveau bond en avant grâce à la mise en œuvre d'un procédé de « multiplication végétative » *in vitro* qui va permettre, par le choix d'individus d'élite, d'espérer atteindre des rendements de 20 à 25 p. 100 supérieurs à ceux déjà obtenus en conditions écologiques satisfaisantes.

AMÉLIORATION VARIÉTALE ET INTÉRÊT DU CLONAGE

Les variétés sélectionnées sont des hybrides composés de 100 p. 100 de palmiers *tenera* (fruits à coque mince) obtenus en croisant des palmiers *dura* (coque épaisse) avec des palmiers *pisifera* (fruits sans coque avortant généralement).

Ils sont sélectionnés en fonction de leur rendement mais également en fonction de la fluidité de leur huile (teneur élevée en acides gras insaturés), de leur faible croissance en hauteur (diminution des coûts de récolte et allongement de la durée d'exploitation) et, enfin, en fonction de facteurs de tolérance à quelques maladies.

Depuis 1957, le schéma de sélection de l'IRHO est une adaptation de la sélection récurrente réciproque (SRR).

Il exploite un fort effet d'hétérosis sur le rendement obtenu en croisant des arbres d'origines non apparentées et à caractéristiques complémentaires et fait appel à des essais

comparatifs de croisements pour déterminer les aptitudes à la combinaison pour les caractéristiques dont l'héritabilité est faible comme la production.

On peut résumer les résultats obtenus en 30 ans pour la production d'huile de palme dans des conditions écologiques moyennes de la façon suivante :

Hybrides	Huile de palme en tonnes par ha/an
Sélection normale	3,3
1 ^{er} cycle de SRR	3,9
2 ^e cycle de SRR	4,5
	(en début de vulgarisation)

Il faut y ajouter une augmentation moyenne de 10 p. 100 du pourcentage d'acides gras insaturés et une diminution moyenne de 20 p. 100 de la croissance en hauteur.

L'hybridation interspécifique avec le palmier à huile américain, qui a une huile fluide et une croissance en hauteur très faible, a été entreprise il y a une quinzaine d'années, et fait espérer une amélioration importante de ces deux caractères dans le futur.

Les croisements associant les caractères intéressants au meilleur niveau sont vulgarisés. Leur sélection est sévère puisque, sur 780 croisements testés au cours du premier cycle de sélection, 15 seulement ont été retenus.

Afin d'obtenir de grandes quantités de semences, on utilise des arbres-mères descendant des parents des croisements sélectionnés.

En Afrique, 6 millions environ de semences sont ainsi produites annuellement avec le label IRHO, ce qui assure la plantation de 20 000 ha.

Ces croisements entre individus hétérozygotes présentent une variabilité relativement importante pour de nombreux caractères, et en particulier le rendement.

La figure 1 illustre la distribution de la production d'huile des arbres d'un essai en Indonésie dans une excellente écologie : pour une moyenne de 44,3 kg d'huile de palme par arbre et par an (6,3 t/ha), la production varie de 21 à 77 kg, soit de 3 à 11 t/ha.

La vulgarisation des clones obtenus à partir des meilleurs arbres présente un intérêt évident.

L'exploitation de la variabilité entre arbres, associée à la possibilité de propager des génotypes particuliers, ouvre par ailleurs de nouvelles perspectives à la sélection : Les croisements entre palmiers exceptionnels et à caractères

(1) Cet article a paru également dans les « Cahiers des Ingénieurs Agronomes, INA-PG » (N° 328, déc. 84-janv. 85) ainsi que dans la Revue « Arts et Manufactures » (N° 362, déc. 1984).

(2) Directeur adjoint de la Division Sélection de l'IRHO-CIRAD (*).

(3) Directeur de la Division Sélection de l'IRHO-CIRAD (*).

(4) Chercheur IRHO, Laboratoire de Physiologie végétale ; Services scientifiques centraux de l'ORSTOM, 72-74, route d'Aulnay, 93140 Bondy (France).

(*) IRHO-CIRAD, B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex (France).

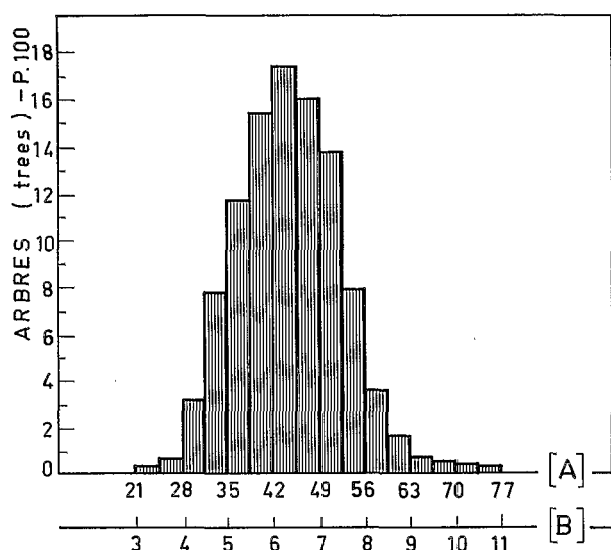


FIG. 1. — Distribution des productions d'huile de palme des arbres dans un essai (Distribution of palm oil production of trees in one trial). A : kg d'huile de palme/arbre/an (palm oil/tree/year), B : Equivalent (t/ha).

complémentaires en cours de plantation devraient donner des arbres cumulant les caractères des deux parents (recombinaison).

Leur vulgarisation sous forme de clones aura 15 ans d'avance sur un matériel obtenu par voie sexuée, ayant les mêmes performances.

Le schéma général d'amélioration n'est pas profondément modifié par cette technique, mais ses résultats sont valorisés et exploités plus rapidement.

Le cas de l'hybride interspécifique *E. melanococca* × *E. guineensis* est typique. Cet hybride présente une stérilité assez marquée et la création de croisements fertiles de bonne valeur agronomique nécessitera plusieurs générations.

En revanche, la propagation des quelques arbres fertiles intéressants, que l'étude de cette stérilité fait espérer (dès la première génération), fera gagner au moins 20 ans à la vulgarisation de ce matériel, estimé être le type idéal pour les plantations de palmiers à huile.

Ceci n'empêche pas que le programme de restauration de la fertilité au niveau des croisements reste nécessaire si l'on veut améliorer ce matériel et avoir des arbres plus performants à propager par voie végétative dans le futur.

LA TECHNIQUE DE MULTIPLICATION VÉGÉTATIVE

Dès 1970, l'IRHO s'est associé à l'ORSTOM pour la recherche d'une technique de multiplication végétative du palmier à huile par culture *in vitro*, car les techniques classiques de type bouturage, greffage ou marcottage ne sont pas applicables à cette plante qui possède un seul bourgeon végétatif, l'apex.

Différentes voies ont été prospectées : la multiplication *in vitro* à partir de l'apex fut un échec.

Les autres voies consistaient à provoquer la régénération de plantules à partir de cals provenant de différents fragments d'organes (racines, inflorescences, feuilles).

Finalement, en 1976, Rabechault et Martin ont obtenu les premières plantules en partant de tissus foliaires. Leur procédé a connu des améliorations successives.

Les explants d'initiation des cultures sont des fragments de jeunes feuilles non ouvertes ne nécessitant pas une désinfection poussée, toujours traumatisante.

Ce matériel est abondant, au moins 2 000 explants peuvent être obtenus en même temps sur un arbre sans affecter sa survie.

Après leur mise en culture en conditions stériles, les explants sont stockés durant 12 semaines dans des pièces de culture à atmosphère et éclairage contrôlés, certaines cellules se divisent et forment des cals qui apparaissent au niveau des nervures.

Le rendement de cette phase varie d'un arbre à l'autre en fonction de leur état physiologique et de différents autres facteurs. Actuellement 20 à 80 p. 100 des explants donnent des cals.

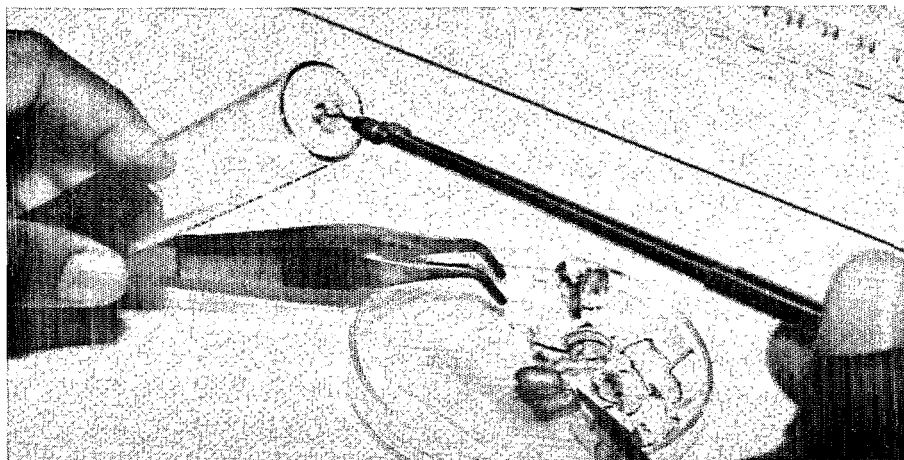
Les cals sont isolés et repiqués sur un autre milieu de culture favorable à l'organogenèse, puis stockés dans des pièces de culture (Fig. 2-3).

Après au moins 2 mois, parfois beaucoup plus, des structures organisées apparaissent sur certains cals, ce sont des embryons somatiques ou embryoïdes possédant un pôle caulinaire et un pôle racinaire.

L'apparition de ces embryoïdes est encore aléatoire ; peu de cals en produisent, mais la fréquence est relativement bonne pour l'ensemble des arbres en cours de clonage puisque 75 p. 100 d'entre eux ont donné des embryoïdes à la suite d'un seul prélèvement d'explants.

En 4 mois, ces embryoïdes repiqués sur un nouveau milieu de culture évoluent en plantules (Fig. 4) qui sont transférées en conditions normales de culture.

▼ FIG. 2. — Isolement des cals (Isolation of calluses).



Les plantules sont fragiles durant le premier mois après le transfert, mais leur taux de reprise est en général supérieur à 90 p. 100 (Fig. 5).

Bien que peu de cals portent des embryoïdes, le taux de multiplication est élevé parce que ces embryoïdes peuvent donner naissance à des embryoïdes secondaires.

Le taux de multiplication, qui varie suivant les clones, est voisin de 3 par mois (500 000 embryoïdes en un an à partir d'un seul) et peut être entretenu pendant plusieurs années (certaines cultures d'embryoïdes ont plus de 5 ans).

Au sein d'un massif d'embryoïdes, tous les stades de développement sont représentés. A chaque repiquage, les embryoïdes les plus âgés sont isolés, ils évolueront en plantules, les plus jeunes continueront à assurer la multiplication du clone.

Deux grandes phases se dégagent dans le processus :

— la création des clones comprenant la callogenèse et l'organogenèse, c'est-à-dire jusqu'à l'obtention des premiers embryoïdes, dont la durée moyenne est de 1 an. Ce travail est réalisé une fois pour un arbre et pour une période encore inconnue qui sera fonction de l'évolution des cultures d'embryoïdes dans le temps ;

— La production de plantules comprenant la multiplication des embryoïdes suivie de leur développement et du transfert en conditions normales de culture. Lorsque l'on a obtenu une certaine masse d'embryoïdes, le triplement de cette masse tous les mois assure une production de plantules qui ne demande que 4 mois de culture *in vitro* au laboratoire.

L'existence de ces deux phases a conduit à imaginer pour la diffusion des clones un circuit qui partirait de laboratoires situés sur les centres de recherches créant des clones de leurs meilleurs arbres et qui aboutirait à des unités industrielles recevant des embryoïdes, les multipliant et les élevant.

Le transport des embryoïdes sur de longues distances (France-Côte d'Ivoire et France-Malaisie ou Indonésie) a été réalisé plusieurs fois et ne pose pas de problème.

LA MISE EN ŒUVRE DE LA TECHNIQUE ET SES PROBLÈMES

Deux séries de problèmes devaient être résolus avant que la multiplication végétative puisse être utilisée, les premiers

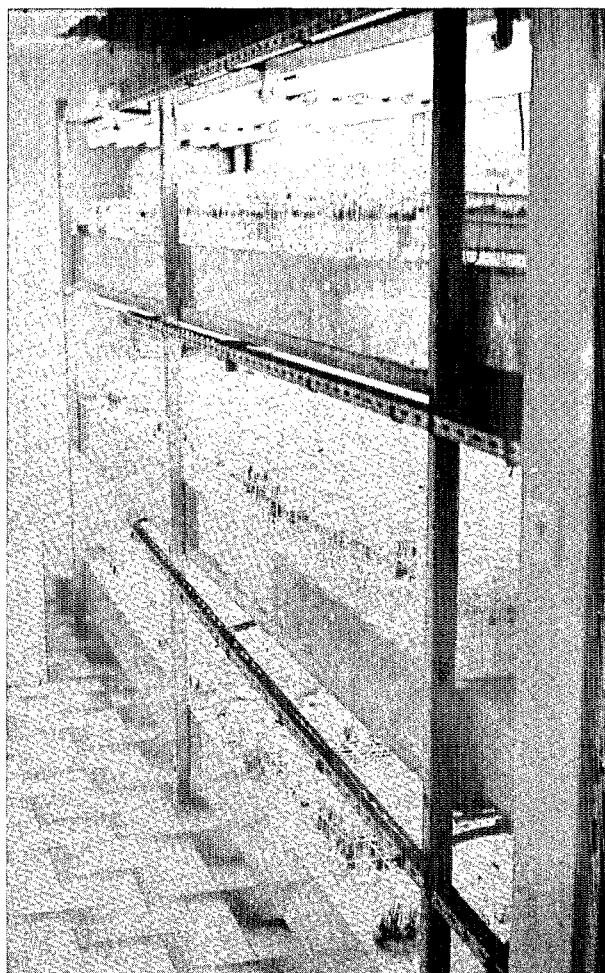


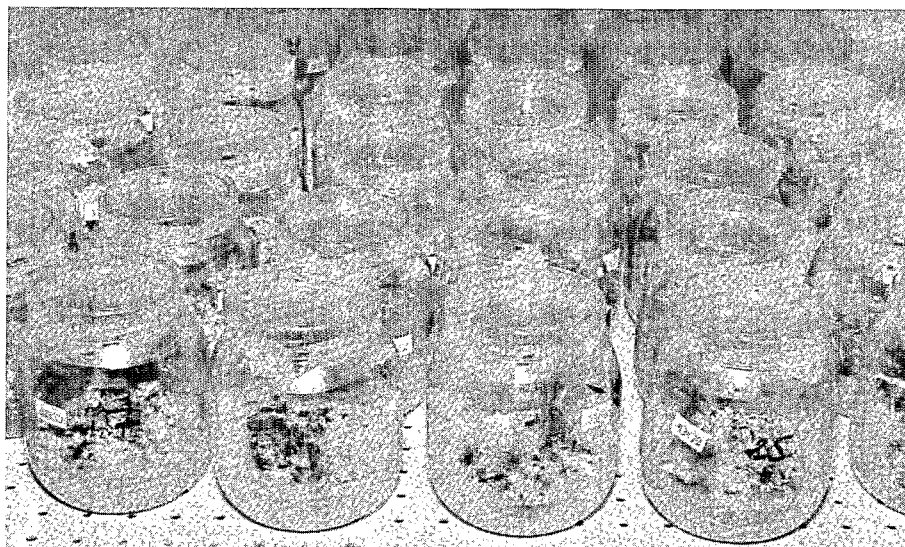
FIG. 3. — Salle de culture (Culture room).

propres à la technique, les seconds concernant les arbres à cloner et la valeur des clones :

Problèmes propres à la technique.

L'utilisation de la culture *in vitro* et plus particulièrement d'un processus d'embryogenèse somatique pour cloner des individus nécessite de vérifier que le procédé mis en œuvre est conservatif.

FIG. 4. — Embryogenèse adventive (Adventive embryogenesis).



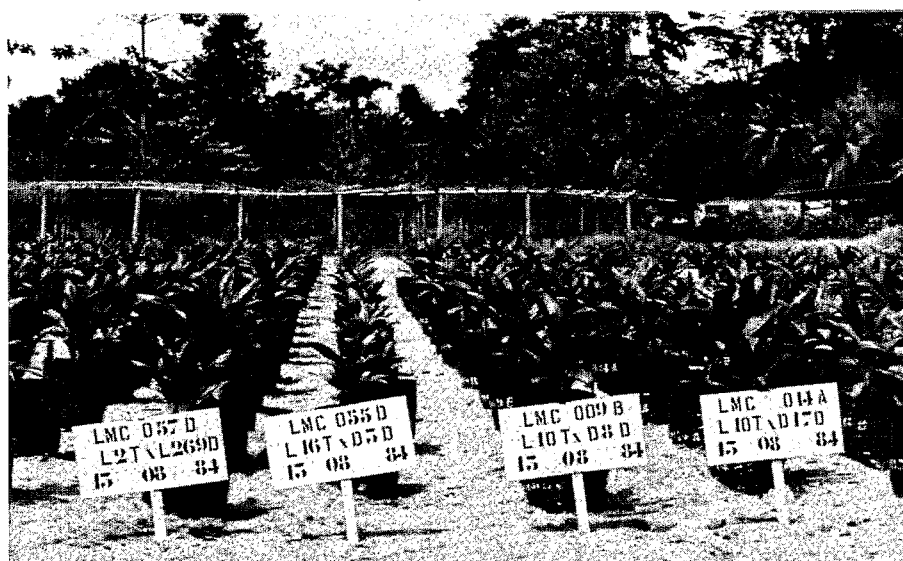


FIG. 5. — Pépinière
(Nursery).

En principe, le stock d'information héréditaire est gardé intact à l'issue d'un processus de multiplication végétative, mais le passage par un tissu dédifférencié (cal) entretenu sur des milieux de culture contenant des auxines peut induire des modifications irréversibles de structure ou de fonctionnement du patrimoine héréditaire.

D'autre part, la production économique de millions de vitro-plants demande l'adaptation de la technique de laboratoire aux contingences d'une unité industrielle.

Problèmes concernant les arbres à cloner et la valeur des clones.

Les caractères observés (phénotype) sont la résultante de deux influences simultanées : l'une, due à l'hérédité (génotype), se transmet intégralement au clone, l'autre, due à l'environnement, varie d'un individu à l'autre.

L'importance de l'influence de l'environnement, en particulier pour un caractère comme le rendement en huile, rend difficile le choix des arbres qui donneront les meilleurs clones.

Des études théoriques ont conduit à une méthode de choix. Il faut la vérifier en plantant des essais clonaux qui permettront en même temps de connaître les meilleurs clones.

Ces deux séries de problèmes sont imbriquées et justifiaient une production suffisante de vitro-plants de clones différents pour la plantation des essais, en utilisant une technique la plus fiable possible.

De 1976 à 1981, on a choisi de travailler presque exclusivement sur la technique : réduction du temps de culture pour chaque phase, diminution des doses de produits divers utilisés, amélioration du rendement, etc.

De nombreux essais ont été réalisés et jusqu'à 17 personnes ont participé aux recherches en France (ORSTOM, Bondy) pendant cette période.

En même temps, on a installé une unité pilote en Côte d'Ivoire, sur la Station de recherches de La Mé où il était possible de choisir des arbres intéressants à cloner et de planter des essais clonaux.

1 000 croisements en essais comparatifs y sont représentés par 50 000 arbres, dont l'observation individuelle de la production durant 7 années assure de larges possibilités de choix.

Les mises en culture ont commencé en mai 1981 avec un programme de création de 50 clones par an. Les premiers

essais ont été plantés en 1983 et une production de 50 000 vitro-plants par an est maintenant possible.

Des solutions techniques originales ont été trouvées car il n'existait pas, à notre connaissance, de laboratoire de cette importance dans des pays tropicaux humides où les risques de contamination sont beaucoup plus importants que sous un climat tempéré.

Les 250 m² de cette unité sont à atmosphère contrôlée et divisés en 2 zones en fonction de l'asepsie ; la filtration de l'air est plus fine dans les salles de repiquage et de culture que dans celles de préparation des milieux et de stérilisation.

Des essais de simulation de production industrielle ont été réalisés : rendement du personnel, conditionnement des cultures, optimisation du rendement et du coût de chaque étape, essais d'appareillages, etc.

Tous les problèmes ne sont pas résolus, mais un schéma de production industrielle a été établi et permet de déterminer pour une production donnée de vitro-plants les caractéristiques techniques d'une unité industrielle comprenant, outre les installations, le personnel et les bases de calcul du coût de fonctionnement.

Le transfert des vitro-plants aux conditions habituelles de culture est facilement résolu quand il s'adresse à de petits lots qui peuvent être minutieusement suivis et pour lesquels les problèmes économiques ne sont pas pris en compte. Dans ces conditions, le taux de réussite est voisin de 100 p. 100.

L'adaptation de la technique à des lots industriels est en cours et nécessite en particulier la mise au point d'installations adéquates (serres ou châssis dans une première étape, suivie d'un séjour dans une prépépinière classique ombrée avec un bon système d'arrosage type brumisation).

LE RÉSEAU INTERNATIONAL DE VULGARISATION DE LA TECHNIQUE

Le milieu professionnel, centres de recherches et sociétés de plantation, s'est intéressé à la vulgarisation de la technique de multiplication végétative dès la production des premières plantules en 1976.

L'ORSTOM et l'IRHO se sont retrouvés face à la con-

currence d'Unilever dont une équipe de recherche avait obtenu des résultats voisins la même année.

La politique adoptée a été fondamentalement différente : Unilever a installé ses propres unités de production en Malaisie et en Grande-Bretagne alors que l'ORSTOM et l'IRHO ont recherché des accords avec le milieu professionnel.

Ces accords prévoient un transfert de savoir-faire avec clauses d'exclusivité et de secret compensées par un taux de redevance sur les plantules produites avec un minimum garanti.

Le transfert de savoir-faire comporte l'installation de l'unité de production, la formation du personnel qui, de plus, est informé de toute nouvelle amélioration du procédé et l'assistance technique lorsqu'elle s'avère nécessaire. De plus les améliorations obtenues par un laboratoire sont transférables aux autres laboratoires du réseau. Chaque unité reste propriétaire de ses clones et peut négocier leur utilisation.

La vulgarisation du procédé n'étant pas terminée, les premiers accords ont été passés avec des sociétés de plantation qui, ayant un centre de recherches, avaient intérêt à créer des clones avec leurs meilleurs arbres pour les tester.

Le premier accord a été signé avec le FELDA (Federal Land Development Authority) qui est une société d'Etat de Malaisie regroupant 350 000 ha de plantations de palmiers à huile appartenant à environ 80 000 planteurs associés dans un système coopératif. Cette société représente le plus grand complexe mondial de plantations de palmiers à huile et participe pour environ 20 p. 100 à la production mondiale d'huile de palme.

Un chercheur du FELDA a été formé et les premières mises en culture réalisées en septembre 1983, à partir d'arbres-mères choisis sur la Station de Tun Razak, ont déjà permis 9 mois plus tard la création de 10 clones.

Une unité industrielle est en cours de finition à Kuala Lumpur ; sa surface est de 1 300 m² et sa capacité annuelle est de 1 million de plantules avec la création de 100 clones. A terme, cette unité sera amenée à produire surtout des embryoides pour d'autres unités qui assureront leur développement en plantules, les besoins du FELDA étant de l'ordre de 3,5 millions de vitro-plants par an pour assurer son programme de replantation.

En Indonésie, deux accords ont été passés, l'un avec une société de plantation mixte, la SOCFINDO, qui a 35 000 ha de palmiers à huile, et l'autre avec la Compagnie Nationale des Plantations gouvernementales, P.N.P., qui a 250 000 ha de palmiers plantés et un programme de développement de 450 000 ha.

L'unité de la SOCFINDO est opérationnelle depuis novembre 1983 et sa capacité, qui est de 150 000 plantules par an, avec la création de 20 clones, peut être portée à 600 000 plantules par l'adjonction de pièces de culture.

L'unité des P.N.P. est en cours de construction à la Marihat Research Station et aura une capacité annuelle en première phase de 250 000 plantules et de 100 clones, pouvant être portée à 2 millions de vitro-plants (1 600 m²).

Comme l'unité du FELDA, celle des P.N.P. produira, à terme, surtout des embryoides destinés à plusieurs unités car leurs besoins sont estimés à 7-8 millions de plantules par an.

D'autres accords similaires sont en préparation ou en négociation pour l'Amérique du Sud et pour l'Extrême-Orient. Dans les pays d'Afrique où la France a des accords particuliers de coopération, les clauses sont limitées à l'exclusivité et au secret des conventions.

Parallèlement à ces réseaux de laboratoires, un réseau d'essais clonaux et semi-industriels est en cours de création pour tester les clones dans différentes écologies et promouvoir le matériel clonal auprès des professionnels qui ne peuvent envisager pour le moment l'installation d'une unité de production.

Les mêmes essais seront plantés dans 6 pays d'Afrique, d'Amérique du Sud et d'Asie du Sud-Est. Des plants obtenus par voie sexuée et correspondant au meilleur matériel sélectionné sont utilisés comme témoins.

Les 30 à 40 000 vitro-plants nécessaires à ces essais sont produits par l'Unité pilote de Côte d'Ivoire et leur sevrage est réalisé en France pour des raisons phytosanitaires.

On a pour le moment choisi de fournir des vitro-plants après leur transfert en conditions naturelles car ce transfert nécessite des installations particulières et une certaine expérience.

Les essais clonaux plantés permettront de vérifier la conformité de la reproduction par culture *in vitro* en 1990.

De nombreux indices militent en faveur d'une reproduction conforme :

- les anomalies sur les vitro-plants sont exceptionnelles ;
- les stocks chromosomiques ne sont pas modifiés ;
- les premières inflorescences des jeunes clones sont normales ainsi que leur aspect végétatif, etc.

Il est cependant nécessaire de poursuivre l'expérimentation pour s'assurer que les caractéristiques agronomiques intéressantes des arbres clonés sont conservées intactes dans les clones.

La production commerciale de vitro-plants devrait donc commencer en 1991, en s'amplifiant à mesure que l'on disposera de nouveaux clones testés dans les essais comparatifs.

Les perspectives de commercialisation des vitro-plants sont bonnes en raison de l'augmentation de production attendue et de la durée d'exploitation des arbres.

Le prix de vente des vitro-plants, variable selon la rémunération du personnel local, est estimé entre 5 et 10 fois celui des semences, mais cette augmentation est couverte en 3 ans au plus par une amélioration de 20 p. 100 de la production en conditions écologiques moyennes.

La protection du procédé de multiplication et des clones est difficile à assurer en raison de l'absence de législations nationales ou internationales efficaces. Le procédé ORSTOM-IRHO a été breveté dans plusieurs pays.

Les clones diffusés pour les essais sont protégés par un contrat et les organismes recevant ces clones sont choisis.

Cette pratique ne sera pas possible pour du matériel à vulgarisation mondiale et on devra rechercher d'autres solutions dont, par exemple, la vulgarisation de mélanges de clones à caractéristiques voisines et surtout la création de clones plus performants.

Bien que la diffusion de clones constitue actuellement l'objectif principal de la culture *in vitro* pour le palmier à huile, d'autres applications font l'objet de recherches ou de projets.

La cryoconservation d'embryoides en cours d'étude donne déjà de bons résultats et permettra la constitution de collections (vitrothèque) difficiles à réaliser en champ pour une plante encombrante comme le palmier à huile.

La régénération de plantules à partir de protoplastes est également abordée dans le cadre d'un vaste projet devant aboutir au transfert de gènes *in vitro*.

Ces programmes devraient recevoir un support financier important nécessaire à leur développement au cours de la décennie qui vient grâce aux redevances sur les ventes de vitro-plants.

Le programme de multiplication végétative du palmier à huile a été mené à bien grâce à une collaboration exemplaire entre l'ORSTOM, qui disposait de chercheurs et de laboratoires, et l'IRHO qui pouvait assurer les phases expérimentale et industrielle par son implantation dans des centres de recherches et par sa connaissance des milieux professionnels.

SUMMARY

Oil palm production through *in vitro* culture.

J. M. NOIRET, J. P. GASCON, C. PANNETIER, *Oléagineux*, 1985, 40, N° 7, p. 365-372.

Oil palm breeding has gone through various phases which have made it possible to move from the spontaneous palm (99 p. 100 *dura* palms with thick shells) to selected palms (100 p. 100 *tenera* hybrid palms with thin shells) and from a yield of 500-600 kg oil/ha to a potential yield of 6 to 7 tonnes. Application of the *in vitro* « vegetative propagation » process, whose success is due to exemplary collaboration between ORSTOM and the IRHO, should make it possible to obtain plantations consisting entirely of elite hybrids, bringing about a 20-25 p. 100 improvement in production.

RESUMEN

Producción de palma africana por cultivo *in vitro*.

J. M. NOIRET, J. P. GASCON, C. PANNETIER, *Oléagineux*, 1985, 40, N° 7, p. 365-372.

El mejoramiento de la palma africana ha pasado por varias etapas, desde la palma espontánea (en la que el 99 p. 100 de las palmas son *dura* de cáscara espesa) hasta la palma mejorada (en la que el 100 p. 100 de las palmas son híbridos *tenera* de cáscara delgada), y desde un rendimiento de 500 a 600 kg de aceite/ha hasta un rendimiento potencial de 6 a 7 toneladas. La aplicación del procedimiento de « Propagación Vegetativa » *in vitro*, que ha sido posible mediante una colaboración ejemplar entre el ORSTOM y el IRHO, debe permitir que se obtengan plantaciones totalmente formadas por híbridos élite, obteniéndose así una mejora de la producción de poco más a menos 20 a 25 p. 100.

Oil palm production through *in vitro* culture (1)

J. M. NOIRET (2), J. P. GASCON (3), C. PANNETIER (4)

INTRODUCTION

The oil palm *Elaeis guineensis* is the oil producing plant with the highest yield : a rate of 4 to 5 t/ha/yr is frequently reached under favourable ecological conditions, where the potential of the latest selected varieties being distributed is estimated at 6 to 7 tonnes. It originates from West Africa and its natural populations have been exploited for a very long time ; cultivation of the oil palm began this century and has been considerably accelerated over the last 20 years due to the serious shortage of oils and fats in most of the developing countries.

The progress made in terms of productivity is going to take another leap forward with the implementation of the *in vitro* vegetative propagation process, which will provide the hope of obtaining yields 20-25 p. 100 greater than those already obtained under satisfactory ecological conditions, through the breeding of elite individuals.

VARIETAL IMPROVEMENT AND THE ADVANTAGES OF CLONING

The varieties selected are hybrids composed of 100 p. 100 *tenera* oil palms (fruits with thin shell) obtained by crossing *dura* oil

palms (thick shell) with *pisifera* oil palms (fruits without shell, usually aborting).

They are selected for their yield, but also for the fluidity of their oil (high unsaturated fatty acid content), for their limited vertical growth (reduced harvesting costs and lengthening of exploitation period) and finally, according to their tolerance factors with respect to certain diseases.

Since 1957, the IRHO selection scheme has been an adaptation of Recurrent Reciprocal Selection (RRS).

It exploits a strong heterosis effect on yield obtained by crossing trees of non-related origins and with complementary characteristics and makes use of comparative tests of crosses to determine combining ability for characteristics whose heritability is low, like production.

The results obtained over 30 years for the production of palm oil under average ecological conditions can be summarized as follows :

Hybrids	Palm oil in t/ha/yr
Normal selection	3.3
1st RRS cycle	3.9
2nd RRS cycle	4.5
	(at start of extension)

To this should be added an average increase of 10 p. 100 in the percentage of unsaturated fatty acids and an average reduction of 20 p. 100 for vertical growth.

Interspecific hybridization with the American oil palm, which has very fluid oil and very low vertical growth rate, was undertaken about fifteen years ago and provides hope for considerable improvement of these two characters in the future.

The crosses associating desirable characters at the best level undergo extension. Selection is strict, since, out of 780 crosses tested during the first culling cycle, only 15 were adopted.

To obtain large quantities of seeds, mother-trees descended from the parents of the selected crosses are used.

(1) This article has also appeared in the « Cahiers des Ingénieurs Agronomes, INA-PG » (No. 328, Dec. 84-Jan. 85) and in the « Arts et Manufactures » review (No. 362, Dec. 1984).

(2) Assistant Director of the IRHO-CIRAD Selection Division (*).

(3) Director of the IRHO-CIRAD Selection Division (*).

(4) IRHO Research Worker, Laboratoire de Physiologie végétale ; Services scientifiques centraux de l'ORSTOM, 72-74, route d'Aulnay, Bondy (France).

(*) IRHO-CIRAD, B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex (France).

In Africa, approximately 6 million seeds bearing the IRHO label are produced annually in this way, thereby ensuring the planting of 20,000 ha.

These crosses between heterozygous individuals reveal fairly considerable variability for numerous characters, particularly yield.

Figure 1 gives the distribution for oil production from trees in a trial in Indonesia under excellent ecological conditions: for an average production of 44.3 kg of palm oil/tree/yr (6.3 t/ha), production varies from 21 to 77 kg, i.e. from 3 to 11 t/ha.

Extension of clones obtained from the better trees offers obvious advantages.

Furthermore, exploitation of the variability between trees, combined with the possibility of propagating particular genotypes, opens up new perspectives for breeding: Crosses between exceptional oil palms with complementary characters during planting should give trees which cumulate the characters of the two parents (recombination).

Their extension in the form of clones will have an advance of 15 years over material with the same performance but obtained via the sexed method.

The general improvement scheme is not profoundly changed by this technique, but its results are valorized and exploited more rapidly.

A typical case is the interspecific hybrid *E. melanococca* × *E. guineensis*. This hybrid presents quite considerable sterility and it will take several generations to create fertile crosses of high agronomical value.

On the other hand, the propagation of the few trees of interest, hope for which (from the first generation) has been provided by the study of this sterility, will advance the extension of this material, which is considered the ideal type for oil palm plantations, by 20 yrs.

Nonetheless, the fertility restoration programme still remains necessary at cross level if this material is to be improved so as to provide trees with greater performance for vegetative propagation in the future.

VEGETATIVE PROPAGATION TECHNIQUE

Since 1970, the IRHO, in collaboration with ORSTOM, has been involved in researching an oil palm vegetative propagation technique by *in vitro* culture, since standard techniques such as cuttings, grafts or layering cannot be applied to this plant, which only has one vegetative bud, the apex.

Different processes were investigated: *in vitro* propagation from the apex was a failure.

The other methods consisted in causing the regeneration of plantlets obtained from calluses coming from fragments of different organs (roots, inflorescences, leaves).

Finally, in 1976, Rabéchault and Martin obtained the first plantlets from leaf tissue. Their procedure has undergone successive improvements.

The explants for the initiation of cultures are the fragments of unopened young leaves not requiring thorough disinfection, which is always traumatic.

This material is abundant and at least 2,000 explants can be obtained from one tree at the same time, without endangering its survival.

After being cultured in sterile conditions, the explants are stored for 12 weeks in culture rooms with controlled atmosphere and lighting; certain cells divide to form calluses which appear along veins.

Yield for this phase varies from tree to tree depending on their physiological state and various other factors. At present, between 20 and 80 p. 100 of explants produce calluses.

The calluses are isolated and transferred to another culture medium which favours organogenesis, then stored in the culture rooms (Fig. 2, 3). After at least 2 months, though sometimes much longer, organized structures appear on certain calluses; these are somatic embryoids having a cauline pole and a root pole.

Apparition of these embryoids remains random; few calluses produce them, but the frequency is relatively good for all the trees being cloned, since 75 p. 100 of them have given embryoids after a single sampling of explants.

Once transferred to a new culture medium, these embryoids develop into plantlets within 4 months (Fig. 4) and are then transferred to normal growing conditions.

The plantlets are fragile for the first month after transfer, but their rate of striking is normally greater than 90 p. 100 (Fig. 5).

Although few calluses bear embryoids, the propagation rate is high because these embryoids can give rise to secondary embryoids.

The propagation rate, which varies depending on the clones, is close to 3 per month (500,000 embryoids in a year from a single clone) and can be maintained for several years (certain embryoid cultures are more than 5 years old).

At the heart of a mass of embryoids, all the stages of development are represented. On each transfer, the oldest embryoids are isolated and they develop into plantlets; the younger embryoids continue to ensure the propagation of the clone.

The process can be divided into two major phases:

- the creation of clones including callogenesis and organogenesis, i.e. up to when the first embryoids are obtained, which takes a year on average. This work is carried out once for a tree and for a period which is still unknown, which depends on the development of the embryoid cultures as time goes on;

- the production of plantlets, including the multiplication of embryoids followed by their development and transfer to normal crop conditions. Once a certain mass of embryoids has been obtained, tripling of this mass every month ensures the production of plantlets which require only 4 months' *in vitro* culture in the laboratory.

In view of the existence of these two phases, one can imagine a distribution circuit for clones, which would start at the laboratories in the research centres creating clones of their best trees and would finish at commercial units receiving the embryoids for propagation and breeding.

Transportation of embryoids over long distances (France-Ivory Coast and France-Malaysia or Indonesia) has taken place several times and poses no problems.

IMPLEMENTATION OF THE TECHNIQUE AND THE PROBLEMS INVOLVED

Two sets of problems had to be solved before it was possible to use vegetative propagation techniques: the first set concerned the actual technique and the second set the trees to be cloned and the value of the clones.

Problems concerning the actual technique.

The use of *in vitro* culture and, more particularly, of a somatic embryogenesis process for the cloning of individuals means checking that the process used is conservative.

In principle, the stock of hereditary information remains intact after a vegetative propagation process, but passage through the stage of dedifferentiated tissue (callus) maintained on culture media containing auxins can induce irreversible modifications to structure or to the functioning of inheritance.

Furthermore, the economical production of millions of vitro-plants requires laboratory techniques to be adapted to the contingencies of a commercial unit.

Problems concerning the trees to be cloned and the value of the clones.

The characters observed (phenotype) are the resultant of two simultaneous influences: one, due to heredity (genotype), is integrally transmitted to the clone, the other, due to the environment, varies from one individual to the next.

The importance of environmental influence, particularly for a character such as oil yield, makes it difficult to choose the trees which will give the best clones.

Theoretical studies have come up with a selection method. This method is to be checked on planting clone trials which will eventually enable the best clones to be known.

These two sets of problems overlap and justified a sufficient production of vitro-plants from different clones for the planting of trials, using as reliable a technique as possible.

From 1976 to 1981 preference was given almost exclusively to working on the technique, involving: reduction of culture time for each phase, reduction of the rates of the various products used, improvement of yield, etc.

Numerous trials were carried out and up to 17 people were involved in research in France (ORSTOM, Bondy) during this period.

At the same time, a pilot unit was set up in the Ivory Coast on the La Mé Research Station where it was possible to select trees suitable for cloning and to plant clonal trials.

At La Mé, 1,000 crosses in comparative trials are represented by 50,000 trees; observation of the production of each tree over 7 years ensures a wide possibility of choices.

Culturing began in May 1981, with a programme for the creation of 50 clones a year. The first trials were planted in 1983 and the production of 50,000 vitro-plants per year is now possible.

Original technical solutions have been found, since, to our knowledge, no laboratory of this importance existed in the countries of the humid tropics, where the risks of contamination are much greater than in a temperate climate.

The 250 m² of this unit have a controlled atmosphere and are divided into 2 zones according to aseptic conditions; air filtration is finer in the transfer and culture rooms than in the medium preparation and sterilization rooms.

Commercial production simulation trials were carried out: personnel output, conditioning of cultures, optimization of yield and of the cost of each phase, equipment tests, etc.

Not all the problems have been solved, but a commercial production scheme has been drawn up making it possible to determine, for a given production of vitro-plants, the technical characteristics of a commercial unit, including, in addition to the installations, the personnel required and the basis for calculating operating costs.

The transfer of vitro-plants to normal crop conditions is simple when it involves small batches which can be monitored closely and for which economic factors are not taken into account. Under these conditions, the success rate approaches 100 p. 100.

Adaptation of the technique to commercial size batches is underway and particularly requires the development of adequate facilities (greenhouses or hot beds initially, followed by a period in a standard, shaded prenursery with a good mist spray type watering system).

THE INTERNATIONAL NETWORK FOR EXTENSION OF THE TECHNIQUE

Right from the production of the first plantlets in 1976, the professionals, research centres and plantation companies expressed interest in the extension of the vegetative propagation technique.

ORSTOM and the IRHO found themselves in competition with a Unilever research team which obtained similar results the same year.

The policies adopted were fundamentally different: Unilever set up its own production units in Malaysia and Great Britain, whilst ORSTOM and the IRHO sought out agreements in the professional field.

These agreements proposed a transfer of know-how, with exclusivity and secrecy clauses compensated by royalties for the plantlets produced with a minimum guarantee.

The transfer of know-how comprises the installation of the production unit, training of personnel, who are also informed of any new improvements made to the process, and technical assistance wherever it proves necessary. Furthermore, the advances made by a given laboratory are transferrable to the other laboratories in the network. Each unit remains the owner of its clones and can negotiate their use.

Before extension of the process was complete, the first agreements were signed with Plantation Companies who had their own research centres and were therefore interested in creating clones from their best trees for testing.

The first agreement was signed with FELDA (Federal Land Development Authority) which is a Malaysian state company covering 350,000 ha of oil palm plantations belonging to approximately 80,000 planters associated under a cooperative system. This company forms the largest oil palm plantation complex in the world and produces approximately 20 p. 100 of the world's palm oil.

A FELDA researcher was trained and the first culturing operations, carried out in 1983 using mother-trees selected on the Tun Razak station, resulted in the creation of the first 10 clones 9 months later.

A commercial unit is nearing completion in Kuala Lumpur: it has a surface area of 1,300 m² and an annual capacity of 1 million plantlets with the creation of 100 clones. In time, this unit will be especially geared to the production of embryoids for other units which will ensure their development into plantlets; FELDA's requirements are around 3.5 million vitro-plants per year to ensure its replantation programme.

In Indonesia, two agreements were signed; one with SOCFINDO, a mixed plantation company, which has 35,000 ha of oil palms and the other with the National Governmental Plantations Company, PNP, which has 250,000 ha of oil palms planted and a development programme involving 450,000 ha.

The SOCFINDO unit has been operational since November 1983 and its capacity of 150,000 plantlets per year with the creation of 20 clones can be extended to 600,000 plantlets by the addition of culture rooms.

The PNP unit is under construction at the Marihat Research Station and will have, in the initial phase, a capacity of 250,000 plantlets and 100 clones, with the possibility of extension to 2 million vitro-plants (1,600 m²).

Similarly to the FELDA unit, the PNP unit will eventually produce mostly embryoids intended for several units, as their requirements are estimated at 7 to 8 million plants per year.

Other similar agreements are being prepared or negotiated for South America and the Far East. In African countries where France has particular cooperation agreements, clauses are limited to the exclusivity and secrecy of conventions.

In conjunction with these laboratory networks, a network of clonal and semi-commercial trials is being created for testing the clones under different ecological conditions and for promoting the clonal material in professional circles where it is not yet possible to envisage the installation of a production unit.

The same trials have been planted in six countries in Africa, South America and South-East Asia. Seedlings obtained by the sexed method and corresponding to the best breeding material are used as a control.

The 30,000 to 40,000 vitro-plants required for these are produced by the pilot unit in the Ivory Coast and weaned in France for phytosanitary reasons.

It has been decided for the time being, to supply vitro-plants after their transfer to natural growing conditions, as the transfer requires special installations and a certain amount of experience.

The clonal trials which have been planted will make it possible to check reproduction conformity through *in vitro* culture in 1990.

Numerous indicators tell in favour of conform reproduction:

- vitro-plant anomalies are exceptional;
- chromosomal stocks are not modified;
- the first inflorescences of young clones are normal, as is their vegetative appearance, etc.

Nonetheless, it is necessary to continue experiments to ensure that the desirable agronomical characteristics of the cloned trees are conserved intact in the clones.

The commercial production of vitro-plants should therefore commence in 1991, increasing as new clones tested in the comparative trials become available.

The prospects for marketing vitro-plants are good, due to the increase in production expected and the length of time the trees can be exploited.

The selling price for vitro-plants, which varies according to the wages paid to local personnel, is estimated to be 5 to 10 times greater than that for seed, but this increase is cancelled out after 3 years through a 20 p. 100 improvement in production under average ecological conditions.

Protection of the propagation process and of clones is difficult to ensure due to the lack of effective national or international legislation. The ORSTOM-IRHO process has been patented in several countries.

The clones distributed for trials are protected by contracts and the organizations receiving them are carefully selected.

This practice will not be possible for the worldwide extension of material and other solutions will have to be sought, including, for example, the extension of clone mixes with similar characteristics, and, in particular, the creation of clones with higher performance capabilities.

Although, at present, the distribution of clones is the main objective of oil palm *in vitro* culture, research and projects are being carried out for other applications.

Studies being made of the cryoconservation of embryoids are already giving good results and will make it possible to obtain collections (vitro-banks), which is difficult in the field for a bulky plant such as the oil palm.

The regeneration of plantlets from protoplasts is also being approached in a vast project designed to obtain the transfer of genes *in vitro*.

These programmes should receive the considerable financial backing they require for development over the next decade through royalties from the sale of vitro-plants.

The success of the oil palm vegetative propagation programme is due to exemplary collaboration between ORSTOM, with its researchers and laboratories and the IRHO, which was able to ensure the experimental and commercial phases through its presence in the research centres required and its knowledge of the professional milieu. □