

Biotechnologies/*Biotechnologies*
(Physiologie végétale/*Plant Physiology*)

Utilisation d'atmosphères à teneur en oxygène réduite pour la conservation de cultures d'embryons somatiques de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.)

Florent ENGELMANN

Résumé – Des embryons somatiques de palmier à huile ont pu être conservés sans repiquage pendant 4 mois à 27°C, dans une atmosphère contenant 1 % d'oxygène. Cette méthode permet de limiter leur croissance et de conserver en bon état l'intégralité des cultures, sans modifier leur taux de reprise après la période de stockage.

Use of atmospheres with low oxygen contents for the storage of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryo cultures

Abstract – Oil palm somatic embryos could be stored for 4 months at 27°C without subculturing, in an atmosphere containing 1% oxygen. This method allowed us to reduce growth and preserve the whole cultures in good shape, without modifying their growth recovery rate after the storage period.

Abridged English Version – Regular subcultures are required for the maintenance of plant germplasm *in vitro*. These operations are costly and the risks of contamination increase with the number of transfers. Moreover, variations are more likely to occur with increasing culture duration [1]. The setting up of satisfactory storage techniques is an important aim.

Cryopreservation techniques have already been developed for a large range of plant species [2]. However, cryopreservation is often difficult and is thus worth developing only for the storage of precious material. For medium term storage, growth reduction is generally achieved by decreasing the temperature. In several experiments, growth reduction was obtained by lowering the quantity of oxygen available for the cultures, using mineral oil overlays ([3], [4], [5]), or controlled atmospheres [6].

In the case of oil palm, a cryopreservation process has been set up ([7], [8]). Preliminary medium term storage experiments using reduced temperatures revealed a very important cold-sensitivity of oil palm somatic embryos [9]. The problem of the maintenance of oil palm somatic embryo collections increases dramatically with the industrial development of the propagation technique [10].

In this paper, we investigated the effects of a decrease in the oxygen level in the culture atmosphere on the conservation possibilities of oil palm somatic embryo cultures.

The somatic embryos used in this experiment were obtained from the ORSTOM/I.R.H.O. research team, according to a technique described previously [11]. They were cultured on a medium devoid of growth regulators and containing 0.1 M sucrose [12], at 27°C with a 12 hrs. photoperiod.

For hypoxia experiments, the cultures were placed for 4 months in an air-tight 50 l plastic box into which a mixture of 1% oxygen and 99% nitrogen was injected at a rate of 20 l/hr. Cultures were placed in hypoxia immediately or 15 days after the transfer on to new media. Control cultures were placed in boxes injected with air, without subcultures for 4 months, or in the culture room with monthly transfers.

Note présentée par Alexis MOYSE.

During the storage period the growth of the cultures placed in hypoxia was 1/4 lower than that of the controls (Table I). No difference was noted between cultures stored immediately or 15 days after the transfer on new media. The aspect of the cultures at the end of the storage period differed according to the condition (Table II). Less than 40% of the controls were in good shape, to be compared with more than 90% of the cultures stored under hypoxia. More than half of the controls were partially or completely soft, against less than 10% with 1% oxygen. Finally, hypoxia reduced considerably the number of shoots produced during storage (*Fig.*).

After the transfer to standard conditions, no differences were noted as concerned the growth rate of the cultures, whatever their storage condition. Growth was in all cases similar to that of monthly subcultured controls (Table III). However, the whole cultures could be used for re proliferation after low oxygen storage only.

These preliminary experiments showed that the storage of oil palm somatic embryos is possible without transfer for 4 months at 27°C in an atmosphere containing 1% oxygen. Proliferation recovery rate was comparable to that of non-stored controls. The whole cultures could be conserved in good shape, which is very important for the rapid extension of the cultures. No differences were noted as concerned the development of shoots coming from control and stored embryos. However, their further development will have to be checked. Lower oxygen levels as well as longer storage periods should be experimented with different clones.

In conclusion, this technique could be applied rapidly to the storage of oil palm somatic embryos. It seems to be of great interest for the medium term conservation *in vitro* of cold-sensitive species, since the use of this process allows us to avoid the reduction of the culture temperature.

INTRODUCTION. — L'entretien de matériel végétal *in vitro* nécessite des repiquages réguliers. Ces opérations sont coûteuses et les risques de contamination sont directement proportionnels à la fréquence des repiquages. D'autre part, les risques de dérive génétique augmentent avec la durée de culture *in vitro* [1]. La mise au point de conditions satisfaisantes pour la conservation des cultures est donc un objectif prioritaire.

La cryoconservation a déjà été utilisée pour de nombreuses espèces végétales [2], mais cette technique est souvent longue à mettre au point et nécessite généralement des équipements sophistiqués. Son utilisation n'est donc envisageable que pour le stockage de clones présentant des caractéristiques intéressantes ou pour la conservation des ressources génétiques d'une espèce donnée.

Pour une conservation à moyen terme, le ralentissement de la croissance recherché est généralement obtenu par un abaissement de la température de culture. D'autres techniques ont été utilisées, notamment en limitant la quantité d'oxygène disponible pour les cultures. Ceci a été réalisé en recouvrant le matériel d'une couche d'huile minérale ([3], [4], [5]), ou en cultivant les explants dans une atmosphère appauvrie en oxygène, obtenue soit en balayant l'enceinte de culture avec un mélange gazeux de composition connue, soit en réduisant la pression atmosphérique [6].

Dans le cas du palmier à huile, une technique de cryoconservation des embryons somatiques a été mise au point ([7], [8]). Des essais de conservation à moyen terme utilisant les basses températures ont fait apparaître une très grande sensibilité au froid des cultures d'embryons somatiques de palmier à huile [9], rendant impossible leur

conservation par cette méthode. Le problème de l'entretien des collections se pose donc de manière d'autant plus aiguë que le nombre des clones augmente constamment du fait de l'industrialisation progressive de la technique [10].

Dans cet article, nous avons voulu observer l'effet d'une diminution de la teneur en oxygène de l'atmosphère de culture sur les possibilités de conservation d'embryons somatiques de palmier à huile.

MATÉRIEL ET MÉTHODE. — La culture d'embryons somatiques adventifs utilisée a été produite par l'équipe de recherche ORSTOM/I.R.H.O. en 1980 à partir d'un plant de pépinière, par une méthode décrite précédemment [11]. La culture est repiquée tous les mois sur un milieu de Murashige et Skoog modifié [12], dépourvu de régulateurs de croissance et additionné de 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.

Pour les essais d'anoxie partielle, les cultures ont été placées dans des cellules étanches de 50 l en plexiglas transparent. Le débit du mélange gazeux, mesuré à la sortie des enceintes, était de 20 l/h. Le dispositif expérimental comprenait un ensemble de capillaires étalonnés permettant de réaliser dans une enceinte une concentration de 1 % d'oxygène, à partir d'une bouteille d'azote sous pression et d'air fourni par un compresseur. Avant d'arriver dans les enceintes, les mélanges gazeux étaient humidifiés par bullage dans un flacon rempli d'eau.

Les cultures placées en hypoxie n'ont pas été repiquées pendant les 4 mois de l'expérience. Deux témoins ont été réalisés : l'un placé dans une enceinte balayée par de l'air, non repiqué pendant la durée de l'essai, l'autre, cultivé dans les conditions standard, repiqué tous les mois. Les cultures ont été placées en atmosphère appauvrie en oxygène soit immédiatement, soit 15 jours après le repiquage. Chaque série comprenait 47 tubes de culture.

Le pourcentage d'accroissement de la masse de matière fraîche (MMF) des embryons a été mesuré pendant le stockage puis lors des deux cycles de culture suivants. Il a été calculé par rapport au poids d'embryons repiqués au début de chaque cycle de culture. On a également observé l'aspect des cultures à la fin de la période de stockage (ferme, ferme/mou, mou). Les cultures pouvaient être soit fermes, composées d'embryons turgescents (ferme), soit comporter un certain nombre d'embryons mous, plasmolysés, en début de nécrose (ferme/mou), soit enfin être totalement molles (mou). Le nombre de pousses feuillées, la présence de tissus nécrosés et la diffusion de produits bruns dans le milieu, sans doute d'origine phénolique, ont également été notés.

RÉSULTATS. — Le tableau I présente le pourcentage d'augmentation de la MMF des cultures dans les différentes conditions expérimentées et au cours des deux cycles de culture suivants. Pendant le stockage, l'accroissement de la MMF des cultures stockées sous 1 % d'oxygène est inférieur de plus d'1/4 à celui des témoins air. On ne note aucune différence de croissance entre les embryons stockés immédiatement ou 15 jours après le repiquage.

L'aspect des cultures en fin de stockage (tableau II) est très différent suivant les conditions. Moins de 40 % des tubes témoins sont encore en bon état (18/47), contre plus de 90 % en hypoxie (42/47 et 43/47). Plus de la moitié des témoins sont partiellement ou totalement mous (29/47), contre moins de 10 % avec 1 % d'oxygène. Le nombre de tubes comportant des nécroses et des diffusions de phénols dans le milieu est également

TABLEAU I

Augmentation de la MMF des embryons pendant le stockage et les deux cycles suivant la remise en culture en conditions standard en fonction des conditions de leur stockage : hypoxie immédiatement (1 % O₂ t₀) ou 15 jours après le repiquage (1 % O₂ t₀+15), témoin air (Té Air). Les valeurs sont indiquées avec leur demi-écart type.

Fresh weight increase (±s.d.) of embryos during storage and the two subcultures following their transfer to standard conditions as a function of their storage conditions: hypoxia immediately (1% O₂ t₀) or 15 days after transfer (1% O₂ t₀+15), controls in air (Té Air).

	1 % O ₂ t ₀	1 % O ₂ t ₀ +15	Té Air
Stockage	757 ± 343	672 ± 310	1 002 ± 391
1 ^{er} cycle	527 ± 235	463 ± 224	536 ± 317
2 ^e cycle	518 ± 228	619 ± 289	456 ± 281

TABLEAU II

Aspect des cultures d'embryons après 4 mois de conservation en hypoxie (1 % O₂ t₀, 1 % O₂ t₀+15) ou dans l'air (Té Air).

Aspect of embryo cultures after 4 months of storage in hypoxia (1% O₂ t₀, 1% O₂ t₀+15) or in air (Té Air).

	1 % O ₂ t ₀	1 % O ₂ t ₀ +15	Té Air
Ferme	43	42	18
Ferme/Mou	4	5	26
Mou	0	0	3
Nécroses/Diffusion	7	4	26
Pousses feuillées	5	9	71

TABLEAU III

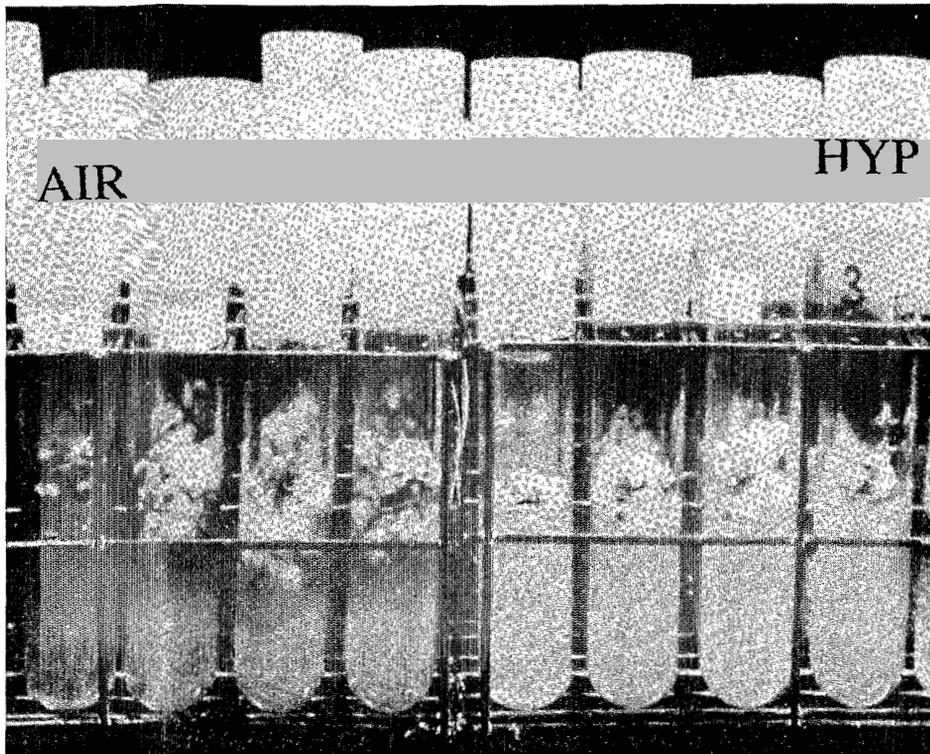
Augmentation de la MMF et aspect des cultures, 1 mois après le repiquage, d'embryons repiqués tous les mois et cultivés en conditions standard.

Fresh weight increase and aspect, 1 month after the last transfer, of embryo cultures subcultured every month and cultivated in standard conditions.

	Té Air repiquage mensuel
Augmentation MMF (%)	450 ± 185
Ferme	44
Ferme/Mou	3
Mou	0
Nécroses/Diffusion	5
Pousses feuillées	9

beaucoup plus important chez les cultures témoins. Enfin, la production de pousses feuillées est considérablement diminuée dans les cultures placées en hypoxie (*fig.*).

Lors de la remise en culture en conditions standard, on ne note pas de différence significative dans l'accroissement de la MMF entre les différentes conditions (tableau I). Les valeurs obtenues sont proches de celle mesurée chez le témoin repiqué tous les mois, soit +450 % (tableau III). Cependant, du fait de l'état différent des cultures en fin de stockage, la quasi-totalité des embryons cultivés en hypoxie peut être utilisée. Il n'en est pas de même pour le matériel conservé dans l'air. Dans ce cas, seule une partie plus ou moins importante des embryons de chaque tube reste capable de reprendre la prolifération.



Aspect de cultures d'embryons somatiques de palmier à huile, après 4 mois de stockage en hypoxie (Hyp.) ou dans l'air (Air).

Aspect of oil palm somatic embryo cultures after 4 months of storage under hypoxia (Hyp.) or in air (Air).

DISCUSSION. CONCLUSION. — Il a été montré que la conservation de cultures d'embryons somatiques de palmier à huile était possible pendant 4 mois sans repiquage, dans une atmosphère contenant 1 % d'oxygène. La reprise de la prolifération se fait avec un taux comparable au témoin repiqué régulièrement, et l'ensemble de la culture est conservé en bon état. La conservation pendant cette durée en atmosphère normale est possible, mais les nécroses sont importantes, ce qui limite la quantité de matériel utilisable pour la reprise. Ceci est d'un grand intérêt pratique pour assurer une rapide extension des cultures à partir du matériel conservé.

Aucune différence n'a été observée dans l'aspect des pousses feuillées produites à partir des témoins et des cultures conservées en hypoxie. Il sera cependant nécessaire d'observer l'effet du traitement sur le développement ultérieur des pousses feuillées. Des essais du même type ont été réalisés sur des plantules de chrysanthème et de tabac par Bridgen et Staby [6], mais pour des durées de conservation bien inférieures (6 semaines). Ils ont observé que le stockage en atmosphère appauvrie en oxygène n'avait pas eu d'effet sur l'enracinement et le développement *in vivo* des plantules traitées. Il reste également à expérimenter des durées de conservation plus longues et des teneurs en oxygène plus faibles, pour voir s'il est ainsi possible de limiter encore la croissance des cultures et à éprouver cette méthode sur d'autres clones.

En conclusion, cette technique simple pourra être rapidement appliquée pour la conservation des embryons somatiques de palmier à huile. Elle semble également d'un grand

intérêt pour le stockage des plantes sensibles au froid, car l'utilisation de cette méthode évite d'abaisser la température de culture pour limiter la croissance.

Note remise le 1^{er} mars 1990, acceptée après révision le 9 mai 1990.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] P. M. LARKIN et W. R. SCOWCROFT, *Theor. Appl. Genet.*, 60, 1981, p. 197-214.
- [2] J. DEREUDDRE et F. ENGELMANN, *Proc. Coll. Franco-Britannique I.A.P.T.C.*, Amiens, 1987, p. 48-78.
- [3] S. M. CAPLIN, *Am. J. Bot.*, 46, 1959, p. 324-329.
- [4] J. M. AUGEREAU, D. COURTOIS et V. PETIARD, *Plant Cell Rep.*, 5, 1986, p. 372-376.
- [5] T. MORIGUCHI, I. KOZAKI, N. MATSUTA et S. YAMAKI, *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 15, 1988, p. 67-71.
- [6] M. P. BRIDGEN et G. L. STABY, *Plant Sci. Lett.*, 22, 1981, p. 177-186.
- [7] F. ENGELMANN, Y. DUVAL et J. DEREUDDRE, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 301, série III, 1985, p. 111-116.
- [8] F. ENGELMANN, *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 1989 (sous presse).
- [9] F. CORBINEAU, F. ENGELMANN et D. COME, Soumis à publication, 1990.
- [10] Y. DUVAL, T. DURAND-GASSELIN, K. KONAN et C. PANNETIER, *Oléagineux*, 43, 1988, p. 39-48.
- [11] C. PANNETIER, P. ARTHUIS et D. LIEVOUX, *Oléagineux*, 36, 1981, p. 119-122.
- [12] J. HANOWER et C. PANNETIER, *Proc. 5th Intl. Cong. Plant and Cell Culture*, Tokyo, 1982, p. 745-746.

*Laboratoire de Physiologie des Organes végétaux après Récolte,
C.N.R.S., 4 ter, route des Gardes, 92190 Meudon;*

Adresse actuelle :
*ORSTOM (Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération),
B.P. n° 5045, 34032 Montpellier Cedex 1.*

003020