

# Intérêt de la cryoconservation des organes végétaux: cas des embryons somatiques de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.)

F. Engelmann

ORSTOM (Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération),  
BP 5045, 34032 Montpellier cedex, France

Received 10 February 1989; accepted 2 May 1989

Résumé: Les techniques de cryoconservation (stockage à la température de l'azote liquide, -196°C) permettent d'assurer le maintien des caractéristiques génétiques des espèces pendant une durée théoriquement infinie. Le palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) est multiplié *in vitro* à grande échelle par embryogenèse adventive. Une technique simple de cryoconservation des embryons somatiques a été mise au point et appliquée à 25 clones différents. Des embryoides de deux clones ont été conservés respectivement 12 et 15 mois dans l'azote liquide, sans modification du taux de reprise après leur réchauffement. Des vitroplants issus de deux clones cryoconservés sont actuellement en plantation; leur développement est conforme jusqu'à présent. Ces résultats permettent d'envisager, dans un proche avenir, l'utilisation de ce procédé pour la conservation des clones d'embryoïdes existant dans les laboratoires qui produisent des vitroplants de palmier à huile à l'échelle industrielle.

(Mots clés: conservation des ressources génétiques; cryoconservation; palmier à huile; embryons somatiques)

## Cryopreservation of plant organs: oil palm somatic embryos (*Elaeis guineensis* Jacq.)

Cryopreservation techniques (i.e. storage at the temperature of liquid nitrogen, -196°C) can ensure the preservation of the genetic characteristics of a species for a theoretically unlimited time. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) is vegetatively propagated *in vitro* on a large scale using adventive embryogenesis. A simple oil palm somatic embryo cryopreservation technique has been developed and applied to 25 clones. Embryoids of two clones were stored, respectively, for 12 and 15 months in liquid nitrogen, without noticeable changes in their recovery rate after thawing. Plantlets originating from two clones which were cryopreserved are now growing in field. So far their development is normal. These results provide hope that in the near future this process can be applied to the long-term storage of embryoid strains from laboratories producing oil palm plantlets on an industrial scale.

(Keywords: germplasm storage; storage; cryopreservation, oil palm; somatic embryos)

Pour de nombreuses espèces végétales, les semences représentent le moyen de conservation habituel. Il s'agit, en effet, d'organes fortement déshydratés qui, pour cette raison, survivent longtemps à de basses températures; de telles semences sont qualifiées d'orthodoxes. En revanche, les semences dites récalcitrantes d'autres espèces, qui ne supportent pas une déshydratation importante et qui, par conséquent, ne tolèrent pas des températures négatives, ne survivent que peu de temps. Parmi ces espèces, dont les semences ont une durée de vie qui ne peut excéder quelques jours à quelques mois, on trouve des représentants de groupes très divers (arbres fruitiers, plantes à action stimulante, à huiles, à épices, forestières, horticoles, médicinales, etc.); beaucoup d'entre elles ont une grande importance économique<sup>1</sup>. D'autres espèces, enfin, comme la pomme de terre, l'igname, le manioc ou la patate douce, ne sont multipliées que par voie végétative, ce qui rend impossible leur conservation à long terme. Le maintien des différents génotypes doit être assuré sous forme de collections en champs à la fois pour les espèces à semences récalcitrantes et pour les espèces à reproduction par voie végétative. Il nécessite l'utilisation de surfaces importantes et un entretien coûteux: de plus, il laisse le matériel végétal exposé à tous les risques inhérents à la culture en conditions naturelles.

L'utilisation des techniques de la culture *in vitro* pour la conservation des espèces propagées végétativement ou à semences récalcitrantes présente de grands avantages du fait de la miniaturisation des explants et de leur entretien en conditions aseptiques. Cependant, le maintien, pendant plusieurs années, de matériel végétal grâce à la culture *in vitro* présente des risques pour la stabilité génétique, pouvant conduire à une perte de la conformité des plantes régénérées par rapport à l'individu de départ<sup>2,3,4</sup>. De plus, les cultures nécessitent des repiquages réguliers et ne sont pas complètement à l'abri des contaminations.

La seule méthode susceptible d'assurer le maintien des caractéristiques des cultures et de permettre leur stockage dans un faible volume et à l'abri des contaminations, avec un entretien réduit, est la cryoconservation, c'est-à-dire la conservation à très basse température, généralement celle de l'azote liquide (-196°C). A cette température, en effet, les divisions cellulaires sont arrêtées et tous les processus métaboliques sont bloqués sans être altérés. Le matériel végétal peut donc être conservé sans altération ni modification pendant une durée théoriquement infinie<sup>5</sup>.

Un procédé de cryoconservation comporte plusieurs étapes successives qui doivent être correctement adaptées à chaque matériel:

D 4 AVR. 1990

ORSTOM Fonds Documentaire

N° : 27.819 ext

Cote : B M

III P4

1. le prétraitement consiste en une culture du matériel en présence de substances cryoprotectrices;
2. la congélation peut être effectuée par immersion directe dans l'azote liquide ou comporter deux étapes (refroidissement programmé jusqu'à  $-40$  à  $-100^{\circ}\text{C}$ , suivi d'une immersion des échantillons dans l'azote liquide);
3. le réchauffement est généralement rapide;
4. le post-traitement correspond à la culture du matériel dans des conditions favorisant la reprise de sa croissance.

La cryoconservation a été réalisée avec plus de 70 espèces végétales, sous des formes diverses: suspensions cellulaires, cals, méristèmes, embryons somatiques, polliniques ou zygotiques<sup>6</sup>. Toutefois, le passage de la mise au point d'une méthode de cryoconservation à son utilisation dans le procédé de multiplication *in vitro* d'une espèce donnée reste encore exceptionnel. Il est en cours de réalisation dans le cas du palmier à huile.

### Importance économique du palmier à huile

Le palmier à huile est la plante oléagineuse dont le rendement est le plus élevé. Des productions de 4-5 tonnes d'huile par hectare et par an sont couramment atteintes dans des conditions écologiques favorables et le potentiel des dernières variétés sélectionnées est estimé à 6-7 tonnes<sup>7</sup>.

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 en corps gras de la plupart des pays en développement. De 1960-1984, la production mondiale d'huile de palme est passée de 1,5-6,3 millions de tonnes, soit 44% de la production totale des plantes oléagineuses. Les principaux pays producteurs sont la Malaisie, l'Indonésie, le Nigéria et la Côte d'Ivoire.

Le fruit produit deux types d'huiles: l'huile de palme et l'huile de palmiste. L'huile de palme est extraite de la pulpe du fruit. C'est une huile concrète composée essentiellement de triglycérides, dont 50% des acides gras sont insaturés. Elle est utilisée principalement comme huile de table mais également pour la fabrication de margarines, de biscuits, de détergents ainsi qu'en savonnerie. L'huile de palmiste, extraite de l'amande, est particulièrement riche en acides laurique et myristique, ce qui explique son utilisation en savonnerie et cosmétologie, en raison des propriétés moussantes de ces substances.

### Multiplication *in vitro* du palmier à huile

Dès 1970, l'Institut de Recherches pour les Huiles et Oléagineux (IRHO) s'est associé avec l'Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération (ORSTOM) pour la recherche d'une méthode de multiplication végétative du palmier à huile par culture *in vitro*. En effet, les techniques classiques de type bouturage, greffage ou marcottage ne sont pas applicables à cette plante qui possède un seul bourgeon végétatif, l'apex. Le palmier à huile ne se reproduit donc naturellement que par voie sexuée et le caractère allogame strict de cette espèce entraîne une variabilité très importante dans la descendance des croisements.

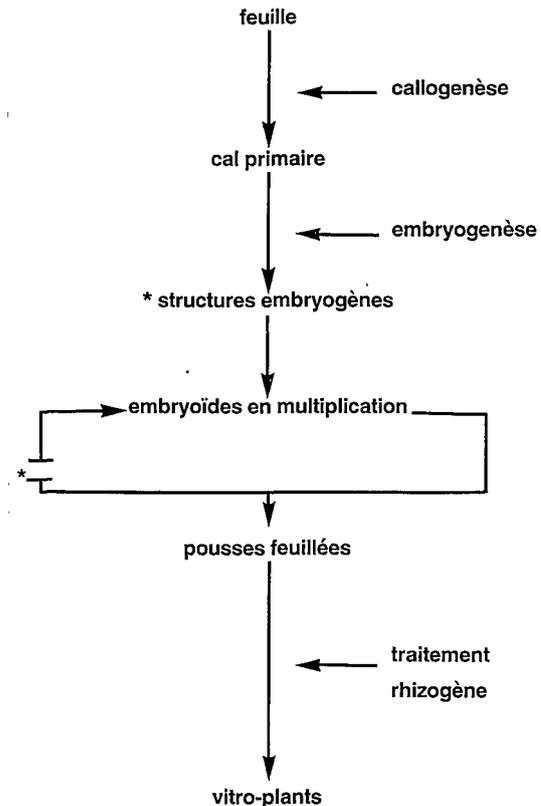
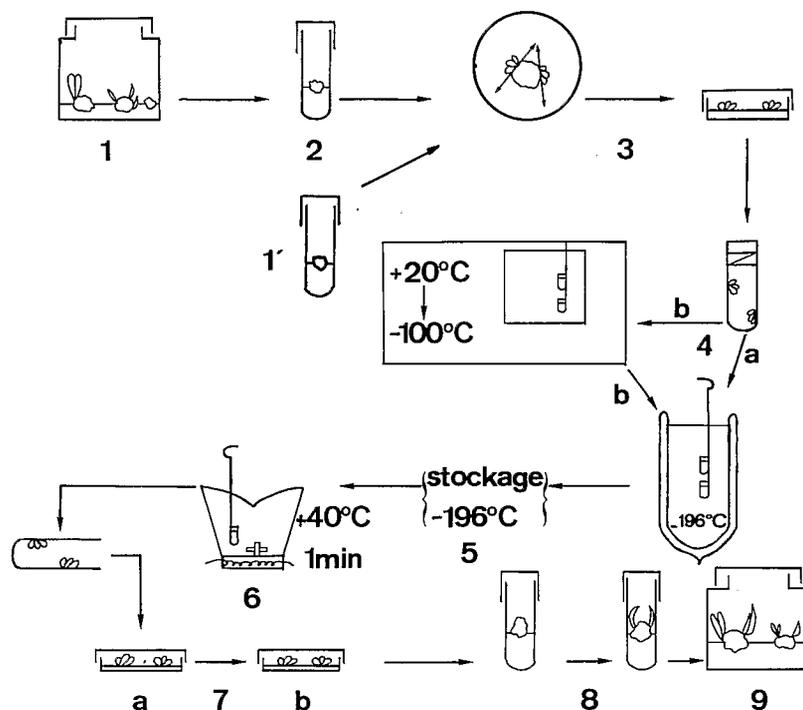


Figure 1 Schéma du procédé de multiplication *in vitro* du palmier à huile. Les niveaux d'application de la cryoconservation sont indiqués par un astérisque (\*)

Figure 1 Schematic representation of the oil palm *in vitro* propagation process. Cryopreservation application levels are marked with an asterisk (\*)

La méthode de multiplication *in vitro* qui a été mise au point, résumée dans la Figure 1, utilise la voie de l'embryogenèse somatique à partir de cal foliaires<sup>8,9</sup>. Les plants sont produits à grande échelle grâce au développement d'embryons adventifs sur les embryons somatiques. Cette embryogenèse se réalise, dans certains cas, de manière continue et permet le maintien en culture *in vitro* de lignées d'embryoides pendant plusieurs années. Du fait de l'industrialisation de ce procédé, il a été envisagé de mettre au point une technique de cryoconservation des embryons somatiques pour faire face à deux problèmes de nature différente:

1. la gestion des laboratoires, car l'apport constant en matériel végétal implique une augmentation des surfaces des salles de culture et les repiquages réguliers nécessaires à l'entretien des clones d'embryoides entraînent des coûts élevés en main-d'oeuvre et en équipement;
2. le maintien de la conformité du matériel régénéré qui exige de diminuer le plus possible la durée de la multiplication *in vitro*. Si aucune anomalie n'a été observée chez les vitroplants produits selon le procédé ORSTOM-IRHO, ce problème a été illustré récemment, dans le cas du palmier à huile, par des chercheurs de la société Unilever<sup>10</sup>. Ceux-ci ont signalé, en effet, que les premiers palmiers produits par culture *in vitro* ont un développement floral normal, mais que les sujets provenant des mêmes cultures entretenues *in vitro* pendant trois ans présentent des anomalies dans 88-95% des cas. On peut penser que l'apparition de ces anomalies est due à l'emploi de régulateurs de croissance pendant la phase de multiplication des embryoides.



**Figure 2** Schéma général du procédé de cryoconservation des embryoides de palmier à huile: 1,1', Matériel de départ-1, embryoides en multiplication, 1', structures embryogènes; 2, obtention de massifs d'embryoides pour la congélation, 2 mois en présence de saccharose 0,3 M; 3, dissection des massifs et prétraitement de sept jours sur du saccharose 0,75 M; 4, refroidissement-(a) rapide, (b) programmé; 5, stockage dans l'azote liquide (-196°C); 6, réchauffement, 1 min à +40°C; 7, post-traitement-(a) une semaine en présence de saccharose 0,3 M et de 2,4-D  $10^{-6}$  M (embryoides en multiplication), (b) deux semaines en présence de saccharose 0,1 M et de 2,4-D  $10^{-6}$  M (embryoides en multiplication); 8, repiquages successifs sur le milieu de multiplication, reprise de la prolifération; 9, repiquage en bocal pour l'extension des cultures et la production de pousses feuillées issues de matériel congelé

**Figure 2** Diagram of the oil palm embryoid cryopreservation process: 1,1', Starting material - 1, multiplying embryoids, 1', embryogenic structures; 2, obtaining embryoid clumps for freezing, two months on 0.3 M sucrose; 3, dissection of clumps and seven-day pretreatment on 0.75 M sucrose; 4, freezing - (a) rapid, (b) programmed; 5, storage in liquid nitrogen (-196°C); 6, thawing, 1 min at +40°C; 7, post-treatment - (a) 1 week on 0.3 M sucrose and  $10^{-6}$  M 2,4-D (multiplying embryoids), (b) 2 weeks on 0.1 M sucrose and  $10^{-6}$  M 2,4-D (multiplying embryos); 8, successive transfers on multiplication medium, resumption of multiplication; 9, transfer to jar to allow cultures to expand and produce shoots from frozen embryoid clumps

### Cryoconservation des embryons somatiques de palmier à huile

#### Description de la méthode

La méthode qui a été mise au point<sup>11,12</sup> a été appliquée aux embryoides en multiplication et aux structures embryogènes (Figure 1). Elle comporte les étapes suivantes qui sont schématisées dans la Figure 2:

1. Obtention de jeunes embryoides, seuls susceptibles de résister à la congélation. Ce type d'embryoides, peu fréquemment observé dans les cultures sur milieu standard, est obtenu avec une fréquence élevée après une culture de deux mois sur un milieu enrichi en saccharose<sup>13</sup>.
2. Prétraitement: les massifs d'embryoides sont placés pendant sept jours sur un milieu fortement enrichi en saccharose, ce qui a pour effet de diminuer leur teneur en eau de 80-60% environ par rapport à leur poids de matière fraîche.
3. Congélation: les massifs d'embryoides, placés dans des cryotubes stériles de 2 ml, sont congelés rapidement ( $200^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ), par immersion directe dans l'azote liquide, ou en deux étapes comprenant un refroidissement contrôlé de +20 à -100°C, réalisé au moyen d'un

congélateur programmable (type Minicool, commercialisé par l'Air Liquide), suivi d'une immersion dans l'azote liquide (les vitesses de refroidissement varient alors de  $0,5-40^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ).

4. Réchauffement: après stockage dans l'azote liquide, les massifs d'embryoides sont réchauffés en plongeant les cryotubes pendant 1 min dans un bain-marie thermostaté à 40°C.

5. Post-traitement: les massifs d'embryoides sont cultivés pendant trois semaines sur des milieux additionnés d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) et progressivement appauvris en saccharose. Ils sont ensuite repiqués sur le milieu standard dépourvu d'auxine.

#### Cryoconservation des embryoides en multiplication et des structures embryogènes

**Embryoides en multiplication.** Avec une congélation rapide, des taux de survie de 50-80% des embryoides sont systématiquement obtenus. Une expérimentation réalisée avec 25 clones a donné un taux de survie moyen de 50%. La reprise de la multiplication, obtenue avec 10-30% des massifs d'embryoides, est observée deux mois après leur réchauffement.

L'adjonction de 2,4-D au milieu de culture, après la

décongélation, pendant une période brève, est obligatoire pour obtenir régulièrement une reprise de la multiplication. En l'absence d'auxine, on assiste dans quelques cas seulement au développement d'un embryotide en pousse feuillée et la reprise de la prolifération n'est observée que de manière exceptionnelle et aléatoire.

Lorsque la congélation est effectuée en deux étapes, des vitesses de refroidissement comprises entre 5 et 40°C min<sup>-1</sup> permettent d'obtenir régulièrement des résultats comparables à ceux décrits précédemment: taux de survie de 50-80% et reprise de la multiplication comprise entre 6 et 23%, suivant le clone et la vitesse de congélation. L'avantage présenté par l'emploi d'un congélateur programmable est de permettre l'obtention de vitesses de congélation précises et parfaitement reproductibles d'un essai à l'autre, ce qui n'est pas forcément le cas avec la technique de congélation rapide.

La reprise de la prolifération a été obtenue à partir d'embryoïdes de deux clones stockés pendant 12 et 15 mois dans l'azote liquide, sans que l'on observe de variation du taux de reprise.

**Structures embryogènes.** Une expérience a aussi été réalisée avec ce matériel, en utilisant une congélation rapide (200°C min<sup>-1</sup>). La prolifération a été obtenue avec 20% des massifs congelés, sans qu'il soit nécessaire d'incorporer du 2,4-D au milieu de culture pendant le post-traitement.

#### Production de vitroplants à partir de matériel végétal

Les cultures obtenues à partir des massifs d'embryoïdes congelés ont subi plusieurs cycles de multiplication avant d'isoler les pousses feuillées ayant une taille suffisante pour subir un traitement inducteur de la rhizogenèse. Après ce traitement, les vitroplants ont été acclimatés en serre et se sont comportés normalement.

Des pousses feuillées de deux clones, l'un congelé au stade 'embryoïdes en multiplication' et stocké pendant sept mois dans l'azote liquide, l'autre congelé au stade 'structures embryogènes', ont été envoyées à la Station de Recherche IRHO/CIRAD de La Mé (Côte d'Ivoire). Ces pousses ont été mises à enraciner, acclimatées en pépinière, cultivées en pépinière puis plantées en champ. L'enracinement et le développement des vitroplants provenant de matériel cryoconservé ont été comparables, pour les deux clones, à ceux de vitroplants issus d'embryoïdes non congelés. Les observations sont actuellement poursuivies pour vérifier la conformité des plantes provenant des embryoïdes cryoconservés.

#### Discussion et conclusion

La méthode de cryoconservation des embryons somatiques de palmier à huile décrite dans cet article permet d'obtenir, de manière reproductible, la reprise de la prolifération du matériel congelé. Les vitroplants issus d'embryoïdes congelés ont un développement identique à celui des vitroplants provenant de matériel non congelé. Un stockage de 12 ou 15 mois dans l'azote liquide n'a pas d'effet sur le taux de reprise des embryoïdes. Le procédé mis au point est particulièrement simple; les seules modifications du milieu de culture consistent en une augmentation puis une diminution de la concentration en saccharose, avant et après la congélation, et en l'addition de 2,4-D pendant une durée très brève lors du

post-traitement des embryoïdes en multiplication. L'utilisation de cette auxine n'est même plus nécessaire pour induire la prolifération lorsque le matériel est congelé à l'état de structures embryogènes.

De plus, cette technique est peu onéreuse, car l'utilisation d'un congélateur programmable n'est pas obligatoire, même si elle est fortement recommandée afin d'assurer une bonne reproductibilité des conditions expérimentales. L'investissement en récipients de stockage et le coût de leur approvisionnement régulier en azote liquide sont peu élevés.

Diverses améliorations du procédé doivent cependant être recherchées afin d'augmenter son efficacité. Elles concerneront la technique de cryoconservation d'une part et le matériel végétal d'autre part. Ainsi, l'utilisation de 2,4-D pendant le post-traitement devra être évitée, car cette substance peut entraîner des anomalies au niveau génétique. Il faudra également diminuer la taille des massifs d'embryoïdes pour éviter la cristallisation, létale pour les cellules, de l'eau intracellulaire pendant la congélation. Enfin, des essais plus précis devront être réalisés avec les structures embryogènes dont l'intérêt, par rapport aux embryoïdes en multiplication, réside dans le fait que l'adjonction d'auxine n'est pas nécessaire, après la décongélation, pour obtenir leur prolifération. De plus, la durée de culture *in vitro* de ces structures est inférieure à celle des embryoïdes en multiplication, ce qui diminue les risques de variations génétiques.

En conclusion, il est possible, dès à présent, d'utiliser la technique décrite pour un stockage à long terme, sans attendre d'éventuelles améliorations du procédé, puisque l'on sait régénérer des vitroplants à partir d'embryoïdes en multiplication et de structures embryogènes après leur conservation dans l'azote liquide.

La cryoconservation des embryons somatiques de palmier à huile fait l'objet, en 1989, d'un transfert de technologie. Le procédé va être appliqué dans les laboratoires de Côte d'Ivoire, de Malaisie et d'Indonésie pour le stockage des clones qu'ils produisent. Enfin, la même technique va être prochainement étendue à la conservation des embryons zygotiques de palmier à huile et de cocotier, dont l'équipe ORSTOM/IRHO maîtrise la culture *in vitro*<sup>14,15</sup>.

#### Remerciements

Ce travail a été effectué jusqu'en décembre 1988 au Laboratoire de Physiologie des Organes Végétaux après Récolte (POVAR, CNRS-Meudon). Ce programme a été réalisé à l'initiative de l'IRHO-CIRAD qui en a assuré le soutien financier.

#### Références

- 1 Roberts, E. H., King, M. W. Storage of recalcitrant seeds in *Crop Genetic Resources - The Conservation of Difficult Material* (Eds L. A. Withers, J. T. Williams) Int Union Biol Sci Série B42, IUBS, Paris (1980) 39-48
- 2 Bayliss, M. W. Chromosomal variations in plant tissues in culture *Int Rev Cytol* (1980) Suppl. 11A, 113-144
- 3 Reisch, B. Genetic variability in regenerated plants, in: *Handbook of Plant Cell Culture Vol. 1 Techniques for Propagation and Breeding* (Eds D. A. Evans, W. R. Sharp, P. V. Ammirato, Y. Yamada) Macmillan, New York (1984) 748-769
- 4 Larkin, P. J., Scowcroft, W. R. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement *Theor Appl Genet* (1981) 60 197-214
- 5 Kartha, K. K. Genepool conservation through tissue culture *Proc*

- COSTED Symp on Tissue Culture of Economically Important Plants (Ed A. N. Rao) COSTED and ANBS, Singapore (1981) 213-218
- 6 Dereuddre, J., Engelmann, F. The use of cryopreservation for setting up banks of plant germplasm. *Proc Coll Franco-Britannique IAPTC Angers*, (Eds J. Boccon-Gibod, A. Benbadis and K. C. Short) ENITPH, France (1987) 48-78
  - 7 Noiret, J. M., Gascon, J. P., Pannetier, C. La production de palmier à huile par culture *in vitro* *Oléagineux* (1985) 40 365-372
  - 8 Pannetier, C., Arthuis, P., Liévoux, D. Néof ormation de jeunes plantes d'*Elaeis guineensis* à partir de cals primaires obtenus sur fragments foliaires cultivés *in vitro* *Oléagineux* (1981) 36 119-122
  - 9 Hanower, J., Pannetier, C. *In vitro* vegetative propagation of the oil palm, *Elaeis guineensis* Jacq in *Proc 5th Int Congr Plant Tissue and Cell Culture* (Ed A. Fujiwara) Tokyo (1982) 745-746
  - 10 Corley, R. H. V., Lee, C. H., Law, I. H., Wong, C. Y. Abnormal flower development in oil palm clones *Planter* (1986) 62 233-240
  - 11 Engelmann, F., Duval Y., Dereuddre, J. Survie et prolifération d'embryons somatiques de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) après congélation dans l'azote liquide *C R Acad Sci Paris III* (1985) 301 111-116
  - 12 Engelmann, F., Duval, Y. Cryoconservation d'embryons somatiques de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.): résultats et perspectives d'application *Oléagineux* (1986) 41 169-174
  - 13 Engelmann, F., Dereuddre, J. Effets du milieu de culture sur la production d'embryoïdes destinés à la cryoconservation chez le palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) *C R Acad Sci Paris III* (1988) 306 515-520
  - 14 Rabéchault, H., Cas, S. Recherches sur la culture *in vitro* des embryons de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *dura* Becc.) *Oléagineux* (1974) 29 73-78
  - 15 Assy-Bah, B. Culture *in vitro* d'embryons zygotiques de cocotier *Oléagineux* (1986) 41 321-328